

TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CULTURES CELLULAIRES ET ORGANOTYPIQUES DANS LES ÉVALUATION DES CARACTÉRISTIQUES PHARMACOLOGIQUES DES FRACTIONS STANDARDISÉES DES PRODUITS APICOLES

R. STOJKO¹, Zofia DZIERŻEWICZ², A. STOJKO², Agata PYTEL¹

¹Department of Pathology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLOGNE
e-mail: rstojko@slam.katowice.pl

²Department of Sanitation, Bioanalysis & Environment Research, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice,
POLOGNE

³Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice,
POLOGNE

Introduction

Le développement des sciences fondamentales, de même que l'essor de la médecine et la technologie ont déterminé l'évolution des médicaments. Ces domaines du savoir humain ont rendu possible et facile la recherche pharmacodynamique nécessaire à l'estimation et à la standardisation pharmacologique des substances actives provenant des matériaux d'origine biologique. Les observations faites ont été un point de départ dans l'obtention des médicaments synthétiques. Le développement parallèle de la biotechnologie, de la pharmacologie et de la phytochimie a conduit à des progrès considérables pour ce qu'il y a des méthodes de détection, d'isolement et d'analyse de certaines substances telles les glycosides, les alcaloïdes et les flavonoïdes. Ces découvertes ont été accompagnées par des études pharmacodynamiques de plus en plus approfondies qui caractérisaient l'accessibilité biologique du médicament et fixaient ses caractéristiques pharmacologiques et toxiques. L'essor des sciences fondamentales – la biologie moléculaire et la génétique surtout - a contribué à la connaissance des différents mécanismes qui accompagnent les processus pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Leur découverte a été conditionnée par le type de médicament, par sa forme et son influence sur le corps, et ils ne sont que le résultat de l'interaction entre de nombreux facteurs génétiques et non-génétiques. Les produits pharmacogénétiques nous ont fourni un bon nombre de cas où les facteurs génétiques et les facteurs liés à l'environnement existent et agissent ensemble.

Des études récentes ont montré que chaque race humaine a une réaction différente envers certaines substances actives présentes dans les médicaments. La race caucasienne et asiatique surtout présentent les plus grandes différences. On connaît également que les gens malades appartenant à la même race ont des réactions différentes à un médicament en fonction de leur âge, du sexe, de l'état général de santé et de certains médicaments qu'ils ont déjà pris. Il y a des preuves que les gènes peuvent influencer l'efficacité de différentes méthodes de traitement pharmacologique, phénomène dû au fait que ce sont les gènes qui sont responsables de la synthèse des enzymes qui prennent part aux réactions chimiques à l'intérieur de notre corps, y compris la direction et la durée des changements chimiques résultant à la suite de la prise des médicaments prescrits. Ces constatations sont partiellement les résultats des observations faites sur des malades de tuberculose, traités avec isonidaside. Chez certains patients, le médicament qui n'a pas été métabolisé est resté dans le sang pour une période plus longue de temps. Ces malades ont subi des troubles neurologiques, tandis que les autres n'ont manifesté aucun problème. Les études génétiques effectuées sur ces patients, qui réagissaient au traitement de manière différente, ont indiqué l'existence de deux types de métabolisme isonidaside héréditaire, à savoir l'ainsi nommé mécanisme lent et le mécanisme rapide.

Dans les dernières années, on a découvert de différents types de gènes dont les produits protéiques prennent part au processus des changements chimiques comme enzymes. D'habitude, lorsque les maladies sont provoquées par un seul gène, les docteurs n'ont aucun doute en ce qui concerne la dose pour un

médicament. On continue le processus de mappage du polymorphisme du nucléotide unique (PNU) présent dans tout le génome. La base de la pharmacogénomie est constituée par un seul changement du nucléotide, observé dans les séquences de gènes codifiant les protéines, qui transportent et métabolisent les médicaments. Lorsqu'il y a plus d'un gène qui joue un rôle important dans une certaine maladie, il n'est pas très facile de choisir la thérapie adéquate. Malheureusement, les maladies infligées par plusieurs gènes constituent le groupe le plus important de toutes les maladies. A l'heure actuelle, on est à la recherche des soi-disants "points chauds", c'est-à-dire des fragments d'ADN qui, précisément à cause des différences qu'ils présentent pour des gens différents, sont responsables des réactions différentes qu'un organisme a envers certains médicaments. La pharmacogénomie, en tant que nouveau domaine de la biomédecine, traitera probablement chaque malade individuellement, en s'appuyant sur sa gamme de PNUs ou des "points chauds" des molécules de DNA.

