

N° D'ORDRE : 11/2011-M/GP

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI-BOUMEDIENE

FACULTE DE GENIE MECANIQUE ET DE GENIE DES PROCEDES



MEMOIRE  
PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER  
EN : GENIE DES PROCEDES  
SPECIALITE : TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE

PAR : M<sup>ELLE</sup> DRISS MERIEM

SUJET

**Implication du stress oxydatif dans la cytotoxicité du diclofénac-Na,  
un anti-inflammatoire non stéroïdien, dans les cellules VERO**

*- Etude à l'aide d'un antioxydant, la quercétine*

Soutenue publiquement le 26/09/2011, devant le jury composé de :

M <sup>r</sup> Daoued Kamel	Professeur à l'USTHB	Président de jury
M <sup>me</sup> Djerdjouri Bahia	Professeur à l'USTHB	Directrice de Mémoire
M <sup>me</sup> Belkebir Aicha	Maître de conférence A à l'USTHB	Examinatrice
M <sup>me</sup> Khelil Malika	Maître de conférence A à l'USTHB	Examinatrice
M <sup>r</sup> Benkaci_Ali Farid	Maître de conférence A à l'USTHB	Examinateur

## Remerciements

Les recherches qui ont fait l'objet de ce travail ont été effectuées dans le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene en collaboration avec le laboratoire de contrôle qualité et virologie de l'institut pasteur de Dely Brahim.

J'aimerais que les membres du jury trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements

Madame le Professeur. **DJERDJOURI Bahia** de m'avoir accueillie dans son laboratoire et conseillée dans la réalisation de mon travail de magister, tout en me laissant une grande liberté. Je la remercie de la confiance qu'elle m'a accordée.

**M<sup>er</sup> DAOUD KAMEL** d'avoir bien voulu juger cette thèse et accepter de présider le jury.

**M<sup>me</sup> BELKEBIR AICHA** pour avoir pris de son temps pour examiner ce travail.

**M<sup>me</sup> KHELIL Malika** pour avoir aimablement accepté d'examiner ce travail.

**M<sup>er</sup> BENKACI-ALI Farid** qui a bien voulu examiner ce travail.

**M<sup>me</sup> TOUABTI, M<sup>er</sup> SEGHOUANI ET M<sup>me</sup> AIT SAID** du laboratoire de contrôle qualité et virologie de l'institut pasteur, pour leur aides pendant la réalisation de ce travail.

Un très grand remerciement à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes Parent, qui me sont les personnes les plus chères, et les plus précieux au monde, pour leurs amour, leur éducation, leur soutient morale et financier ainsi que leur courage et sacrifices. Je vous remercie et que Dieu vous protège

Mes très chère sœurs Soumia et Assia

Mes très chers frères, Mehdi, Youcef et Daoued

Toute ma famille

Toutes mes amies : Ouissem, Amina, Imen....

Mon fiancé Rafik pour leur soutient morale

## Résumé

*Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)* sont produites spontanément, en petites quantités et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants endogènes. Toute rupture d'équilibre de la balance pro-oxydants (ROS)/antioxydants, va entraîner une agression appelée *stress oxydatif*. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines inflammatoires, exposition environnementale à des facteurs peroxydants, toxicité médicamenteuse...

Cette étude consiste à évaluer l'effet cytotoxique de Diclofénac-Na induit par la production excessive des radicaux libres (ROS) et aussi mettre en évidence l'efficacité du traitement antioxydant (la quercétine) en vue de réduire la toxicité en captant ces radicaux libre.

Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus, illustrent l'efficacité de ce traitement non seulement vis-à-vis les radicaux libres mais aussi vis avis le système de défense cellulaire

Le stress oxydatif touche l'ensemble des tissus et des métabolismes et de ce fait participe à un grand nombre de pathologies (inflammation, maladies cardiovasculaires et cancers).

Il est donc important d'être capable de déceler et suivre ce phénomène, notamment afin d'évaluer l'efficacité des traitements antioxydants.

## ملخص

يتم إنتاج الأصناف المتفاعلة للأكسجين (ريوس) بشكل طبيعي في كميات صغيرة وبشكل مستمر داخل مؤسساتنا الخلوية. إن الحفاظ على مستوى المنظمات غير السامة للخلايا (ريوس) يتم توفيرها من قبل الأنظمة المضادة للأكسدة الذاتية. فإن أي اختلال التوازن في ميزان للأصناف المتفاعلة للأكسجين (ريوس) / المواد المضادة للأكسدة، يؤدي الى اختلال ميزان الاكسدة للمؤسسة الخلوية وحدوث توتر اكسدي. قد يكون لهذا الخلل أصول مختلفة (التهابات، والتعرض عوامل بيئية إلى و عوامل سمية الدواء

الهدف من هذا العمل هو دراسة التأثيرات السامة المصاحبة لاستعمال دس كلوفيتاك صوديوم من خلال تحفيز الخلايا لانتاج كميات كبيرة من الاصناف المتفاعلة للاكسجين(ريوس) كما قمنا باتيات اهمية استعمال علاج وقائي بمضادات الاكسدة الطبيعية(كورستين) من اجل خفض شدة التاتيرات السامة للدواء عت طريق تطبيق الاصناف المتفاعلة للاكسجين(ريوس)

النتائج التطبيقية التمس تحصلنا عليها تبين نجاعة العلاج الوقائي المختار (كورستين) وذلك بالنسبة الأصناف المتفاعلة للأكسجين وكذلك بالنسبة للأنظمة المضادة للأكسدة الذاتية

## Abstract

The reactive oxygen species (ROS) are produced naturally in small quantities and continuously within our organization. Maintaining a level of non-cytotoxic ROS is provided by endogenous antioxidant systems. Any disruption of equilibrium in the balance pro-oxidants (ROS) / antioxidants, will lead an attack called oxidative stress. This imbalance may have various origins inflammatory, environmental exposure to peroxidizing factors, drug toxicity ...

This study is to assess the cytotoxic effect of diclofenac-Na induced by excessive production of free radicals (ROS) and also highlight the efficacy of antioxidant (quercetin) to reduce toxicity by trapping free radicals such .

The experimental results we obtained, illustrate the effectiveness of this treatment not only vis-à-vis the free radicals but also with the opinions cellular defense system .

Oxidative stress affects all tissues and metabolisms and therefore participates in many pathologies (inflammation, cardiovascular diseases and cancer).

It is therefore important to be able to detect and monitor this phenomenon, in particular to assess the effectiveness of antioxidant treatments.

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
<b>CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique.....</b>	<b>4-26</b>
1. Les cellules VERO.....	4
2. Les ROS et le stress oxydatif.....	4
2.1. Différentes formes de métabolite de l'oxygène (ROS).....	5
2.2. Sources des ROS.....	6
2.2. 1- Sources exogènes des ROS.....	6
2.2. 2- Sources endogènes des ROS.....	7
A-Anion superoxyde.....	7
A.1- Le complexe NADPH oxydase.....	8
A.2- Le système xanthine -xanthine oxydase.....	8
A.3- La mitochondrie.....	9
A.4- Les autres systèmes producteurs d'anion superoxyde.....	10
B- Monoxyde d'azote (NO).....	10
B.1 - Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO).....	10
2.3- Réactivité des dérivés de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote.....	11
2.3.1- Dérivés de l'anion superoxyde.....	11
2.3.2- Dérivés du monoxyde d'azote.....	12
2.3.3- Dérivés mixtes de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote.....	12
3. Systèmes Antioxydants.....	13
3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	13
3.1.1- Superoxyde dismutases (SOD).....	13
3.1.2- Catalase.....	14
3.1.3- Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR).....	14
3.1.4- Thioredoxine (TRX).....	15
3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	15
3.2. 1- Les oligoéléments.....	15
3.2. 2- Le glutathion.....	16
3.2. 3- Les vitamines E et la vitamine C.....	16
3.2. 4- LA Provitamine A.....	16

3.2. 5-Ubiquinones et cytochrome c de la chaîne respiratoire.....	17
3.2. 6-Les flavonoïdes .....	17
3.2.6.1-Propriétés des flavonoïdes.....	18-19
4. Les dommages cellulaires .....	20
4.1. La Peroxydation lipidique .....	20
4.2. L'Oxydation des protéines.....	20
4.3. Les dommages de l'ADN .....	21
4.4. Activation du pore de transition de perméabilité.....	21-22
5. Les anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS).....	23
5.1-Effets pharmacodynamiques des AINS.....	24
5.1.1-Effet anti-inflammatoire.....	24
5.1.2- Effet antalgique.....	24
5.1.3-Effet antipyrétique.....	24
5.2- Le diclofénac-Na.....	25-26

**Chapitre 2. Matériel et méthodes.....27-33**

1-Matériel.....	27
2- Méthodes.....	27
2.1- Culture cellulaire et évaluation de la biomasse .....	27
2.2- Contrôle de la viabilité cellulaire.....	27
2.3- Etude de l'effet du diclofénac-Na sur la viabilité des cellules VERO.....	28
2.3.1- Traitement des cellules VERO par le diclofénac-Na :.....	28
2.3.2- Effet des concentrations croissantes de diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire.....	29
2.3.3- Effet du temps d'incubation sur la cytotoxicité du diclofénac-Na .....	29
2.3.4- Etude de l'intégrité membranaire par la mesure de l'activité lactate déshydrogénase.....	29
2.4- Effet du diclofénac-Na sur la production d'anions superoxyde par les cellules VERO.....	30
2.4.1- Dosage des anions superoxyde dans le surnageant des cellules VERO traitées par le diclofénac-Na .....	30
2.5- Effet du diclofénac-Na sur la production de Monoxyde d'azote (NO) par les cellules VERO (dosage de nitrite).....	31

2.6- Dosage de malonaldehyde (MDA) marqueur de la peroxydation des lipides membranaires.....	31
2.7-Dosage de glutathion réduit.....	32
3-Etude de l'effet de la quercétine sur la toxicité du diclofénac-Na.....	33
3.1- Préparation des échantillons.....	33

**CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....34**

3.1- Etude de l'activité cytotoxique du diclofénac-Na sur les cellules VERO.....	34
3.1.1-a Effet dose de diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire.....	34
3.1.1-b Effet du temps de traitement et des concentrations de diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire.....	35
3.1.2- Etude de l'intégrité membranaire par la mesure du relargage du lactate déshydrogénase (LDH).....	36
3.1.2.1- Effet des concentrations croissantes de diclofénac-Na sur la LDH.....	36
3.1.2.2-Effet de la quercétine sur le relargage du lactate déshydrogénase par les cellules VERO.....	37
3.1.2.3- Effet de la quercétine sur le relargage de la LDH par les cellules VERO traitées avec des concentrations croissantes de diclofénac-Na.....	38
3.1.3- Effet du diclofénac-Na sur la production d'anions superoxyde par les cellules VERO.....	39
3.1.3.1-Production d'anions superoxyde par les cellules VERO stimulé au PMA.....	39
3.1.3.2- Effet de la quercétine sur la production d'anions superoxyde par les cellules VERO.....	40
3.1.3.3- Effet de la quercétine sur la production d'anions superoxyde par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes de diclofénac-Na.....	41
3.1.4- Effet du diclofénac-Na sur la production de Monoxyde d'azote (NO) par les cellules VERO.....	42
3.1.4.1- Effet de la quercétine sur la production de monoxyde d'azote par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes du diclofénac-Na.....	44
3.1.4.2- Effet de la quercétine sur la production de monoxyde d'azote par les cellules VERO.....	45

3.1.5- Effet du diclofénac-Na sur la peroxydation lipidique au niveau des membranes des cellules VERO.....	46
3.1.5.1- Effet des concentrations croissantes du diclofénac-Na sur les taux de MDA produits par les cellules VERO.....	46
3.1.5.2- Effet de la quercétine sur les taux de MDA produits par les cellules VERO traités par des concentrations croissantes du diclofénac-Na.....	47
3.1.5.3- Effet de la quercétine sur les taux de MDA produits par les cellules VERO.....	48
3.1.6- Evaluation du système antioxydant dans les cellules VERO par la mesure de GSH.....	49
3.1.6.1- - Effet des concentrations croissantes du diclofénac-Na sur les taux de GSH produits par les cellules VERO.....	50
3.1.6.2- Effet de la quercétine sur les taux de GSH produits par les cellules VERO en présence de concentration croissante de diclofénac-Na.....	50
3.1.6.3- Effet de la quercétine sur les taux de GSH produits par les cellules VERO..	51
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>52-64</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>66</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>81</b>

## ABRÉVIATIONS

AA	acide arachidonique
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Arg	arginine
ATP	adénosine triphosphate
COX	cyclooxygénase
DAG	diacylglycérol
Dic-Na	diclofénac de sodium
DP ERK	récepteur de PGD <sub>2</sub> extracellulaire signal regulated kinase.
GDP	guanosine diphosphate
GMP	guanosine monophosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid endothelium
eNOS	nitric oxide synthase
EO	explosion oxydative
EP	récepteur de PGE <sub>2</sub>
FAD	flavine adenine dinucléotide
fMLP	N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine
FP	récepteur de PGF <sub>2</sub>
GSH	glutathion réduit
GTP	guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
IR	infra-rouge
iNOS	inductible nitric oxide synthase
IL 1-β	interleukine 1β
IL-8	interleukine 8

## **INTRODUCTION GENERALE**

Une espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) est un radical oxygéné ( $O_2\cdot^-$ ,  $\cdot OH$ ) ou une molécule pouvant produire des ROS. Ces Espèces chimiques très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de l'organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques.

Dans les conditions physiologiques, la production de ROS reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène capté par la respiration. Elle est indispensable à l'organisme en participant à divers processus vitaux tels que la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes et le fonctionnement de certaines enzymes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et la destruction par apoptose de cellules tumorales.

Cependant, cette production de ROS peut être amplifiée de façon excessive par différents mécanismes physiopathologiques comme l'inflammation ou des facteurs environnementaux (tabac, alcool, médicament, rayons gamma ou ultra-violets...) conduisant au stress oxydatif par déséquilibre de la balance prooxydant/antioxydant. La cellule ne contrôle alors plus cet excès de ROS qui va engendrer de nombreux dégâts cellulaires, à l'origine du processus de vieillissement et des pathologies humaines (Diabète, Alzheimer, Parkinson, psoriasis, cancers et sida).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les médicaments les plus prescrits pour traiter les symptômes de nombreuses maladies inflammatoires. Toutefois, l'utilisation prolongée de concentrations thérapeutiques d'AINS ou la prise d'une seule dose supra thérapeutique, provoque des altérations histologiques et fonctionnelles au niveau des organes cibles. Ce sont les effets secondaires, indissociables des effets thérapeutiques des AINS (Somasundaram et Coll., 2000; Basivireddy et Coll., 2003 ; Basivireddy et Coll., 2004).

Les manifestations toxiques des AINS ont été corrélées à l'inhibition de la production des prostaglandines (PG) cytoprotectrices, synthétisées par la cyclooxygénase 1 (COX1) constitutive. L'efficacité des AINS à réduire les symptômes de l'inflammation (œdème, douleur et fièvre) résulte de l'inhibition sélective de l'isoforme induite COX2, qui intervient dans les processus inflammatoires (Brooks et Coll., 1999 ; Mardini et Coll., 2001). La COX2 est également exprimée de manière constitutive dans certains tissus comme le rein (Steinmeyer, 2000).

Cependant, la dichotomie COX1/COX2 a été remise en question. Les effets secondaires néfastes attribués aux AINS, résulteraient de leur index thérapeutique et de la balance de l'expression COX1/COX2 dans ces tissus.

Des travaux plus récents ont montré le rôle majeur des mitochondries dans la toxicité des AINS, par la production excessive de ROS (Brzozowski et Coll., 2001; Bassivireddy et Coll., 2004).

## **OBJECTIFS DE RECHERCHE**

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier,

Dans une première partie, la cytotoxicité du Diclofénac-Na (principe actif) in vitro sur la lignée cellulaire VERO (cellules fibroblastiques de rein de singe vert) traduite par la production excessive des radicaux libres (ROS).

Dans la deuxième partie, mettre en évidence l'efficacité du traitement antioxydant (la quercétine) en vue de réduire la toxicité du Diclofénac-Na en captant ces radicaux libre.

La première partie du manuscrit est une revue bibliographique sur le stress oxydatif, induit par un anti-inflammatoire non stéroïdien, le diclofénac-Na sur une lignée cellulaire, VERO (cellules fibroblastiques de rein de singe vert). Les complexes enzymatiques impliqués dans la production des ROS, leur régulation et leur rôle dans l'induction des dommages tissulaires sont décrits.

La deuxième partie décrit les protocoles expérimentaux réalisés, les résultats expérimentaux obtenus, leurs discussions, ainsi que la conclusion et les perspectives.

## CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique

### 1. Les cellules VERO

Les cellules VERO sont des cellules de type épithélial issues de reins de singe vert d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*) (Macfarlane et Sommerville, 1969). Ce sont des cellules normales non cancéreuses (Phonnok, 2008), qui présentent une phase exponentielle de croissance et entrent en différenciation spontanée dès qu'elles atteignent la confluence. Les VERO ont conservé les caractéristiques de différenciation, comme la capacité d'inhibition de contact, l'intégrité des chromosomes dont le nombre reste diploïde et la croissance en monocouche. La culture des cellules VERO est obtenue par passages en série effectués tous les 3 à 4 jours. Les cellules en culture sont adhérentes. Elles sont décollées du support par action de la trypsine et continuent de se développer de façon régulière (Freshney, 1987).

Les cellules VERO sont utilisées pour la production ou le contrôle de vaccins viraux (Crill et Roehrig, 2001; Balamurugan et Coll., 2006). Ces cellules ont été utilisées dans plusieurs études portant sur l'optimisation des milieux de culture (Nahapetian et Coll., 1986), pour l'étude de phénomènes métabolique ou cellulaire (Huang et Coll., 1997) et pour l'étude de la toxicité de certaines molécules pharmacologiques comme les venins et les toxines (Giron et Coll., 2005; Bouaziz et Coll., 2006).

### 2. Les ROS et le stress oxydatif

Un radical libre est une substance chimique (atome ou molécule) qui possède un électron non apparié, ce qui lui confère une grande instabilité et une forte réactivité (Juurink ; 1997).

La formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est contrôlée dans l'organisme, par les systèmes antioxydants physiologiques intra et extracellulaires. C'est l'homéostasie redox, évaluée par le taux de glutathion réduit intracellulaire (GSH). Ce taux résulte principalement de la vitesse de réduction du glutathion oxydé (GSSG) par la GSH réductase, aux dépens du peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le stress oxydatif résulte de la perturbation de l'homéostasie redox par une surproduction de ROS ou par une défaillance des systèmes antioxydants.

Le stress oxydatif est proportionnel à l'intensité et à la durée de la production des ROS:

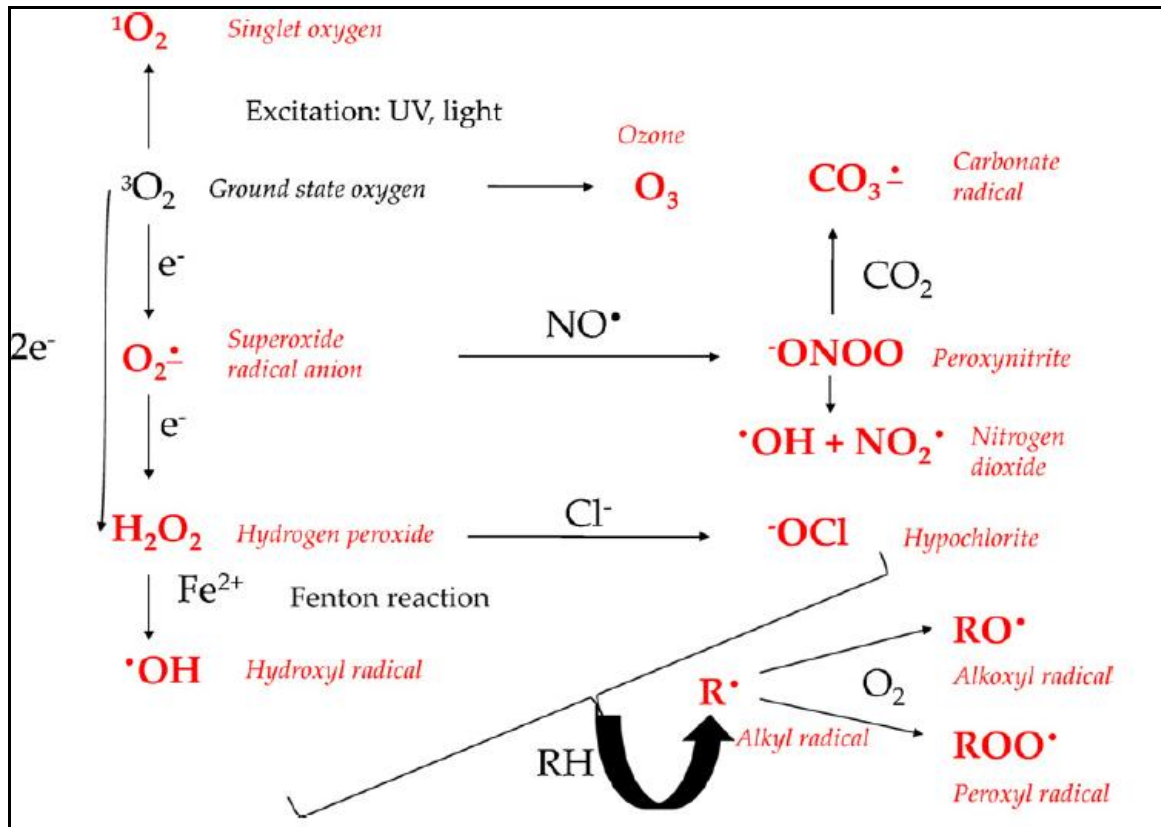
- une production transitoire, modérée et régulée de ROS correspond à un mécanisme de défense de la cellule lui permettant de détruire des cellules cancéreuses ou des microorganismes pathogènes.
- Lorsque cette production est récurrente ou chronique mais de faible intensité, la balance entre la production de ROS et les systèmes de détoxification de la cellule est perturbée de manière continue et conduit au stress oxydatif,
- Si la production de ROS est suffisamment importante pour altérer de manière irréversible des processus cellulaires vitaux, elle déclenche l'apoptose et la mort cellulaire. Lorsque les ROS sont générés en quantités massives, ils entraînent la nécrose cellulaire (Morel et Coll, 1999).

L'altération des systèmes antioxydants a été corrélée au développement de nombreuses pathologies inflammatoires notamment les rhumatismes, diabète, vieillissement des cellules, cancer et sida. Ainsi, déterminer le statut oxydatif d'un individu est une priorité en termes de prévention de ces maladies.

### **2.1. Différentes formes de métabolites de l'oxygène (ROS)**

Les ROS réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade. Dans certaines conditions métaboliques, la réduction de l'oxygène ( $O_2$ ) est incomplète et aboutit à la formation de radicaux libres. Le terme d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS est utilisé pour désigner un ensemble plus large de molécules :

- des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , les radicaux hydroxyles  $^{\bullet}OH$ , peroxyde  $ROO^{\bullet}$ , alkoxyde  $RO^{\bullet}$ )
- des dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide peroxyntreux ( $ONOOH$ ). l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) ou l'ozone ( $O_3$ ) fortement oxydants et/ou facilement convertis en radicaux.



**Figure 1: Les espèces réactives mixtes de l'oxygène et de l'azote**

Les espèces réactives de l'oxygène à l'état radicalaire sont désignées par un point symbolisant l'électron célibataire.

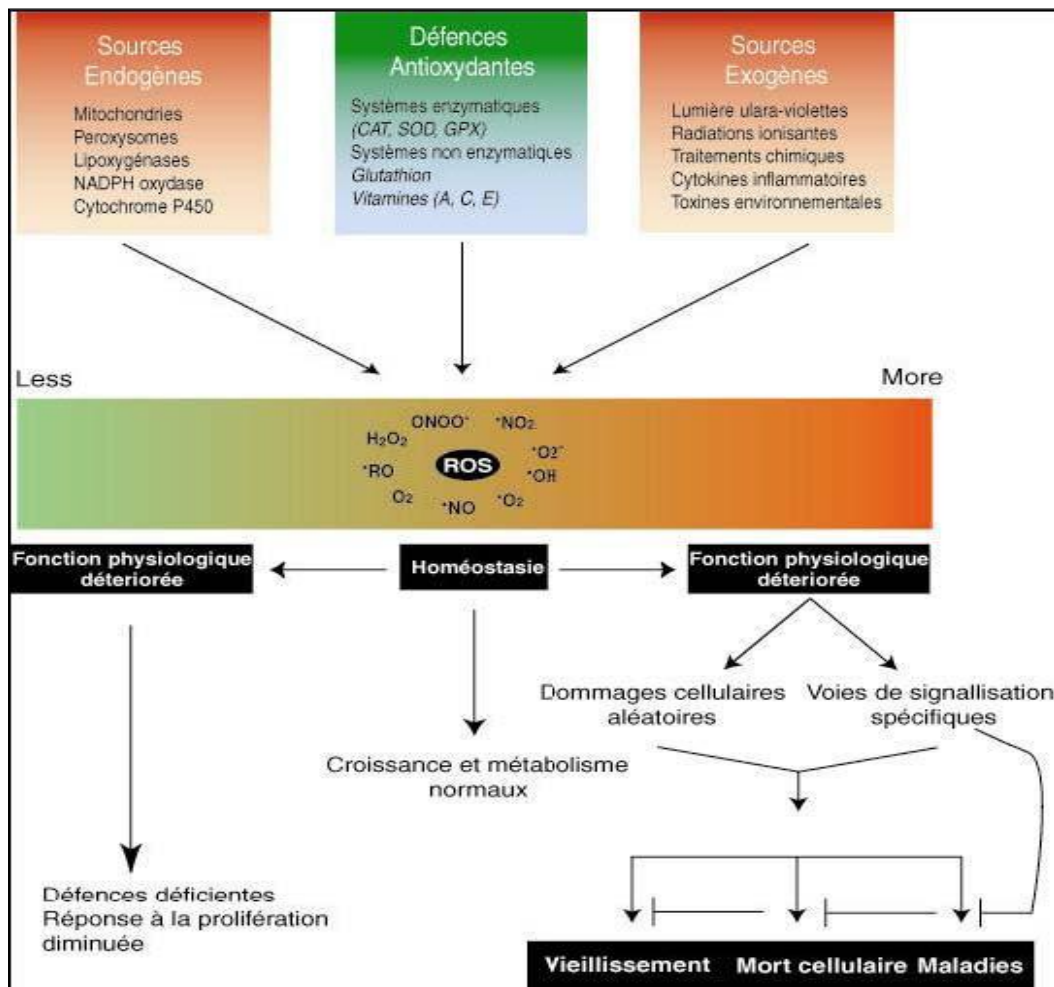
### 2.2.1. Sources des ROS

Des ROS sont produits par un grand nombre de mécanismes endogènes et exogènes.

#### 2.2.1.1.-Sources exogènes des ROS

Les sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène sont multiples et étroitement associées à la pollution de l'environnement (Demers, 1999).

- Rayonnements électromagnétiques (radiations  $\gamma$  et ultraviolettes)
- Produits chimiques & médicaments
- Ozone
- Fumées de combustion (cigarette, bois, déchets ménagers)



**Figure 2 : Sources, homéostasie et rôles physiopathologiques des radicaux oxydants (Finkel et Holbrook, 2000)**

## B- Sources endogènes des ROS

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont générées dans la cellule par plusieurs voies métaboliques.

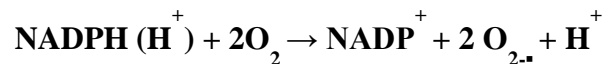
### 2.2.1- Anion superoxyde

Plusieurs systèmes enzymatiques impliquant des oxydases génèrent l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), dans les conditions physiologiques. Il s'agit de la NADPH oxydase des phagocytes (NOX2), la NADPH cytochrome P<sub>450</sub> réductase (CYP<sub>450</sub>), la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale (CR), le système xanthine/xanthine oxydase (XOR)

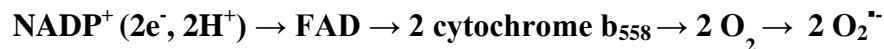
endothéliale et les enzymes d'oxydation de l'acide arachidonique, cyclooxygénases (COX) et lipoxygénases (LOX).

### 2.2.1.1- Biosynthèse de l'anion superoxyde

L' $O_2^{\cdot-}$ , précurseur des espèces réactives de l'oxygène est libéré par la réduction mono électronique de l'oxygène par un complexe NADPH oxydase actif (NOX2), aux dépens du NADPH (Cross et Segal, 2004 ; El Benna et Coll., 2005).



Le transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène est catalysé par le complexe NOX2 selon la séquence suivante :



Les  $O_2^{\cdot-}$  diffusent peu à travers les membranes. Ils ont un effet paracrine limité au phagosome. La NADPH oxydase (NOX) est un complexe multienzymatique membranaire. Cinq isoformes de NADPH oxydase (NOX-1 à NOX-5) et deux oxydases duales (duox1 et duox2), qui diffèrent par structure de leurs sous unités et l'activité de l'enzyme, sont distribuées dans les phagocytes et de nombreuses cellules eucaryotes (Lambeth, 2005).

### 2.2.1.2 - Le système xanthine -xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est présente principalement dans le foie et les intestins, mais aussi dans le sang, le cytosol et les cellules endothéliales. La xanthine oxydase est une métallo enzyme avec un molybdène formant le site actif. Elle existe dans les cellules sous la forme de xanthine déshydrogénase (XDH), dont l'oxydation des résidus SH produit la xanthine oxydase (XO), de manière réversible. La production d'anions superoxyde par le système xanthine-xanthine oxydase faible à l'état physiologique, est fortement amplifiée dans les conditions pathologiques de l'ischémie-reperfusion (Harrison, 2002).

Dans les conditions physiologiques, la XDH, utilise le  $NADP^+$  comme accepteur de deux électrons prélevés sur la xanthine, alors que la XO transfère ces électrons à deux molécules  $O_2$  et forme des anions superoxyde (McManaman et Bain, 2002).