La pharmacogénomie est un domaine qui sera responsable du "traitement cible" et qui fera partie de la future révolution en médecine, dit dans une fameuse revue de spécialité Francis Collins, le président de l'Institut National Américain de Recherches sur le Génome Humain (American National Human Genome Research Institute). Cette nouvelle branche de la médecine nous permettra non seulement d'épargner de l'argent et du temps qu'on perd souvent à cause d'un traitement inefficace, mais son apparition va également minimiser les effets secondaires des médicaments. Les données pharmacoépidémiologiques indiquent clairement les effets indésirables de certains médicaments enregistrés. Les rapports publiés aux Etats-Unis montrent que dans ce pays un malade sur quatre meurt à cause des effets nocifs des médicaments. De France, on nous a parvenu des données alarmantes, qui mettent en évidence le fait qu'un médicament rendu commercial sur quatre est soit inefficace, voire dangereux pour la santé ou la vie des gens. On pense également que la pharmacologie pourra faciliter le contrôle du processus d'élaboration des nouveaux médicaments. En vue d'élaborer un nouveau médicament, on doit connaître la structure 3D des protéines, des enzymes, des acides nucléiques et des récepteurs se trouvant à la surface de la cellule. Les compagnies pharmaceutiques collectent déjà des échantillons d'ADN humain, dans l'espoir de pouvoir ainsi créer un profile qui leur permette la classification des malades, pour les distribuer par la suite dans la catégorie des médicaments qui les aidera où, par contre, qui leur nuira. L'élaboration d'un nouveau médicament est un processus de durée, qui commence par des études fondamentales entreprises dans les laboratoires et également par des testes à phases multiples effectués dans des cliniques, cela dans le but d'évaluer l'efficacité et le caractère inoffensif du médicament en question, en tant que méthode potentielle de traitement d'une certaine maladie. Avant de tester les médicaments sur des êtres humains, ses effets bénins sont prouvés par la suite des testes sur des animaux est aussi par des cultures de cellules. Dans certains cas, les études cliniques ont prouvé le rôle positif des produits collectés, transformés ou générés par les abeilles dans le traitement de certaines maladies.

Le progrès constant des études biomédicales, conséquence du développement rapide de la biologie moléculaire, apporte de nouvelles possibilités expérimentales en vue de l'accumulation de connaissances sur les mécanismes par lesquels de différentes substances chimiques prises à même la nature influencent tels quels ou en tant que système complexe l'organisme humain. C'est le cas des communautés d'insectes, dans le cadre desquelles on trouve l'exemple impressionnant des colonies d'abeilles.

La propolis, à part le miel, est une des matières premières employées en apithérapie. On connaît depuis longtemps les propriétés antibactériennes de ce produit d'origine biologique. A présent, on pense que les propriétés bactéricides de la propolis sont le résultat de l'effet synergique des flavonoïdes, des acides aromatiques et de la sesquiterpine. Des études cliniques ont montré ses effets auxiliaires dans le traitement de tous les types de brûlures, d'escarres, des ulcères des veines variqueuses et des eczémas. Les résultats spectaculaires de ce produit dans le traitement de nombreuses maladies ont mis en évidence le fait que, au delà de ses propriétés bactéricides, la propolis aide dans la régénération des tissus détériorés. Les études effectuées sur un modèle cellulaire ont prouvé que l'extrait standard de propolis agrandit l'activité proliférique des fibroblastes. Les études moléculaires ont démontré que la propolis est responsable de l'activité intensifiée de transcription des gènes qui prennent part au processus d'angiogenèse [1]. La confrontation

des études cliniques avec celles fondamentales a permis l'explication des mécanismes de son activité au niveau cellulaire et moléculaire. La connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la fraction active des produits apicoles dans le système physiologique et pathologique permettra à combler les lacunes et aidera qu'ils soient utilisés non seulement dans la prévention, mais également dans le traitement des maladies.