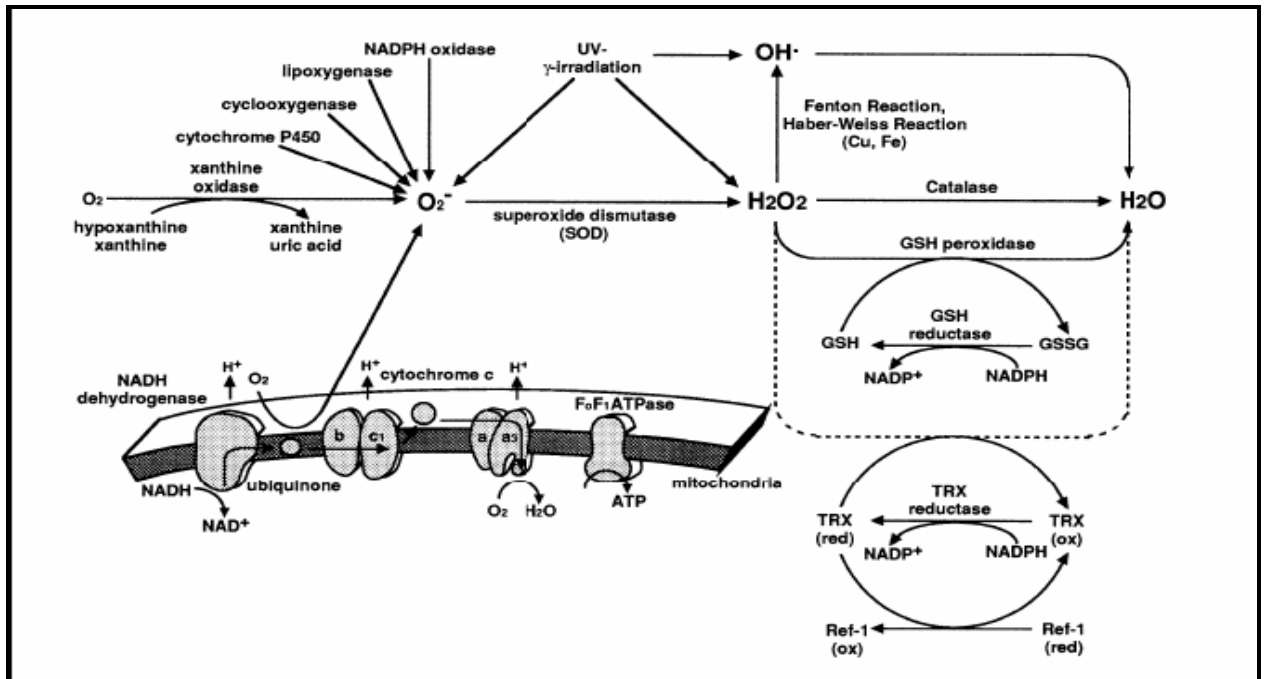


Figure 3 : Voies métaboliques des espèces réactives de l'oxygène (Nohl et Coll., 2005)

### 2.2.1.1.3- La mitochondrie

La chaîne respiratoire mitochondriale est une source importante de ROS. Ils sont libérés au cours de la respiration, par les complexes I et III (Kushnareva et Coll., 2002 ; Liu et Coll., 2002).

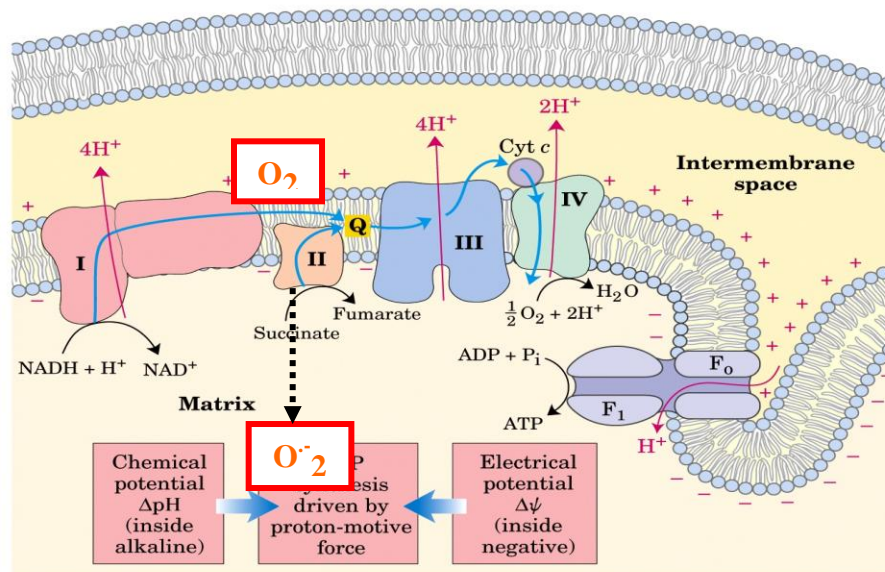


Figure 4 : Sites de production de ROS par la chaîne respiratoire

Les  $O_2^{\cdot-}$  sont libérés par les complexe I et III de la chaîne de transfert d'électrons de la chaîne respiratoire. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques comme la roténone (Rot) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I

#### **A.4- Les autres systèmes producteurs d'anion superoxyde**

##### ➤ **Lipooxygénases (LOX) et cyclooxygénases (COX)**

L'acide arachidonique libéré à partir des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A2 est transformé par les lipooxygénases (LOX) et cyclooxygénases (COX), respectivement en leucotriènes et prostaglandines. Cette synthèse met en jeu une série d'oxydation produisant des anions superoxyde.

##### ➤ **Cytochromes P<sub>450</sub> réductases (CYP P<sub>450</sub>)**

Les cytochromes P<sub>450</sub> réductases ou cytochromes P450 (CYP<sub>450</sub>), regroupent une famille d'enzymes associées au réticulum endoplasmique lisse, qui produisent des ROS au cours des processus de biotransformation des xénobiotiques, comme les médicaments.

#### **B- Monoxyde d'azote (NO)**

La cytotoxicité du NO est la conséquence de sa capacité à inhiber la glycolyse, le cycle de Krebs, la respiration mitochondriale et la synthèse d'ADN (Laubach et Coll., 1995).

##### **B.1- Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO)**

La synthèse du monoxyde d'azote (NO) est catalysée par les NO Synthases (NOS), un groupe d'enzymes hémiques de structure proche des cytochromes P<sub>450</sub>. Chez les mammifères, la famille des NO synthases est formée de trois isoformes, dont deux sont constitutives (e/cNOS endothéliale et NOS neuronale) et Ca<sup>2+</sup>-dépendantes. L'isoforme inductible (iNOS) est Ca<sup>2+</sup> indépendante (Hobbs et Coll., 1999).

La NO synthase catalyse l'oxydation de l'arginine en NG-hydroxy-L-arginine (NHA) au cours d'un transfert croisé d'électrons du NADPH, du domaine réductase d'une sous unité, vers le domaine oxygénase de l'autre sous unité.

La réduction ultérieure du NHA libère le NO et de la citrulline. Les électrons cheminent vers l'oxygène le long d'une chaîne redox NADPH (H<sup>+</sup>)/NADP<sup>+</sup> (-320 mV), FADH<sub>2</sub>/FAD (-280 mV), FMNH<sub>2</sub>/FMN (-274 mV) et Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> (-248 mV) (MacMicking et Coll., 1997 ; Alderton et Coll., 2001).

L'arginine endogène est renouvelée par l'arginosuccinate synthase. Elle est produite à partir de l'arginosuccinate par condensation de la citrulline et de l'aspartate. L'arginosuccinate est ultérieurement scindée en fumarate et arginine (Mori, 2000).

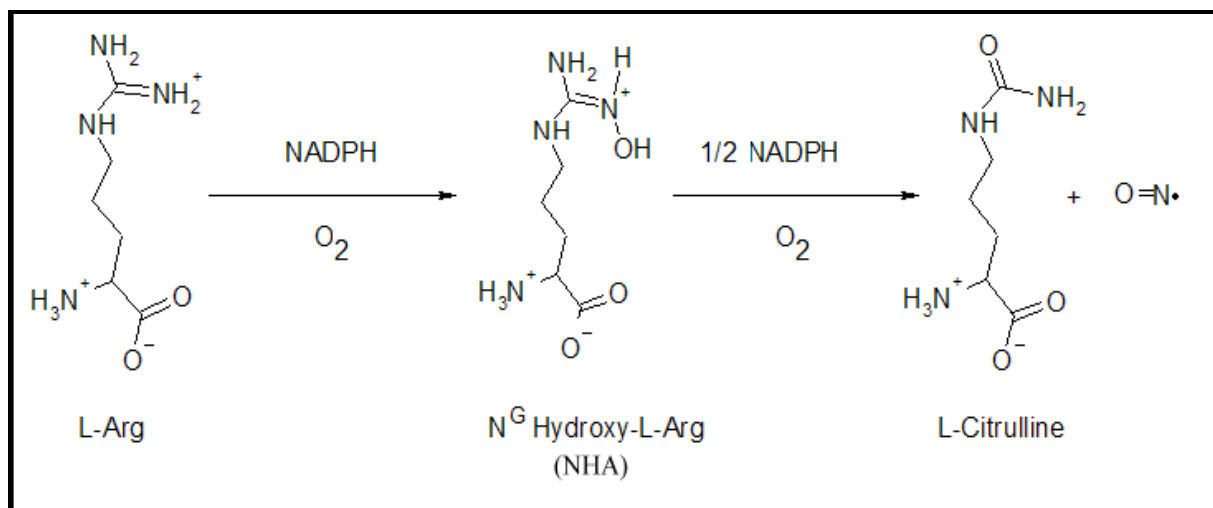
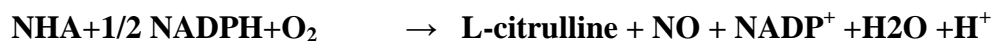


Figure 5 : Biosynthèse du NO à partir du substrat endogène, la L-arginine (Beckman et Coll., 1990 ; Stuehr et Coll., 2004)

## 2.3 - Réactivité des dérivés de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote

### 2.3.1- Dérivés de l'anion superoxyde

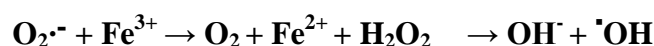
Les anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> sont spontanément protonés en HO<sub>2</sub><sup>-</sup> une forme plus réactive, ou dismutés en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et oxygène (O<sub>2</sub>), dans l'environnement acide du phagosome des phagocytes.

La dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ , catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) et la réduction de l' $O_2$  par les flavoprotéines oxydases cytosoliques, augmente les taux intracellulaires de  $H_2O_2$  (Massey, 1994 ; Fridovich, 1995).



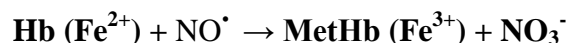
- Le radical hydroxyle  $\cdot OH$  représente la forme la plus réactive des ROS oxygénés. (Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Radi et Coll., 1991, Halliwell et Chirico, 1993).

Sa production est stimulée par la réduction du fer ferrique (réaction de Fenton Haber Weiss) (Halliwell et Gutteridge, 1984).



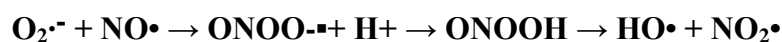
### 2.3.2 Dérivés du monoxyde d'azote

Le  $NO^{\cdot}$  est une molécule gazeuse instable oxydée spontanément en nitrite ( $NO_2^-$ ) en présence d' $H_2O$ . L'affinité du  $NO^{\cdot}$  pour l'hémoglobine est 100 000 fois plus importante que celle de l'oxygène. Le  $NO^{\cdot}$  transforme l'oxyhémoglobine ( $HbO_2$ ) en méthémoglobine (MetHb) inactive et libère parallèlement du nitrate ( $NO_3^-$ ) (Murphy et Noack, 1994).



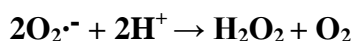
### 2.3.3 Dérivés mixtes de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote

Des taux élevés de  $NO^{\cdot}$  et  $O_2^{\cdot-}$  sont déversés dans les sites inflammatoires ou dans le phagosome, par les activités iNOS et NADPH oxydase activées. Leur cross talk génère un radical mixte, le peroxydinitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Comhair et Erzurum, 2002). L'anion peroxydinitrite,  $ONOO^-$  est un composé très oxydant des centres métalliques et des thiols. Il peut altérer les membranes cellulaires et les macromolécules biologiques, notamment l'ADN (Delbart, 2000).





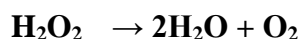
la dismutation en milieu acide de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Cossu et Coll., 1997) et protègent les membranes contre les radicaux  $O_2$ , NO et  $ONOO^-$ .



La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique, une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) sécrétée par les fibroblastes et les cellules gliales et active dans le milieu extracellulaire (Vamecq et Coll., 2004). La Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter membranaire (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001 ; Sturtz et Coll., 2001).

### 3.1.2- La catalase

La catalase présente dans de nombreux tissus est particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. C'est un tétramère dont chaque sous unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et la protège contre l'inactivation (Kirkman et Coll., 1999). Chez les Mammifères, la catalase est localisée dans les peroxysomes. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène :



La catalase permet également la détoxification de différents substrats, comme les phénols et les alcools par un couplage avec la réduction d'hydrogène



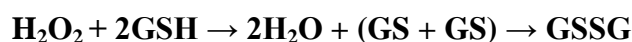
L'un des rôles antioxydants majeurs de la catalase est de diminuer la formation de radicaux hydroxyles générés par le peroxyde d'hydrogène (Fridovich, 1999).

### 3.1.3-Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD pour accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène. Lors de cette réaction deux molécules glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates et Coll., 1999; Powers et Lennon, 1999).

Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement

impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Mates et Coll., 1999 ; Nomura et Coll., 2000).



La glutathion réductase permet de régénérer le GSH à partir du GSSG en prélevant les électrons sur le NADPH. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.



### 3.1.5- Thioredoxine (TRX)

Les thioredoxines sont des protéines multifonctionnelles à groupements thiol (SH), impliquées dans le maintien de l'homéostasie redox. Elles agissent comme agents réducteurs principalement dans la réduction/détoxification des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, mais aussi dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Moran et Coll., 2001).

## 3.2- Les Systèmes antioxydants non enzymatiques

Plusieurs antioxydants non enzymatiques naturels ne sont produits par les organismes vivants ou apportés par l'alimentation. Leur pouvoir antioxydant réside dans leur capacité à piéger (scavenger) et neutraliser les radicaux libres,

### 3.2. 1- Les oligoéléments

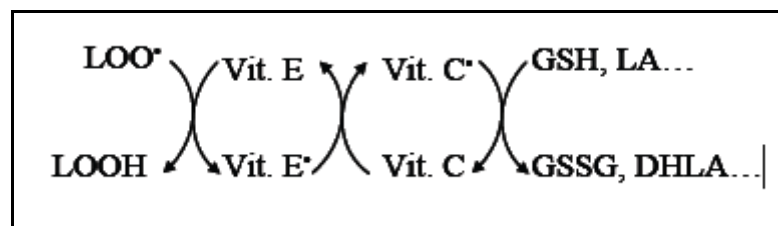
Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydatif. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale utilise du Mn, la SOD cytosolique du Cu et du Zn, la catalase utilise du Fe et la GPx, du Se. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro oxydante (réaction de Fenton Haber-Weiss).

### 3.2.2- Le glutathion

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (Power et Lennon, 1999 ; Packer et Coll., 1997). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydatif car plus le flux d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et Coll., 1992).

### 3.2.3- Les Vitamines E et C

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est intégrée au réticulum endoplasmique et aux membranes internes des mitochondries. L' $\alpha$  tocophérol restaure la structure des acides gras membranaires peroxydés par les ROS en cédant des atomes d'hydrogène aux ROS. La vitamine E contrôle l'activité de la 12-lipoxygénase (Cossu et Coll., 1997). La vitamine C hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut capter directement l' $\text{O}_2^-$  et l' $\text{OH}^\cdot$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Evans, 2000 ; Packer et Coll., 1997).



**Figure 7 : Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C.** (LOO•) : radical peroxyde lipidique, (LOOH) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide dehydrolipoïque.

### 3.2.4- La provitamine A

Le  $\beta$ -carotène est un piègeur non stœchiométrique d'oxygène singulet. Une seule molécule de pigment peut inactiver des centaines de molécules d'oxygène singulet.

L'énergie de l'oxygène singulet est utilisée pour transformer la forme cis du  $\beta$ -carotène en son isomère trans.

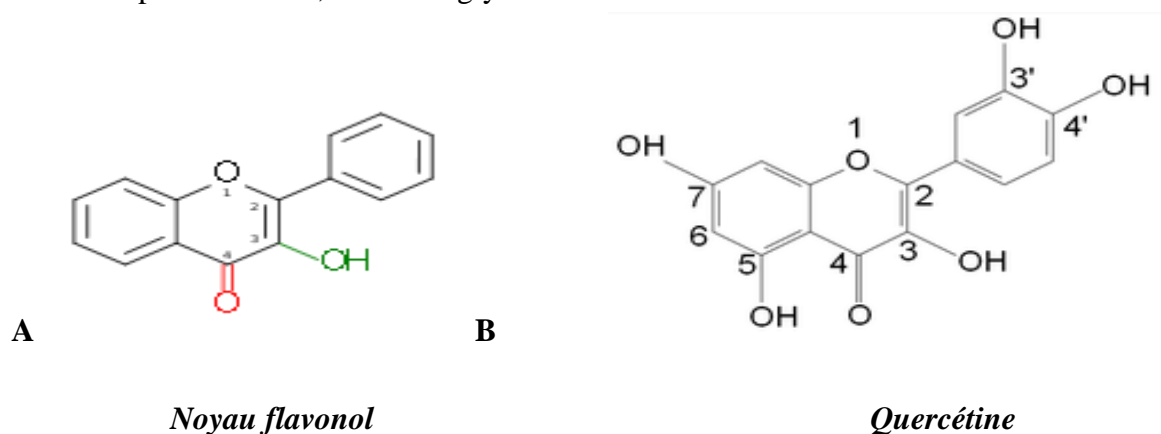
### 3.2.5- Ubiquinones et cytochrome c de la chaîne respiratoire

Les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouent un rôle fondamental dans la production de ROS, alors que le radical ubiquinol agit comme antioxydant (Power et Lennon, 1999). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy et régénère la vitamine E, ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Packer et Coll., 1997).

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre de l' $O_2^{\bullet-}$  qui s'échappe de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' $H_2O$  (Skulachev, 1998).

### 3.2.6- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules naturelles produites par les plantes supérieures. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils assurent la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV. Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau *Flavonol* ou *2-Phényle Chromone* portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.



**Figure 7.** Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C).

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. on les trouve en abondance dans de nombreuses familles à fleurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique).

### **3.2.6.1- Propriétés des flavonoïdes**

#### **a- Propriétés anti-inflammatoires et effets sur le système immunitaire**

Des travaux ont révélé que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoire (Da Silva et Coll., 1994 ; Galati et Coll., 1994 ; Read, 1995) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton et Elliott, 1996).

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Namgoong et Coll., 1994). La quercétine inhibe la prolifération des lymphocytes T. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Namgoong et Coll., 1994). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton et Drzewiecki, 1984).

#### **b- Propriétés antivirales et antibactériennes**

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale de cellules en culture. Une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte,
- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte,
- au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales,
- au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales.

Mucsi et Pragai en 1985 ont montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées.

Les flavonoïdes ont des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase ( L'ADN gyrase est une protéine spécifique des bactéries, qui est essentielle à la réplication de leur chromosome circulaire (Ohemeng et Coll., 1993). L'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *staphylococcus aureus* (Sato et Coll., 1995).

### **c- Propriétés anti-carcinogènes**

L'action antitumorale de la quercétine est expliquée par son interaction avec le complexe calcium-calmoduline (Nishino et Coll., 1984, qui jouerait un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeur.

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques (Wattenberg, 1983), notamment en stimulant les systèmes de détoxification (Bu Abbas et Coll., 1995).

Les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes (Obermeier et Coll., 1995).

### **d- Propriétés antioxydantes et impact sur la peroxydation lipidique**

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (Fuhrman B. et Coll., 1995). En fait, leur activité antiradicalaire nécessite:

- la structure ortho-diphénolique du cycle B, qui est essentielle à l'activité des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé,
- la double liaison 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo-, qui est responsable de la délocalisation d'électrons stabilisant le radical aroxy,
- les hydroxyles en positions 3 et 5 qui permettent une activité anti radicalaire maximale.

Les flavonoïdes et en particulier la quercétine qui présente les trois éléments de structure décrits ci-dessus, sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique (Erben-Russ et Coll., 1987).

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique (Yoshino et Coll., 1994), ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (Galvez et Coll., 1995). Enfin, les flavonoïdes possédant une structure catéchol sur le cycle B, et en particulier la (+)-catéchine, sont des piègeurs de l'oxygène singulet, une forme réactive de l'oxygène.

Les flavonoïdes agissent principalement comme antioxydants primaires, en stabilisant les radicaux peroxydes mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives (ion superoxyde, radical OH<sup>•</sup>, oxygène singulet), inhiber la lipoxygénase ou encore chélater les métaux (P. Sarni-Manchado et coll., 2006).

#### **4. Les dommages cellulaires**

Les dommages induits par les ROS sont principalement une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) de la mitochondrie.

##### **4.1. La peroxydation lipidique**

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona et Coll., 2000).

L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et Coll., 2004).

Elle produit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999).

Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonenal (4-HNE) sont des marqueurs de la peroxydation lipidique. Le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS (Echtay et Coll., 2003). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de ROS.

##### **4.2. L'oxydation des protéines**

Les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002 ; Peng et Coll., 2000). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $\text{Cu}_2^+$  et le  $\text{Fe}_2^+$ , peuvent casser les liaisons peptidiques et modifier la chaîne protéique. Elles peuvent modifier des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements conduisent à une modification structurale des protéines (dénaturation) dont les conséquences sont majeures comme la perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases (Levine, 2002).

L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur (Welch, 1992). Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig et Nosek, 1997).

#### **I.4.3. Les dommages de l'ADN**

Les mitochondries sont les principales sources cellulaires de ROS, mais aussi leurs premières cibles. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydatif qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter et Coll., 1988). Les mécanismes explicatifs proposés sont l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, sa localisation proche de la membrane interne, de faibles mécanismes de réparations et une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Ames et Coll., 1993 ; Cann et Wilson, 1983 ; Cortopassi et Coll., 1992 ; Richter et Coll., 1988).

Le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (Sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire. L'excès de ROS provoque de nombreuses mutations mitochondriales, à l'origine du vieillissement (Beckman et Ames, 1998 ; Wong et Cortopassi, 1997).

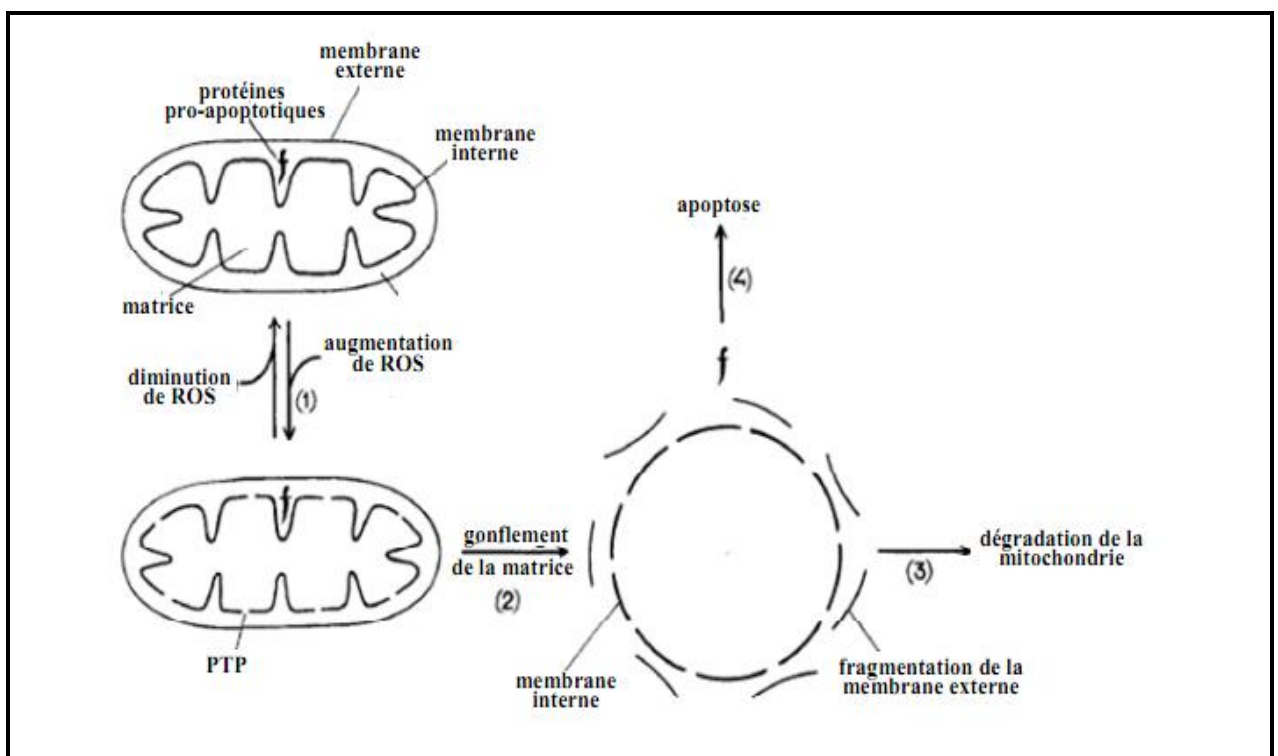
Les dommages oxydatifs de la mitochondrie provoquent principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais aussi induisent aussi la mort cellulaire par apoptose avec ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP).

#### **I.4.4 Activation du pore de transition de perméabilité**

Le pore de transition de perméabilité PTP est un complexe multiprotéique formé nombreuses protéines dont le VDAC : Voltage Dependent Anion Channel), l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator), la cyclophiline D (Green et Reed, 1998 ; Zamzami et Coll., 1998) et le complexe I (Fontaine et Coll., 1999).

La ciclosporine A, inhibiteur de référence du PTP, retarde le processus d'apoptose (Fontaine et Coll., 1998) confirmant le rôle clé du PTP dans la mort cellulaire.

L'ouverture du PTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs, entraînant la rupture de la membrane externe et la sortie de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF (Apoptose Inducing Factor)). Le cytochrome c relargué interagit avec Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1) et la pro-caspase 9, conduisant à l'activation de la cascade des caspases qui déclenche l'apoptose (Chen et al, 2003). L'ouverture du PTP induit par les ROS serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (Kowaltowski et al, 2001).



**Figure 8 : Production de ROS, ouverture du PTP et apoptose. D'après Skulachev, 1996. (1)** L'augmentation de la production de ROS entraîne l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). **(2)** Un déséquilibre osmotique entre la matrice et l'espace intermembranaire se crée, ayant pour conséquence le gonflement de la matrice et la fragmentation de la membrane externe **(3)** La mitochondrie est alors dégradée (sélection mitochondriale). **(4)** Les protéines pro-apoptotiques sont libérées dans le cytosol initiant une cascade de réactions qui aboutit à l'apoptose.

## 5. Les anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou AINS forme la classe thérapeutique la plus utilisée aussi bien en automédication qu'en prescription dans des syndromes aigus ou des affections chroniques, notamment rhumatismales.

Les AINS sont des acides faibles (Dangoumau et Coll., 2006). Ils forment un groupe chimique hétérogène de médicaments répartis en oxicams (piroxicam), pyrazolés, dérivés de l'acide carboxylique qui comprennent les salicylés (aspirine, paracétamol), propioniques (ibuprofène, kétoprofène), anthraniliques (acide niflumique) et dérivés de l'acide acétique qui regroupent les acides phénylacétiques (diclofénac).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les médicaments les plus prescrits pour traiter les symptômes de nombreuses maladies inflammatoires. Toutefois, l'utilisation prolongée de concentrations thérapeutiques d'AINS ou la prise d'une seule dose supra thérapeutique, provoque des altérations histologiques et fonctionnelles au niveau des organes cibles. Ce sont les effets secondaires, indissociables des effets thérapeutiques des AINS (Somasundaram et Coll., 2000; Basivireddy et Coll., 2003 ; Basivireddy et Coll., 2004).

Les manifestations toxiques des AINS ont été corrélées à l'inhibition de la production des prostaglandines (PG) cytoprotectrices, synthétisées par la cyclooxygénase 1 (COX1) constitutive. L'efficacité des AINS à réduire les symptômes de l'inflammation (œdème, douleur et fièvre) résulte de l'inhibition sélective de l'isoforme induite COX2, qui intervient dans les processus inflammatoires (Brooks et Coll., 1999 ; Mardini et Coll., 2001). La COX2 est également exprimée de manière constitutive dans certains tissus comme le rein (Steinmeyer, 2000).

Les AINS possèdent des propriétés complexes, associant des effets anti-inflammatoire, antipyrétique et analgésique, qui résultent de l'inhibition réversible des cyclooxygénases (COX). La sélectivité d'un AINS vis-à-vis des deux iso enzymes a permis une classification fonctionnelle des AINS en 4 groupes (Lipsky et Coll., 2000, Riendeau et Coll., 2001).

Elle est définie par le rapport des concentrations de la molécule inhibant 50 % des activités COX1 et COX2. Le modèle de référence du rapport de sélectivité COX1/COX2 est celui du sang humain total (Warner et Coll., 1999 ; Giuliano et Coll., 2001; Blain et Coll., 2002).

- Les AINS inhibiteurs non sélectifs des COX (AINS classiques), inhibent les 2 isoenzymes de manière réversible, sans sélectivité significative aux concentrations thérapeutiques (indométacine, ibuprofène et aspirine à forte dose).
- Les AINS inhibiteurs sélectifs de la COX1. Le représentant type est l'aspirine, qui possède une activité anti-agrégant à faible dose. L'aspirine inhibe de manière irréversible les COX1, par l'acétylation d'une sérine proche du site cyclooxygénase (Kalgutkar et Coll., 1998).
- Les inhibiteurs préférentiels de la COX2 : acide niflurique, salicylate de sodium, diflunisal, piroxicam, méclofénamate, sulindac, diclofénac, nimésulide, célécoxib, méloxicam.
- Les inhibiteurs sélectifs de la COX2 : coxibs (Dangoumau et Coll., 2006)

### **5.1. Effets pharmacodynamiques des AINS**

Trois effets principaux résultent de la diminution de la formation de prostaglandines : anti-inflammatoire, antipyrétique et analgésique.

#### **5.1.1- Effet anti-inflammatoire**

Il résulte de l'atténuation des phénomènes inflammatoires impliquant aux phases précoces, les prostaglandines (vasodilatation, oedème, douleur), sans effet sur les autres phases, en particulier les processus entraînant des lésions tissulaires chroniques.

#### **5.1.2 - Effet antalgique**

Les AINS atténuent la douleur d'origine périphérique, au départ des influx nociceptifs (les prostaglandines sensibilisent les terminaisons nerveuses centripètes aux hormones locales algogènes, notamment la bradykinine, libérées lors de l'inflammation). Un effet direct sur la moelle épinière est possible.

#### **5.1.3- effet antipyrétique**

Les pyrogènes provoquent la sécrétion par les macrophages d'interleukine qui augmentent la température corporelle. Les AINS réduisent la fièvre par abaissement du seuil du thermostat hypothalamique par inhibition des prostaglandines de l'hypothalamus des prostaglandines.

- L'effet anti-agrégant plaquettaire résulte de l'inhibition de la formation des thromboxanes. L'aspirine en inhibant de manière irréversible la COX1 présente l'activité anti aggrégante la plus efficace (Dangoumau et Coll., 2006).

Les propriétés anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des AINS sont dues à l'inhibition de la COX -2, alors que leurs effets néfastes sont attribués probablement à l'inhibition de la COX1. Tous les AINS classiques inhibent les deux COX à des degrés différents, conduisant à une diminution de la synthèse des PG (PGE1, PGE2, PGF<sub>α</sub>, PGF<sub>2α</sub>) (La Neuville et Coll., 1994 ; Warner et Coll., 1999). Cette dichotomie COX1/COX2 a été remise en question. Les effets secondaires néfastes attribués aux AINS, résulteraient de leur index thérapeutique et de la balance de l'expression COX1/COX2 dans ces tissus.