Toute une série de faits viennent à l'appui de l'idée que les acides gras à chaînes courtes (AGCC) générés dans l'intestin gros de l'être humain jouent de nombreux rôles physiologiques importants. On pense que troubler leur métabolisme pourrait être l'une des causes des maladies infectieuses de l'intestin gros. Du point de vue énergétique, de tous les acides gras, l'acide butyrique est le plus important pour la membrane muqueuse. On a démontré qu'une réduction de sa concentration dans le lumen du côlon, conséquence de l'afflux bas de substrats à fermentation rapide, mène à l'atrophie de la membrane muqueuse de cette partie particulière du tractus digestif. Fournir une quantité supplémentaire d'acide butyrique entraîne la régénération de la membrane muqueuse, fait démontré par l'intensification de l'augmentation de l'épithélium par l'approfondissement des plis intestinaux [2]. On suppose que le butyrate serait un facteur important de protection contre le cancer de l'intestin gros, car les études *in vitro* ont indiqué son influence disciplinaire sur les cellules cancéreuses [3]. En ce moment, on est à la recherche de ses sources naturelles. Notre attention se dirige sur la pain de pollen, car les bibliographies plus récentes [4, 5] montrent que 14% de son contenu est fait d'acides organiques. Dans le cadre de notre institut de biochimie (département de biologie moléculaire, biochimie et biopharmacie, Université Silésienne de Médecine), nous avons mis au point une méthode quantitative de détermination des AGCC dans la pain de pollen [4, 5]. Dans la pain de pollen analysé, on a trouvé de différents AGCC, l'acide butyrique y compris. On a également constaté que la dessiccation de la pain de pollen a eu un effet négatif sur leur contenu en AGCC.

Il semble qu'un important pas en avant en ce qui concerne les produits apicoles sera fait lorsqu'il y aura la possibilité d'utiliser les cultures primaires et les différentes lignées des cellules dérivant de l'organisme humain dans le but d'analyser l'importance de ces préparations brutes et standardisées pour les paramètres morphologiques et biochimiques des cellules utilisées pour les cultures. C'est sans aucun doute une bonne alternative aux études entreprises sur des animaux qui, de toute façon, n'indiquent pas toujours les processus qui se produisent dans les organes ou les tissus humains.

Dans les dernières 20 années, on a mis au point de nouvelles techniques pour cultiver les cellules des tissus humains *in vitro*. La possibilité d'obtenir une culture de masse à partir du fragment réduit comme dimensions, le progrès enregistré dans la découverte de nombreux types de cellules, la possibilité de modifier leurs actions dans les cultures ont conduit à l'augmentation de l'intérêt portant sur leur utilisation dans la pratique non seulement de la médecine, mais aussi de la biologie. On a remarqué que les cellules qui dérivent d'un tissu conjonctif sain peuvent être élevées plus facilement. On a élaboré des méthodes d'élevage de cellules à base des cellules épithéliales, à savoir les cellules kératynocytes de la peau, les cellules épithéliales du tractus urinaire, la glande de la prostate, la cavité orale, le vagin et la cornée oculaire. L'épiderme est un tissu particulièrement bon pour les cultures, car plus de 90% en fait partie d'une seule catégorie de cellules, à savoir les kératynocytes. Dans des conditions normales, les kératynocytes sont stables à l'intérieur des cultures et ne perdent pas leur capacité de prolifération et de différenciation. La raison principale des échecs dans les greffes d'épiderme consiste dans le manque d'adhésion à la blessure, comme à la suite des brûlures, par exemple, résultat probablement dû à l'absence d'une peau appropriée à la greffe. Ce problème a été pourtant surmonté par l'élaboration d'un substitut de la peau vive (EPV). On a observé que la peau humaine obtenue à partir des cultures manifeste de nombreuses similarités avec la peau naturelle pour ce qu'il y a de l'aspect morphologique et vasculaire, étant par cela adéquate pour de différents tests qu'on a effectué jusqu'à présent seulement sur des animaux. Les données expérimentales ont montré qu'un échantillon de 2 cm² d'EPV exposés à des facteurs chimiques provoquant des irritations de la peau ou de la cornée réagit du point de vue biologique de la même manière que la peau naturelle, en libérant des médiateurs pro-inflammatoires : les prostaglandines E₂, les prostacyclines, les interleukines [6, 7]. Il est également très important à observer que lorsqu'on emploie l'EPV, on peut tester les substances

solides, insolubles, liquides, des émulsions et des onguents à application locale, dans des zones exposées à l'air. On peut également étudier les mécanismes d'adhésion des micro-organismes qui pourraient infecter la peau, de même que les effets des médicaments sur ces micro-organismes. Aussi peut-on tester sur l'EPV des médicaments nouveaux, qui contiennent par exemple des produits apicoles actifs du point de vue pharmacologique.

À présent, il est possible de reconstituer dans des conditions de laboratoire d'autres modèles de cellules, présentant les caractéristiques spécifiques de l'organe dont les cellules proviennent. Aussi peut-on créer les veines et les petits lobules de la foie. Les cultures organotypiques sont particulièrement intéressantes pour l'étude des mécanismes de certains produits à base de nectar ou de manne, qui ont une influence positive sur l'organisme humain.