Par ailleurs, les mitochondries jouent un rôle majeur dans la toxicité des AINS, par la production excessive de ROS (Brzozowski et Coll., 2001; Bassivireddy et Coll., 2004).

### 5.3. Le Diclofénac-Na

Le diclofénac-Na (dénomination commune internationale, DCI) est un anti-inflammatoire non stéroïdien, dérivé de l'acide phénylacétique (MW 318,13 ; C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>NNaO<sub>2</sub>; [2-[(2,6-dichlorophényl) amino] phényl] acétate de sodium). Il appartient au groupe chimique des acides arylcarboxyliques (PKa 4,0) avec des activités antalgiques équivalentes (Grace et Coll., 2000). Le diclofénac-Na induit une inhibition compétitive et temps dépendant des cyclooxygénases 1 et 2. Son affinité pour la COX2 est supérieure à celle de COX1 avec un pouvoir inhibiteur pour la COX2 (IC<sub>50</sub>=0.038 μM), deux fois plus important que pour la COX1 (IC<sub>50</sub>= 0.075μM) (Pairet et Coll., 1996).

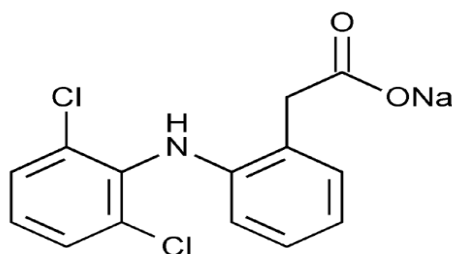


Figure 10 : Diclofénac sodium

Le diclofénac se lie par son groupement carboxylique avec les chaînes latérales des résidus Tyr<sup>386</sup> et Ser<sup>530</sup> du site actif des COX, ce qui provoque un changement de conformation lent et réversible de l'enzyme (Rowlinson et Coll., 2003; Hinz et Brune, 2002). Il est complètement absorbé. Il est lié à plus de 99% de l'albumine sérique. Son volume de distribution chez un sujet sain est de 0,12 à 0,17 l/kg et celui du compartiment central est de 0,04 l/kg (Todd et Coll., 1988).

Le diclofénac-Na est principalement hydroxylé par une iso enzyme de la sous-famille CYP2C du cytochrome P450 hépatique en 4-OHdiclofénac. D'autres métabolites sont retrouvés comme les 3'-OHdiclofénac, 5-OHdiclofénac et 4'-5-OHdiclofénac (Masubuchi et Coll., 2001). Moins de 1% du principe actif est éliminé dans les urines sous forme inchangée (Todd et Coll., 1988). Les métabolites hydroxylés du diclofénac sont transformés en glucuronides et sulfates conjugués représentent 60% de la dose de médicament éliminée dans les urines, dont 20 à 30% de 4'-OHdiclofénac. L'excrétion biliaire de ce métabolite représente 10 à 20%. Chacun des autres métabolites excrétés dans l'urine représente 10 à 20% de la dose.

Les conjuguats inchangés du diclofénac récupérés dans l'urine et la bile représentent respectivement 5 à 10 % et moins 5% de la dose ingérée. In vivo, environ 90% d'une dose orale de diclofénac est excrétée dans un délai de 96 heures. La demi-vie d'élimination moyenne du médicament inchangé est de 1 à 2 heures (Todd et Coll., 1988).

Certains métabolites du diclofénac peuvent être réactivés et devenir toxiques. Les quinonéimines formées par le cytochrome P450 de la sous famille CYP2C9, à partir du 5-OH diclofénac et les acyles glucuronides formés par les acyles transférases sont les principaux inducteurs de l'hépatotoxicité (Galati et Coll., 2002).

## **CHAPITRE 2 : Matériel et méthodes**

### **1- Matériel**

#### **Réactifs**

Tous les réactifs utilisés dans notre étude sont de grade analytique (Sigma, Merck, Prolabo...). Les principaux réactifs pour la culture de cellules proviennent de : Milieu de culture RPMI-1640 (Invitrogen); Milieu minimum essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Sigma), Bleu trypan, Sérum de veau fœtal (SVF, Sigma), Antibiotiques : Pénicilline, Streptomycine ; Trypsine, Diméthylsulfoxyde (DMSO); L-glutamine (Eurobio).

### **2 Méthodes**

#### **2.1. Culture cellulaire et évaluation de la biomasse**

Les cellules VERO sont mises en culture dans du milieu DMEM supplémenté par du sérum de veau fœtal SVF à 10%, 200 mM de glutamine et d'antibiotiques (100 UI / ml de pénicilline et 100 µg / ml de streptomycine). Les cultures sont maintenues à 37 °C en atmosphère humidifiée avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont collectées après trypsination et la biomasse évaluée par comptage sur cellule de Malassez au microscope optique.

Lorsque les cellules VERO sont à confluence (arrêt de la division cellulaire due à l'inhibition de contact), elles sont rincées par 5 ml de DMEM sans sérum et trypsinées à raison avec 10 ml de trypsine-EDTA pour un flasque. La réaction a lieu pendant 2 min sous agitation douce et en vérifiant sous microscope que les cellules sont décollées. L'excès de trypsine est éliminé après 2 min. Le flasque est remis dans l'étuve à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 10 min jusqu'au décollement total des cellules. Les cellules récupérées sont comptées sur cellule de Malassez.

#### **2.2- Contrôle de la viabilité cellulaire**

Le bleu de trypan est un colorant qui entre dans les cellules mais qui entraîne un mécanisme d'exclusion le rejetant dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place.

Ainsi, une cellule vivante expulsera le colorant et restera incolore tandis qu'une cellule morte ne pourra le rejeter et restera bleue. Au microscope optique les cellules vivantes sont donc différenciées des cellules mortes (Tennant, 1964). La viabilité cellulaire a été mesurée par le test d'exclusion au bleu de Trypan.

Un aliquote de 200µl de la suspension cellulaire est mélangé à un volume égal de la solution de Bleu Trypan à 0,4 % et incubé à 37°C pendant 5 min. Une goutte de la suspension est montée sur une cellule Malassez et observée au microscope à phase inverse à un grossissement de x 200 pour une numération cellulaire.

% de cytotoxicité = [(nombre total de cellules mortes/ nombre total de cellules) x 100]

% de viabilité = [(nombre total de cellules viables / nombre total de cellules) x 100]

## **2.3- Etude de l'effet du diclofénac-Na sur la viabilité des cellules VERO**

### **2.3.1- Traitement des cellules VERO par le diclofénac-Na**

Les cellules VERO sont distribuées dans les puits de microplaques de culture de 24 puits (10<sup>5</sup> cellules/ml) et mises en culture dans de milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 200 mM de glutamine additionné d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg / ml de streptomycine). Elles sont traitées avec des concentrations croissantes de principe actif de diclofénac-Na (0, 50, 75, 100, 2500 et 5000 µM), puis incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub> à des temps croissants (2, 4, 6 et 72 h). Les surnageants de cultures sont prélevés à la fin de l'expérimentation et conservés à -20°C pour des dosages biochimiques.

Afin d'évaluer l'effet toxique du diclofénac-Na, des tests de cytotoxicité ont été réalisés en déterminant l'effet du temps de contact et l'effet de concentrations croissantes de diclofénac-Na sur la viabilité des cellules VERO.

### **2.3.2- Effet des concentrations croissantes de diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire**

Les cellules VERO sont exposées à des concentrations croissantes de diclofénac-Na pendant 24 h. Un aliquote de 200µl de la suspension cellulaire est mélangé à un volume égal de la solution de Bleu Trypan à 0,4 % et incubé à 37°C pendant 5 min. Une goutte de la suspension cellulaire est montée sur une cellule Malassez et observée au microscope à phase inverse à un grossissement de x 200 pour une numération cellulaire.

### **2.3.3- Effet du temps d'incubation sur la cytotoxicité du diclofénac-Na**

Afin d'évaluer l'effet de diclofénac-Na sur la viabilité des cellules  $2 \times 10^5$  cellules/ml sont mises en culture en présence de concentrations croissantes de principe actif de diclofénac-Na (0, 50, 75, 100, 2500 et 5000 µM), dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub> à des temps croissants allant (2, 4, 6 et 72 h). Les plaques sont incubées à 37°C dans une étuve à 5 % de CO<sub>2</sub>.

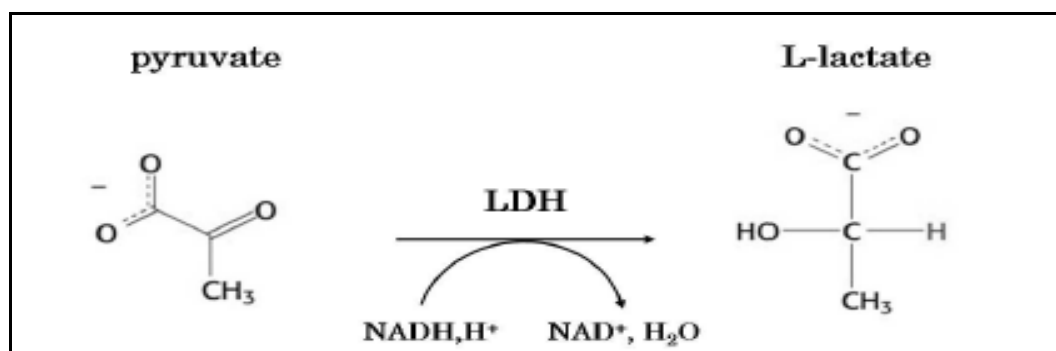
Les surnageants de cultures sont prélevés à la fin de l'expérimentation et conservés à -20°C pour des dosages biochimiques. La viabilité cellulaire est estimée par le bleu de trypan.

### **2.3.4- Etude de l'intégrité membranaire par la mesure de l'activité lactate déshydrogénase**

Cette méthode mesure l'intégrité membranaire. Les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire et notamment l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle au taux de mortalité cellulaire.

La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture est effectuée par un dosage enzymatique colorimétrique (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Legrand et Coll., 1992).

La LDH transforme le lactate en pyruvate, en réduisant le NAD en NADH.



**Figure 11 : Activité lactate déshydrogénase**

Le mélange réactionnel contient 100 µl de surnageant, 2.4 ml du lactate (0.33%) dans du tampon phosphate 10 mM, pH 9 et 100µl de NAD 6mM. Le mélange est incubé à 30°C. L'activité de la LDH est évaluée par une cinétique en mesurant l'absorbance du mélange réactionnel par spectrophotométrie à 339 nm, tous les 30 secs.

#### **2.4- Effet du diclofénac-Na sur la production d'anions superoxyde par les cellules VERO**

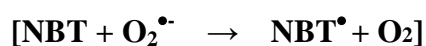
Ces dosages mesurent la production globale des formes réactives de l'oxygène par les cellules activées avec différents stimulants solubles (PMA...). La réduction du nitrobleu de tétrazolium par les anions superoxyde donne un précipité de formazan de coloration bleu quantifiable par la mesure de l'absorbance à 560nm.

##### **2.4.1- Dosage des anions superoxyde dans le surnageant des cellules VERO traitées par le diclofénac-Na**

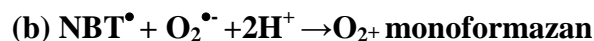
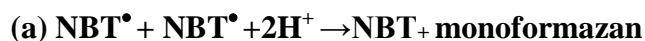
Le dosage des anions superoxyde est effectué sur les cellules VERO récupérés après 24h de traitement par les différentes concentrations de diclofénac-Na.

Le mélange réactionnel contient 880 µl de la suspension cellulaire, 100µl de NBT et 20 µl de solution PMA. L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée par spectrophotométrie à 540 nm chaque 5 min pendant 30 min.

Le mécanisme de la réaction entre l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et le NBT est très complexe et quelques étapes proposées sont encore controversées. En fait, la réduction du NBT en monoformazan débute par la formation du radical tétrazolynile :



Ensuite, deux réactions sont possibles: la dismutation (a) ou la réduction du radical NBT<sup>•</sup> Par un deuxième anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (b). Dans les deux cas, il ya formation de monoformazan.



La réduction du NBT est mesurée à 560 nm et la quantité de NBT réduit est exprimée en µmol/min (coefficient d'extinction  $\epsilon=1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}/\text{sec}$ ) (Auclair et Voisin, 1984).

### **2.5- Effet du diclofénac-Na sur la production de Monoxyde d'azote (NO) par les cellules VERO (dosage de nitrite)**

L'activité de la NO synthase a été évaluée par le dosage des nitrites dans les surnageant récupérés de différents puits. Un volume de l'échantillon est incubé avec un même volume du réactif de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyle ethylènediamine dihydrochloride), pendant 20 min à température ambiante. Le taux de nitrites a été mesuré par spectrophotométrie à 550 nm (Sun et Coll., 2003, Devaux et Coll., 2001). Les résultats sont extrapolés sur une courbe étalon établie à partir d'une solution mère de nitrite de potassium 0.1mM.

Il s'agit d'une réaction de diazote en deux étapes dans laquelle les nitrites forment un seul diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthyléné diamine) (Grand et coll., 2001)

### **2.6- Dosage de malonaldehyde (MDA) marqueur de la peroxydation des lipides membranaires**

La peroxydation lipidique se produit suite à une libération d'espèces réactives de l'oxygène. Ce phénomène est évalué par un test quantitatif et colorimétrique utilisant l'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction, produite entre le malondialdehyde (MDA), un produit final de la peroxydation lipidique et deux molécules de TBA, repose sur la formation en milieu acide et à chaud d'un pigment rose avec un maximum d'absorbance à 532 nm (Zingarelli et Coll., 1999).

Les concentrations de MDA sont mesurées dans les surnageants des cellules VERO incubées à 37°C avec différentes concentrations de diclofénac-Na pendant 24 h. 100 µl du surnageant sont mélangés à 50 µl de dodecylsulfate sodium à 8,1 %, 375 µl d'acide

acétique 20 % et 375  $\mu\text{l}$  d'acide thiobarbiturique 0, 8 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 1 h, puis laissé à refroidir pendant 10 min dans un bain de glace.

La densité optique est par la suite mesurée à 532 nm et la quantité de MDA formée est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de  $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Les concentrations sont exprimées  $\text{nM}/10^5$  cellules ou en  $\text{nmol}/\text{ml}$ .

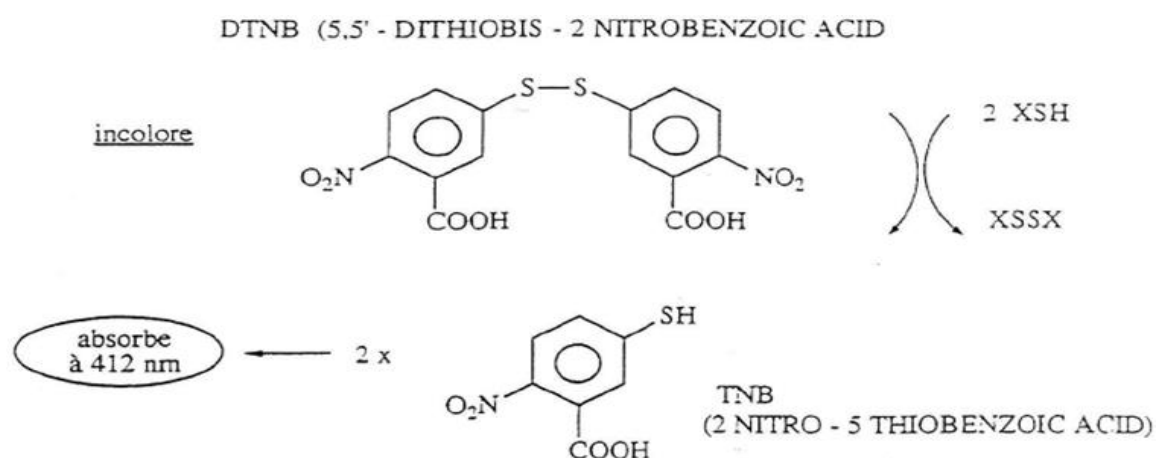
## 2.7. Dosage de glutathion réduit

L'estimation de glutathion réduit (GSH) a été réalisé selon la méthode d'Ellman (1959). Cette méthode est basée sur la formation d'une couleur jaune en présence d'acide dithionitrobenzoïque (Pandmanablan et coll., 2002).

La mesure du GSH se fait directement sur les surnageants. 150  $\mu\text{l}$  de chaque surnageant est incubé en présence de 300  $\mu\text{l}$  d'acide sulfosalicylique 5% dans de la glace pendant 1h, suivie d'une centrifugation à 3000g pendant 10 min à +4 °C.

100 $\mu\text{l}$  de chaque surnageant après centrifugation est mis en présence de 0.2 ml de DTNB (0.6 mM), 0.9 ml de tampon phosphate 0.2 mM, pH 8), 0.1 ml du chaque surnageant centrifugé, après 9 min la réaction sera suivie à 410 nm dans une cuve en quartz.

La concentration de GSH est déduite à partir du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon= 13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et exprimée en  $\mu\text{M}$  par mg de protéines (Soares et Coll., 2008).



**Figure 12.** Réaction chimique entre le DTNB et un composé sulfhydryle (Todorova, 2007).

### 3 – Etude de l'effet de la quercétine sur la toxicité du diclofénac-Na

#### 3.1- Préparation des échantillons

Dans cette partie nous allons travailler avec 3 microplaques, les cellules VERO ( $10^5$  cellules/ml) sont déposées dans les puits des microplaques de culture et mises en culture dans de milieu DMEM supplémenté de 5% de SVF décomplémenté, 200 mM de glutamine additionné d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). Toutes les cellules sont incubées à 37°C, dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 h.

Après 24 h, les cellules de la 1<sup>ère</sup> microplaque sont traitées par des concentrations croissantes du principe actif de diclofénac-Na (0, 50, 75, 100, 2500 et 5000µM), puis incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les cellules de la 2<sup>ème</sup> microplaque sont traitées par des concentrations croissantes d'un principe actif le diclofénac-Na (0, 50, 75, 100, 2500 et 5000µM) et avec 10µM de quercétine puis incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les cellules de la 3<sup>ème</sup> microplaque seront traitées par des concentrations croissantes de quercétine seule (0, 5, 10, 50, 75, 100µM), puis incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub>.

Le pouvoir anti-oxydant protecteur de la quercétine a été en quantifié par la mesure des marqueurs de toxicité (NO, 2O<sub>2</sub><sup>-</sup>, MDA, LDH et GSH), selon les protocoles décrits ci-dessus.

**CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

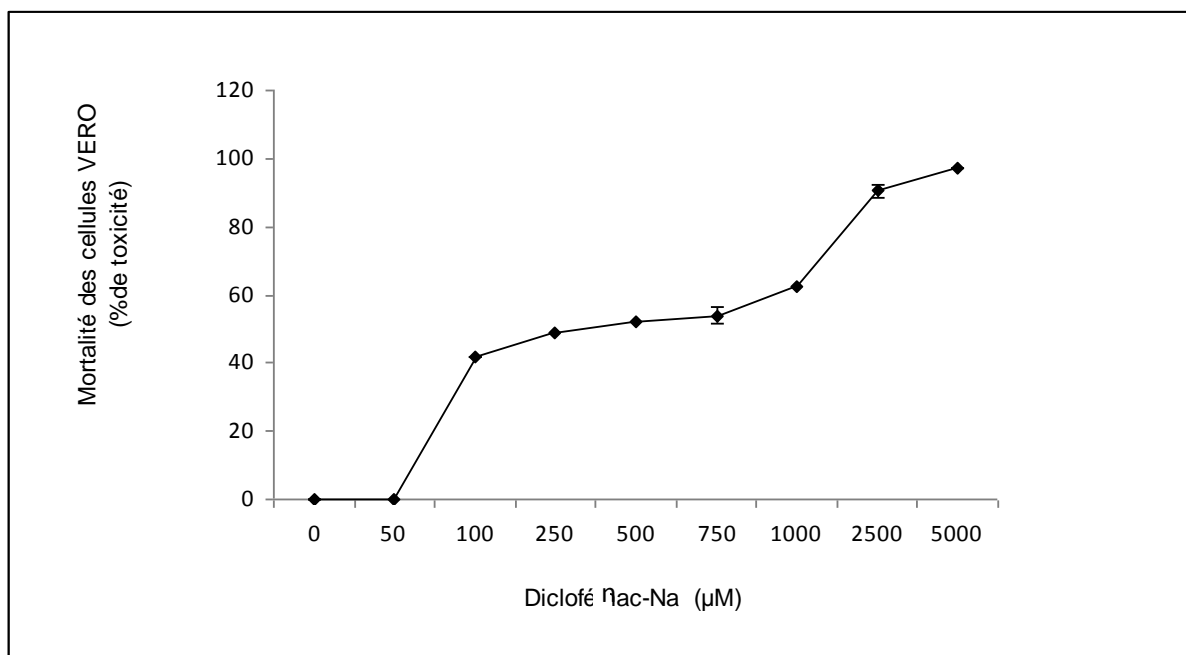
**3.1- Etude de l'activité cytotoxique du diclofénac-Na sur les cellules VERO**

Afin d'évaluer l'activité cytotoxique du diclofénac-Na sur les cellules VERO, nous avons mesuré le pourcentage de viabilité cellulaire ainsi que l'activité lactate déshydrogénase (LDH), un marqueur de lyse cellulaire.

**3.1.1- Effet dose du diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire**

Dans notre étude, la détermination de l'effet du diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire a été réalisée in vitro par l'incubation des cellules VERO avec des concentrations croissantes de diclofénac-Na. Les résultats obtenus montrent clairement que le diclofénac-Na a des concentrations élevées (250-5000 µM) induit une cytotoxicité temps et dose dépendante.

Le prétraitement des cellules VERO pendant 24 h, avec des concentrations croissantes de diclofénac-Na (0, 50, 75, 100, 2500 et 5000 µM), réduit la viabilité cellulaire de manière proportionnelle à la dose (Tableau 1 ; Figure 13).



**Figure 13. Effet cytotoxique dose du diclofénac-Na sur la viabilité des cellules VERO**

## 1.2 Effet du temps de traitement et des concentrations de diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire

Les pourcentages de lyse cellulaire ont été calculés pour les cellules VERO exposées dans leur milieu de culture à des doses croissantes de Diclofénac-Na après différents temps d'incubation. Les résultats cinétiques montrent des pourcentages de lyse qui varient entre 25% et 55% pour les cellules exposées pendant 6 h. Une activité cytotoxique maximale a été révélée au niveau des cellules après 24 h pour la dose la plus élevée (97,4% - 5000 $\mu$ M).

Ces résultats montrant ainsi une augmentation de la cytotoxicité temps dépendante des cellules VERO jusqu'à 24 h d'incubation et qui varie approximativement entre 41,66% à 97,4% sous l'effet de diclofénac-Na à des doses (50 $\mu$ M...5000 $\mu$ M). L'IC<sub>50</sub> est enregistrée pour des concentrations de l'ordre du millimolaire (Tableau 2 ; Figure 14).

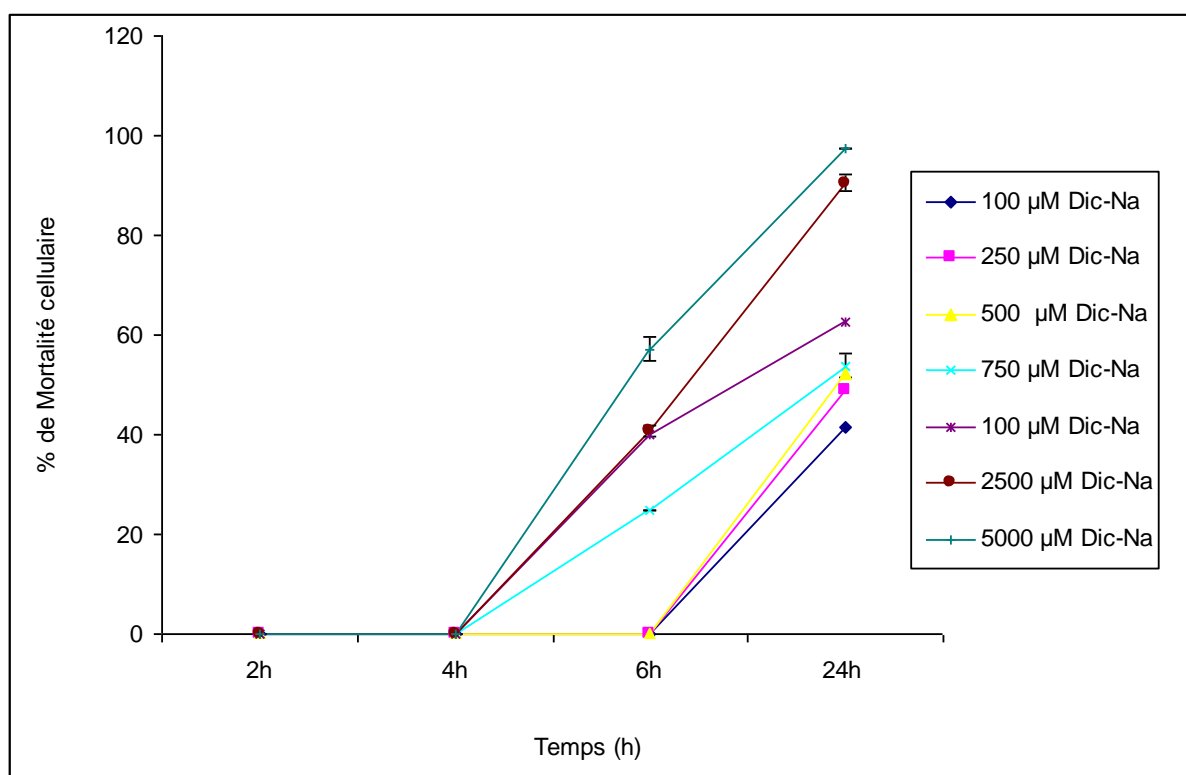


Figure 14. Effets cytotoxiques temps et dose du diclofénac-Na sur la viabilité des cellules VERO

### 1.3-Etude de l'intégrité membranaire par la mesure du relargage du lactate déshydrogénase (LDH)

Dans la suite de l'étude les effets ont été mesurés à 24 h.

#### 3.1.3.1- Effet des concentrations croissantes de diclofénac-Na sur la LDH

Le traitement des cellules VERO avec 50 et 75  $\mu\text{M}$  de diclofénac-Na après 24 h de culture augmente légèrement l'activité LDH mesurée dans les surnageants de culture. Des pourcentages faibles ont été mesurés ( $9.154\pm 0,52\%$ ,  $22.66\pm 0,44\%$ ) par rapport au témoin non traité qui représente une activité égale à 24.761 U/ml.

Les cellules VERO traitées avec 100, 250 et 500 $\mu\text{M}$ ) libèrent des quantités de LDH respectivement de  $32.21\pm 0,82\%$ ,  $35.17\pm 1,64\%$ ,  $38.61\pm 0,80\%$ , tandis que le traitement par 1000, 2500 et 5000 $\mu\text{M}$  de diclofénac-Na l'augmente de plus de quatre fois par rapport au témoin non traité. Les pourcentages respectifs sont de  $49.52\pm 1,13\%$ ,  $62.65\pm 1,21\%$ ,  $74.60\pm 0,19\%$ , mesurées par rapport au témoin non traité (Tableau 3 ; Figure 15).

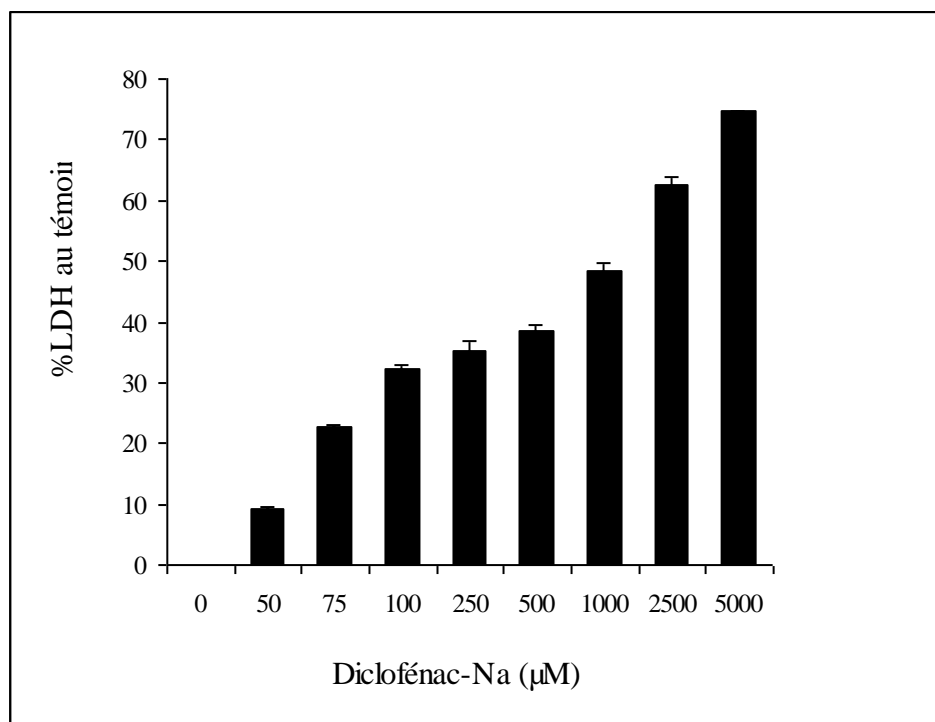


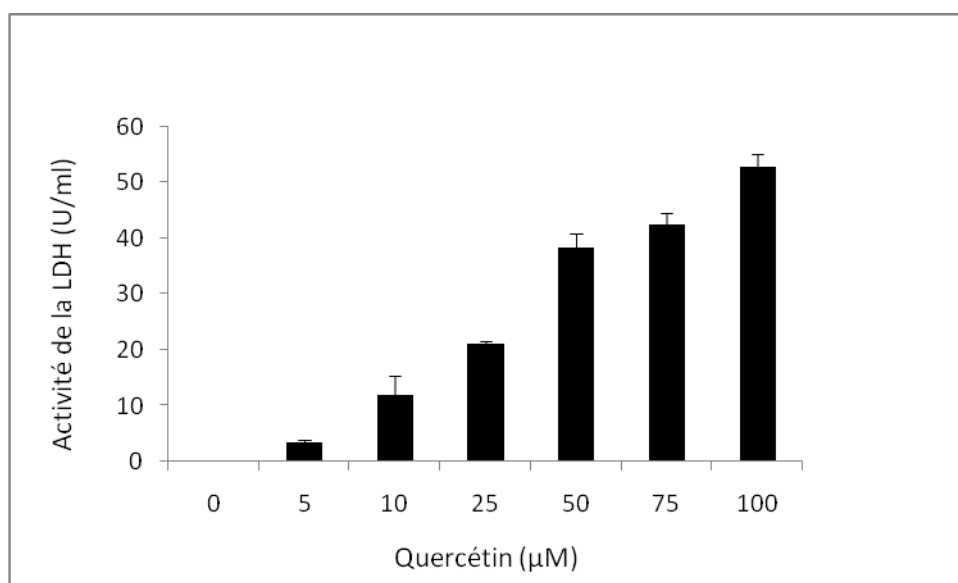
Figure 15 : Pourcentage de relargage du lactate déshydrogénase

L'augmentation de l'activité LDH est un indice de dommages de la membrane plasmique et perte de l'intégrité des membranes (Rao et Coll., 2001).