Beaucoup de scientifiques et de médecins pensent que l'immunothérapie, qui a pour but la fortification du système naturel de défense de l'organisme par l'emploi d'immunomodulateurs, sera de plus en plus importante. On ne peut plus douter de cette influence positive des produits apicoles sur le système immunitaire. On sait depuis longtemps que la propolis accroît l'immunité de l'organisme, et que l'apitoxine stimule fortement le système immunitaire. Ce qu'il en reste, est la mise au point de la procédure des études expérimentales et des erreurs. L'utilisation de la phytohémaglutynine en tant que facteur mythogynic rend possible la culture des lymphocytes. On se sert dans ce but de deux méthodes différentes : la macroculture et la microméthode. La macroculture nécessite la collecte de 5 à 10 ml de sang et la culture de lymphocytes isolées par centrifugation ou par sédimentation. Une analyse attentive des réalisations de la science biomédicale rendra manifeste le besoin de connaître la transcription humaine. C'est à cette fin qu'il est nécessaire de savoir les séquences transcrites de mARN à sADN et la mise au point d'une banque de données de cADN. On aura ainsi la possibilité de cloner de manière efficace seulement une région de gène et non toutes les séquences génomique qui l'entourent.

Les méthodes classiques et modernes de la biologie moléculaire permettent la constatation des différences dans l'expression des gènes au niveau de la transcription. Les gènes des différentes expressions ont été identifiés jusque récemment seulement à l'aide de la hybridation différentielle ou subtractive et de la séparation de leur produits protéiques. Depuis le temps où l'on peut employer les ressources des bases de données portant sur les acides nucléiques et les séquences de protéines, le nombre de gènes, dont on peut suivre l'expression, a dépassé la capacité des analyses traditionnelles.

L'une des approches modernes des différentes analyses sur l'expression des gènes qui se fonde sur la technique de la hybridation est constituée par les microprocesseurs ADN. Cette technologie suppose l'immobilisation sur un terrain d'un porteur stable d'un grand nombre de particules oligonucléiques à chaîne unique ou d'ADN[8, 9]. Bien qu'elles ne contiennent pas des marqueurs, ces particules ont le rôle de preuves moléculaires. Ce sont les acides déoxy et ribonucléiques hybrident avec eux qui sont analysés et marqués. Grâce aux microarrangements ADN on a pu étudier l'enchaînement de l'ADN et des protéines ou d'autres liants. Des techniques sensibles de détection fluorescente permettent l'identification exacte de chacun des composants du mélange étudié et l'évaluation quantitative de son attachement. Les données obtenues sont collectées et refaites par la suite à l'aide d'un logiciel performant. Cette stratégie rend possible l'analyse de milliers de gènes et l'évaluation de leur expression dans un temps court, au cadre de la même expérimentation. Les microréseaux d'ADN sont de plus en plus employés dans l'étude de la sensibilité individuelle à un médicament, dans l'optimisation de son efficacité et dans la recherche de nouveaux médicaments. Ces microréseaux sont pourtant encore très coûteuses.

Les opportunités supplémentaires escomptées des microprocesseurs ADN sont avancées par les études concernant les interactions entre différentes substances et leur composition naturelle avec le matériel génétique et avec les régulateurs de l'activité des gènes à l'intérieur d'une cellule. Depuis qu'on a démontré que certains produits apicoles employés depuis longtemps dans la chimiothérapie ont des effets synergiques, le fait de les ajouter dans le traitement nous permet l'usage de doses plus petites pour certains médicaments et l'élargissement de leur spectre d'activité.

BIBLIOGRAPHIE

- Pytel A. (2001) Leczenie ran oparzeniowych Propolem-O, Praca doktorska, , Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny.
- Dzierżewicz Z. et al. (1999) The role of butyric acid in growth, proliferation and differentiation of colonocytes. *Gastroenter. Pol.*, 6, 153-159.
- Dzierżewicz Z. et al. (2002) Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochem. Pol.* , 49, 211-220.
- Chodurek E. et al. (2002) Pyrolytic methylation in GC-MS analysis of short-chain fatty acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* (in Druck)
- Gryczka-Suchy R. (2002) Profile krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w pierzgarach pszczelich. Praca magisterska , Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny.
- Marewicz E. (1994) Skin cultures for transplantology and biotechnology. *Post. Biol. Kom.*, 21, (supl.3), 73-87.
- Drukąła J. (2001) Cell cocultures in skin reconstruction for clinical applications. *Post. biol. kom.* 28,(supl.16) 97-110.
- Mirowski M., Bartkowiak J. (2000) DNA microarrays in biomedical studies. *Post. biochem.*, 46, 272-281.
- Linkiewicz A., Filipecki M. (2001) From differential gene expression to cDNA clone - a review of methods for identification of genes with variable level of transcription. *Post. biochem.*, 47, 253-263.