La libération de l'enzyme cytosolique dans les surnageants des cultures cellulaires en présence de concentrations croissantes de diclofénac-Na, indique une détérioration de la membrane cellulaire et la lyse des cellules VERO. Cette cytotoxicité serait probablement due à une action directe du diclofénac-Na sur les cellules.

### 3.1.3.2- Effet de la quercétine sur le relargage du lactate déshydrogénase par les cellules VERO

Le traitement des cellules VERO par des concentrations croissantes de quercétine (0, 5, 10, 25, 50 et 75 $\mu$ M) augmente l'activité LDH respectivement à près de 3.43%, 11.89 %, 24.24%, 38.44%, 42.515%, mesurée par rapport au témoin. Tandis que le traitement par 100  $\mu$ M de Quercétine augmente l'activité LDH à près de 52.9%, mesurée par rapport au témoin traité par le traiton X100 qui représente 100% LDH (Tableau5. Figure 16).

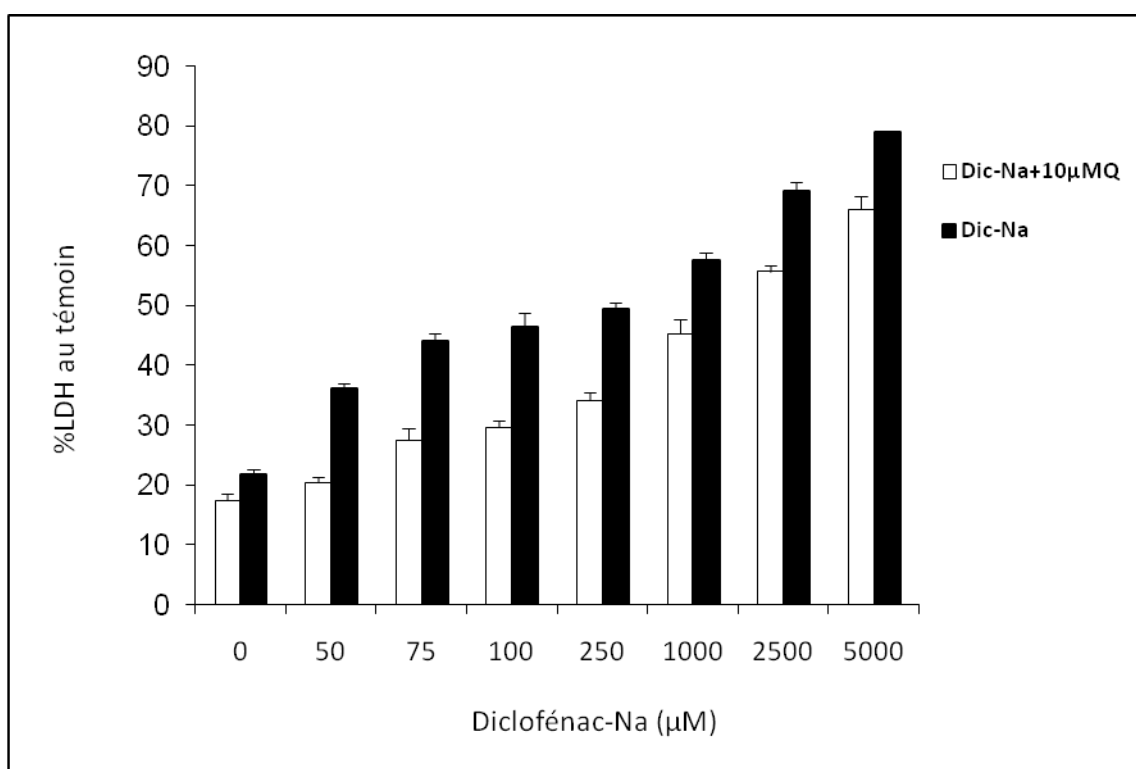


**Figure 16.** Effet de la Quercétine sur le relargage de la LDH

**3.1.2.3- Effet de la quercétine sur le relargage de la LDH par les cellules VERO traitées avec des concentration croissantes de diclofénac-Na**

Le traitement des celllules VERO avec des concentrations croissantes de diclofénac-Na (0, 50, 75, 100, 2500 et 5000  $\mu\text{M}$ ) en présence de 10  $\mu\text{M}$  de Quercétine, réduit fortement les taux de LDH relarguée dans le milieu de culture.

Les pourcentages de réduction respectifs sont de 41,13%, 53,82%, 45,82%, 57,37%, 69,53%, 74,04%, 78,93% chez les VERO traitées par le diclofénac-Na seul (Tableau 4 ; Figure 17).



**Figure 17. Effet de la Quercétine 10  $\mu\text{M}$  sur le relargage de la LDH par les cellules VERO en présence des concentrations croissantes de diclofénac-Na**

### 3.1.3-Effet du diclofénac-Na sur la production d'anions superoxyde par les cellules VERO

#### 3.1.3.1- Production d'anions superoxyde par les cellules VERO stimulées au PMA

La production d'anions superoxyde augmente progressivement en fonction du temps après stimulation des cellules VERO par le PMA 160 nM. La quantité d'anions superoxyde mesurée au temps 30 min est égale à  $97.92 \pm 2.65$  nM/ min/ $10^5$  cellules (100% de production). Dans l'intervalle des concentrations (50-250  $\mu$ M) de diclofénac-Na, le taux d'anions superoxyde diminue légèrement entre 10.997% et 11.93% comparé au témoin non traité.

Au contraire, les concentrations élevées de diclofénac-Na (500, 750, 1000, 2500 et 5000  $\mu$ M) réduit fortement les taux d'anions superoxyde, caractérisant une toxicité plus élevée dans cette zone de concentrations (Tableau 6 ; Figure 18).

La figure 18 représente les cinétiques de la production des anions superoxyde mesurés toutes les 5 min et pendant 30 min.

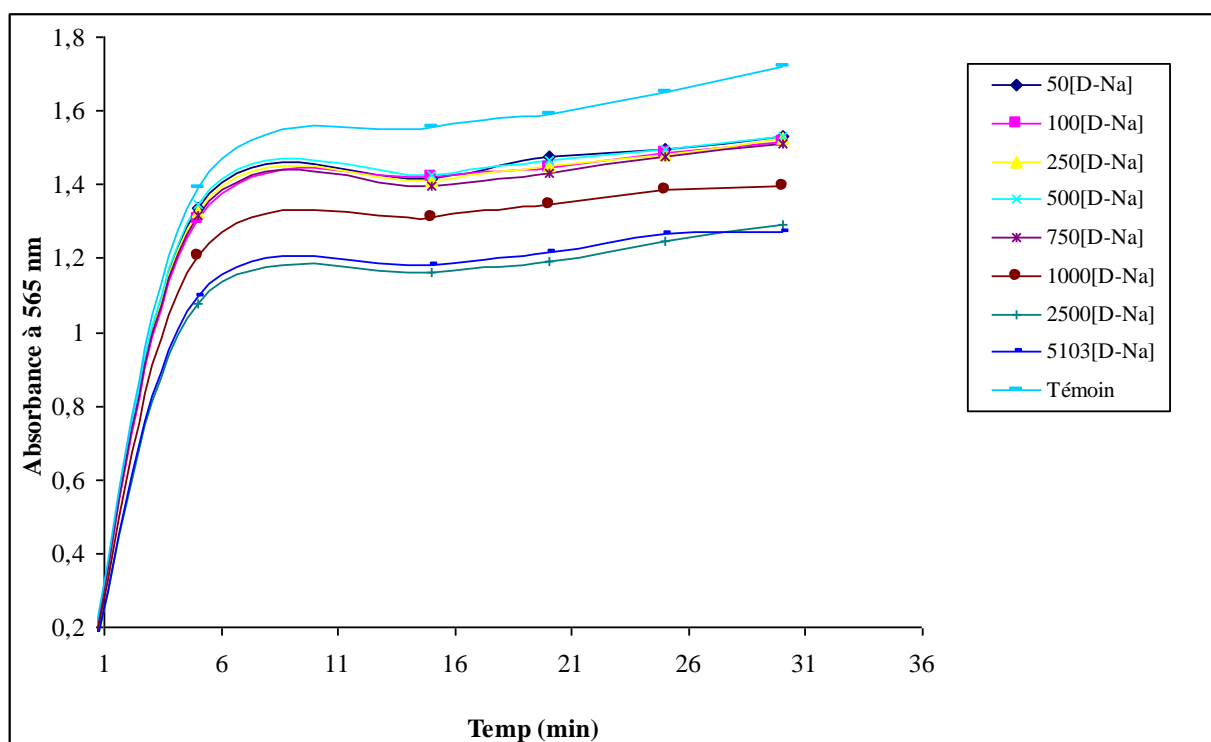
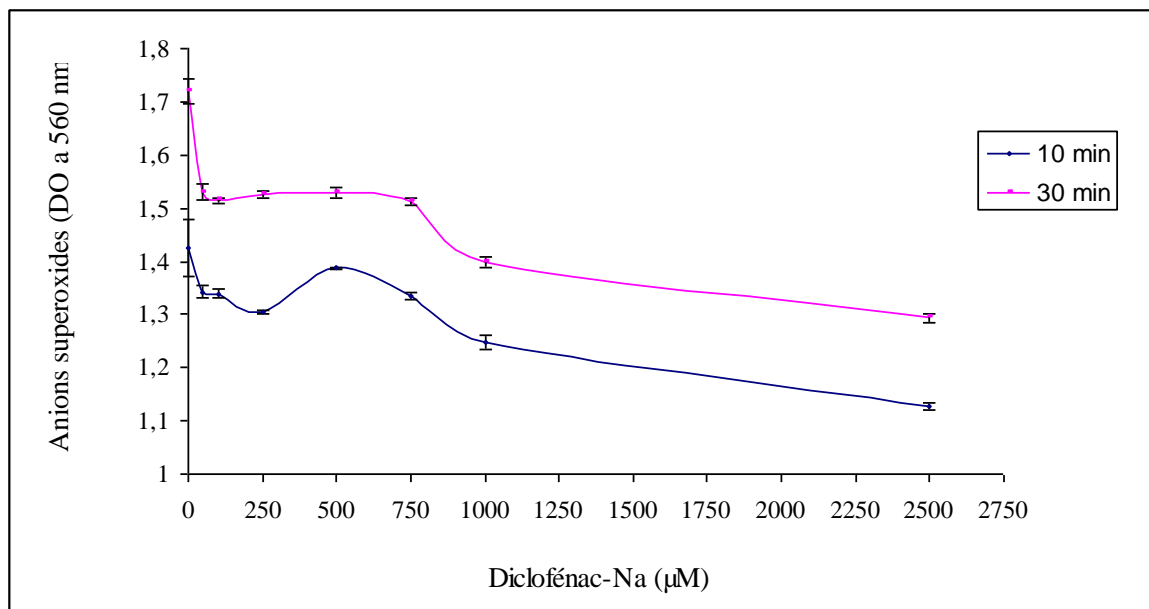


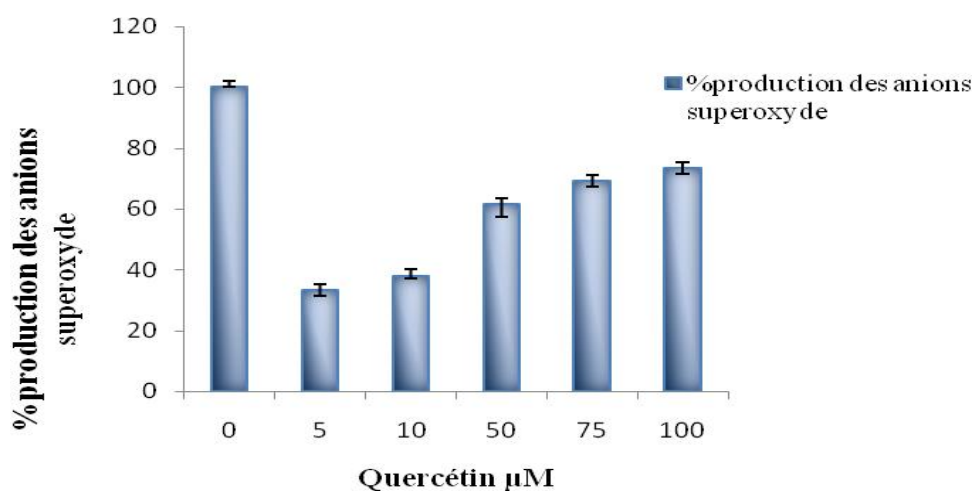
Figure 18. Cinétique de l'effet de Diclofénac-Na sur la production des anions superoxyde par les cellules VERO après stimulation par le PMA 160 nM.



**Figure 19. Cinétique d'effet de Diclofénac-Na sur la production des anions superoxyde par les cellules VERO après stimulation par le PMA 160 nM après 10 min et 30 min**

### 3.1.3.2- Effet de la quercétine sur la production des anions superoxyde par les VERO

Le traitement des cellules VERO avec de faibles concentrations de quercétine (5 et 10 µM) réduit les taux d'anions superoxyde par rapport au témoin avec les pourcentages respectifs suivants ( $66.6\% \pm 2.12\%$ ,  $61.9\% \pm 1.13\%$ ), tandis que le traitement par des concentrations les plus élevées de quercétine (50, 75 et 100 µM), réduit les pourcentages au témoin respectivement  $38.48\% \pm 4.13\%$ ,  $30.89\% \pm 1.85\%$ ,  $26.42\% \pm 1.95\%$ . (Tableau 7 ; Figure 20).

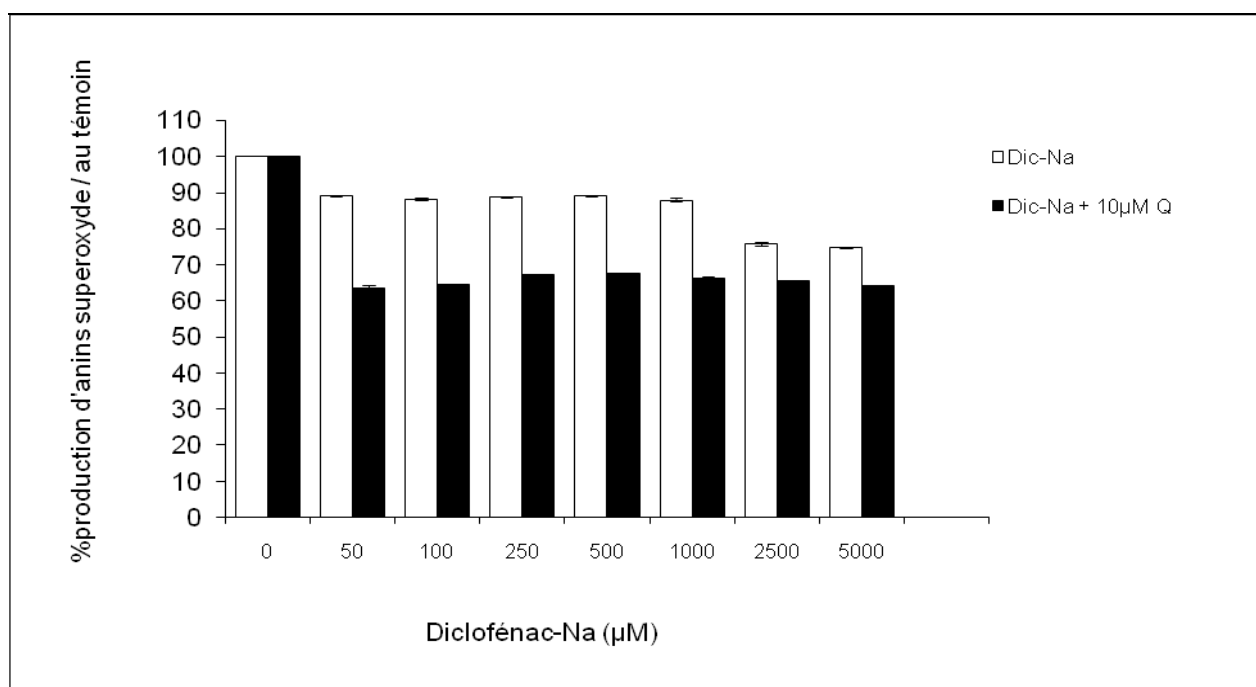


**Figure 20. Effet de la quercétine sur production d'anions superoxyde par cellules VERO**

### 3.1.3.3- Effet de la quercétine sur la production des anions superoxyde par cellules VERO traitées avec des concentrations croissantes Diclofénac-Na

Les résultats obtenus pour le dosage des anions superoxyde montrent une augmentation des taux de production des anions superoxyde pour toutes les concentrations de diclofénac-Na après stimulation des cellules VERO par le PMA en fonction du temps et une diminution de cette production en fonction des concentrations de diclofénac-Na seule. Cette réduction indique une réduction dans le nombre des cellules récupérés après tripsynisation (mort cellulaire).

Comparée au témoin, le diclofénac-Na (50-250 $\mu$ M) réduit légèrement la production des anions superoxyde. Au contraire, les concentrations élevées de diclofénac-Na (250-5000  $\mu$ M) induisent une cytotoxicité plus élevée. La même lignée cellulaire traitée avec les mêmes concentrations de diclofénac-Na, mais en association de 10  $\mu$ M de quercétine, provoquent une diminution remarquable de la production des anions superoxyde dans la zone des concentrations allant de (50-500 $\mu$ M) de diclofénac-Na.



**Figure 21.** Effet de la quercétine sur production d'anions superoxyde par cellules VERO traitées par des concentrations croissantes de diclofénac-Na

Pour les concentrations supérieures à 750  $\mu\text{M}$ , une réduction plus importante des anions superoxyde est mesurée dans les cellules VERO traitées avec des concentrations croissantes de Diclofénac-Na (50, 100, 250, 500 et 1000  $\mu\text{M}$ ), en présence de 10  $\mu\text{M}$  quercétine, les pourcentages de réduction sont respectivement 25,03%, 23,69%, 21,97% et 21%. Au contraire, à forte concentration de diclofénac-Na (2500 et 5000 $\mu\text{M}$ ) en présence de 10 $\mu\text{M}$  de la quercétine une faible réduction est mesurée avec les pourcentages respectifs 9,89% et 10,59% (Tableau 8 ; Figure21).

### 3.1.4- Effet du diclofénac-Na sur la production de Monoxyde d'azote (NO) par les cellules VERO

Les résultats obtenus montrent une production progressive de nitrites par les cellules VERO après 24h d'incubation, qui dépend des concentrations de traitement de diclofénac-Na.

Les concentrations (50, 75 et 100  $\mu\text{M}$ ) de diclofénac-Na diminuent les taux de nitrites, mesuré dans les surnageants de culture respectivement de 4,12%, 10,43%, 4,67%, pour les concentrations (250 et 500 $\mu\text{M}$ ) de diclofénac-Na une légère augmentation des taux de nitrites est mesurée dans les surnageants de culture, les pourcentages sont respectivement de (35.44% et 51.64%). Pour les concentrations (1000, 2500 et 5000  $\mu\text{M}$ ), la production des nitrites est excessive. Les pourcentages d'augmentation sont respectivement de (93,95%, 177.33% et 251.92%). (Tableau 9; Figure 22).

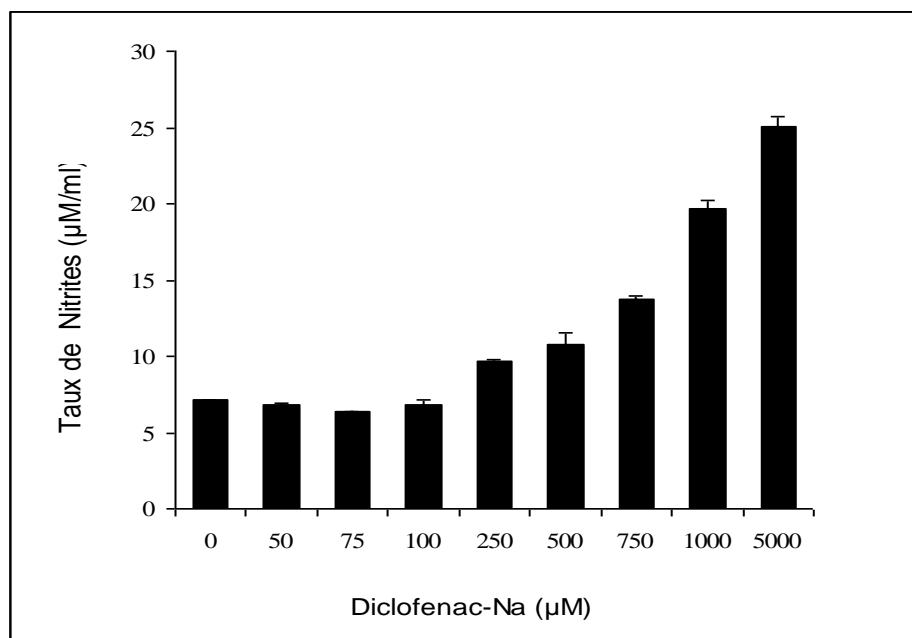


Figure 22. Effet du Diclofénac-Na sur la production de Monoxyde d'azote (NO)

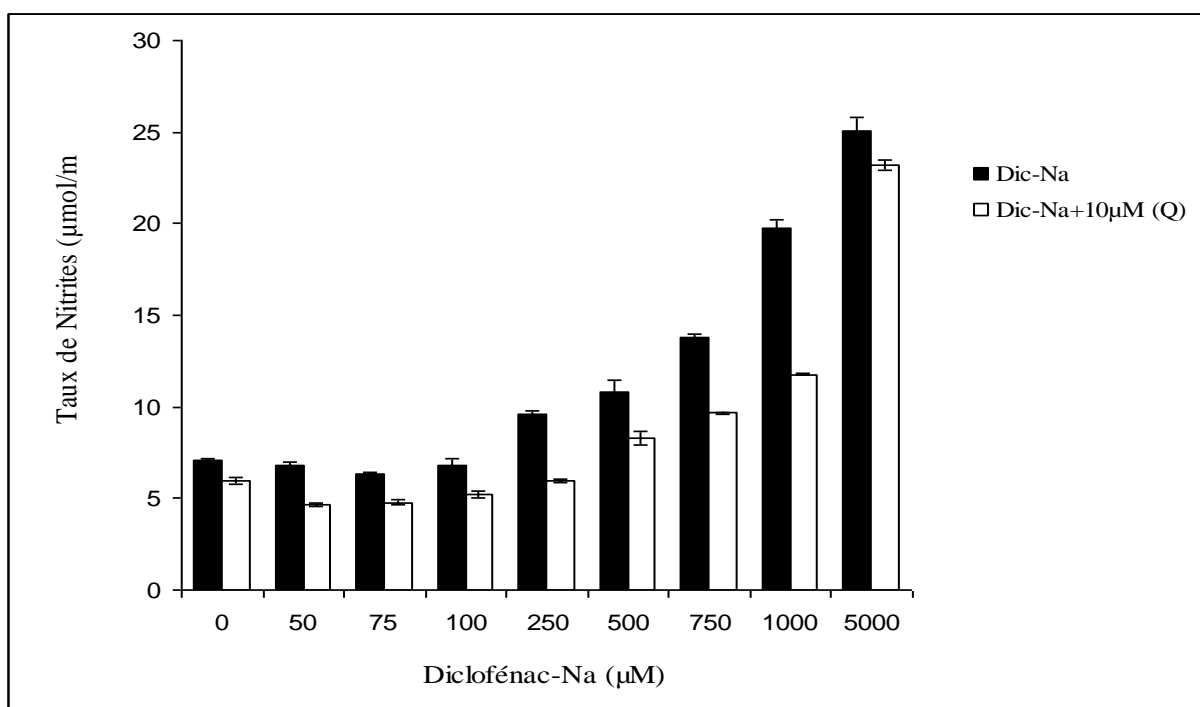
Les résultats suggèrent que les inhibiteurs de la COX peuvent avoir des effets différents sur la survie et la production de NO selon le tissu et la dose (Tunçtan et Coll., 2003) et que le diclofénac-Na à une concentration de 10 µM réduit faiblement l'accumulation de nitrites et l'expression de l'ARNm de iNOS (Sadowski et Steinmeyer ; 2001).

Cette production de nitrites reflète une synthèse du monoxyde d'azote par la NO synthase inductible (Nathan et Coll., 1994).

**3.1.4.1- Effet de la quercétine sur production de monoxyde d'azote par cellules VERO traitées par des concentrations croissantes diclofénac-Na**

L'exposition des cellules traitées par des concentrations croissantes de diclofénac-Na dans leur milieu de culture à une dose de 10µM de quercétine, se traduit par une réduction importante de quantités des nitrites. Les pourcentages de réduction sont de 29.94%, 22.25%, 21,42% avec le diclofénac-Na à 50µM, 75µM et 100µM, par rapport aux cellules traitées que par le diclofénac-Na seul. Tandis que la réduction des taux de nitrites est plus importante avec le diclofénac-Na à 250µM, 500µM et 1000µM. Les pourcentages de réduction sont de 51.37%, 35.43%, et 58.24%.

En présence de diclofénac-Na à 5000µM, la réduction de la production des nitrites reste faible de 25.82% qui signifie que la dose est toxique et induit la morte cellulaire (Tableau 10 ; Figure23).

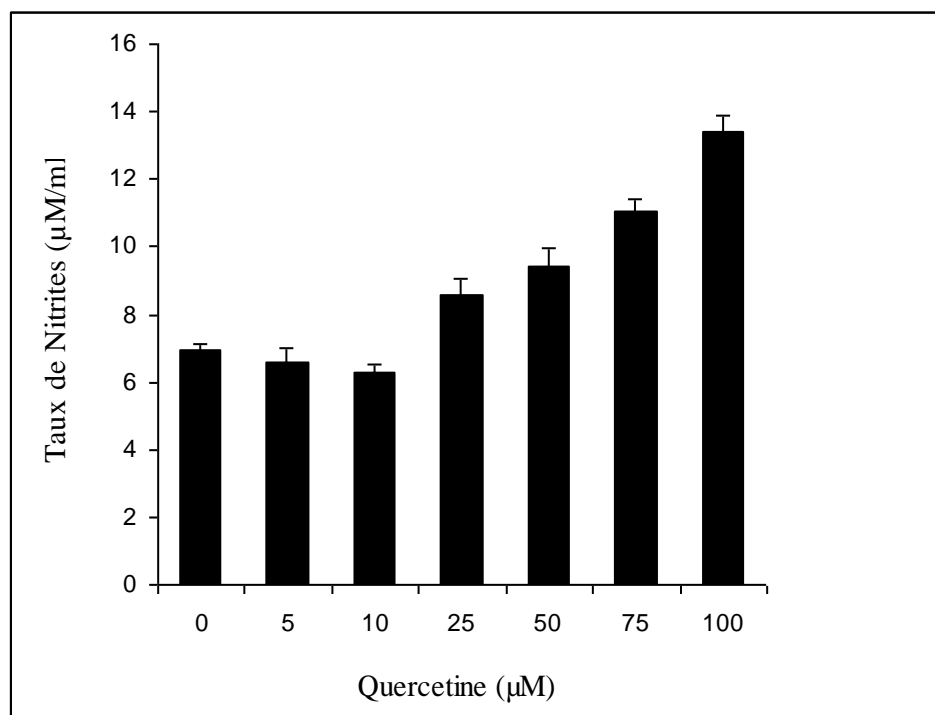


**Figure 23. Effet de la quercétine sur production de Monoxyde d'azote par cellules VERO traitées par des concentrations croissantes Diclofénac-Na**

### 3.1.4.2- Effet de la quercétine sur production de Monoxyde d'azote (NO) par cellules VERO

Les cellules VERO traitées par 5 et 10 $\mu$ M de quercétine ne changent pratiquement pas les taux de nitrites mesurés par rapport au témoin non traité.

Cependant le traitement par des concentrations plus élevées de quercétine (25, 50, 75 et 100  $\mu$ M) les augmente fortement. Les pourcentages respectifs sont de 24,01%, 36,44%, 59,88%, 93,78% mesurés par rapport au témoin non traité (Tableau 11; Figure 24).



**Figure 24.** Effet de la quercétine sur production de Monoxyde d'azote (NO) par cellules VERO

### 3.1.5. Effet du Diclofénac-Na sur la peroxidation lipidique au niveau des membranes des cellules VERO

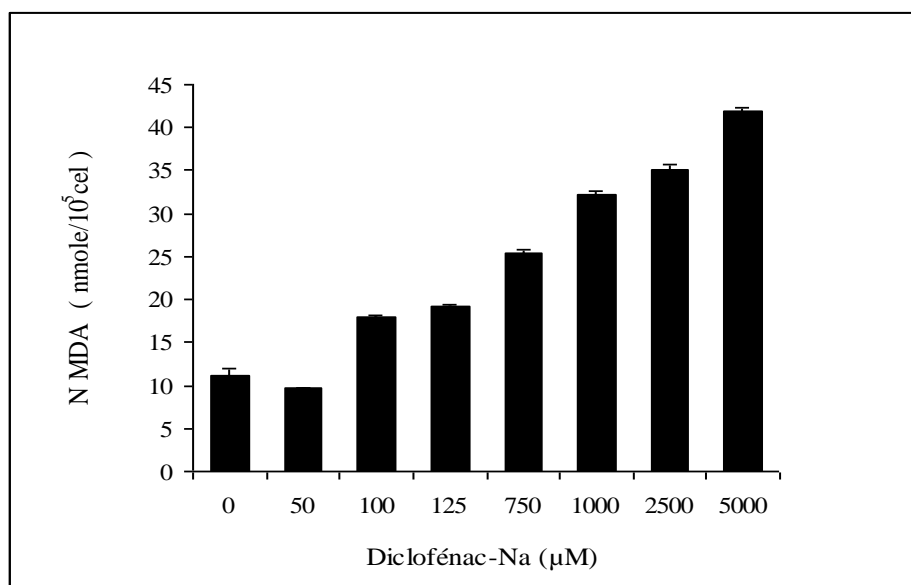
### 3.1.5.1- Effet de concentrations croissantes Diclofénac-Na sur les taux de MDA produits par les cellules VERO

Nous observons une augmentation de taux de MDA en fonction des concentrations de diclofénac-Na après 24 h du traitement.

Le traitement pendant 24 h de la lignée VERO par 100, 125 et 250  $\mu\text{M}$  de Diclofénac-Na augmente de deux fois la peroxydation lipidique. Les pourcentages respectifs sont de 59,768%, 71,37%, 77,95%.

Le traitement par les concentrations plus élevées de diclofénac-Na (750, 1000, 2500 et 5000  $\mu\text{M}$ ) potentialise la production de MDA d'un facteur 5. Les pourcentages d'augmentation sont respectifs sont 126,9 %, 187,4%, 214,5%, 273,9%, par rapport au témoin non traité (Tableau 12 ; Figure 25).

La présence des concentrations élevées en MDA est un indicateur direct de la peroxydation des lipides membranaires des cellules VERO. La peroxydation des lipides membranaires est due à une attaque par des ROS ayant une réactivité suffisante pour arracher un atome d'hydrogène. Le radical carboné, dans le cas d'un acide gras polyinsaturé, tente de se restabiliser par réarrangement moléculaire en créant une liaison diène. Cette liaison réagit rapidement avec le dioxygène pour former un radical oxygéné. Ce radical arrache un atome d'hydrogène à un autre acide gras pour se restabiliser conduisant à une chaîne de réaction en chaîne (Halliwell et Coll., 1984 et Jeantet, 2006).



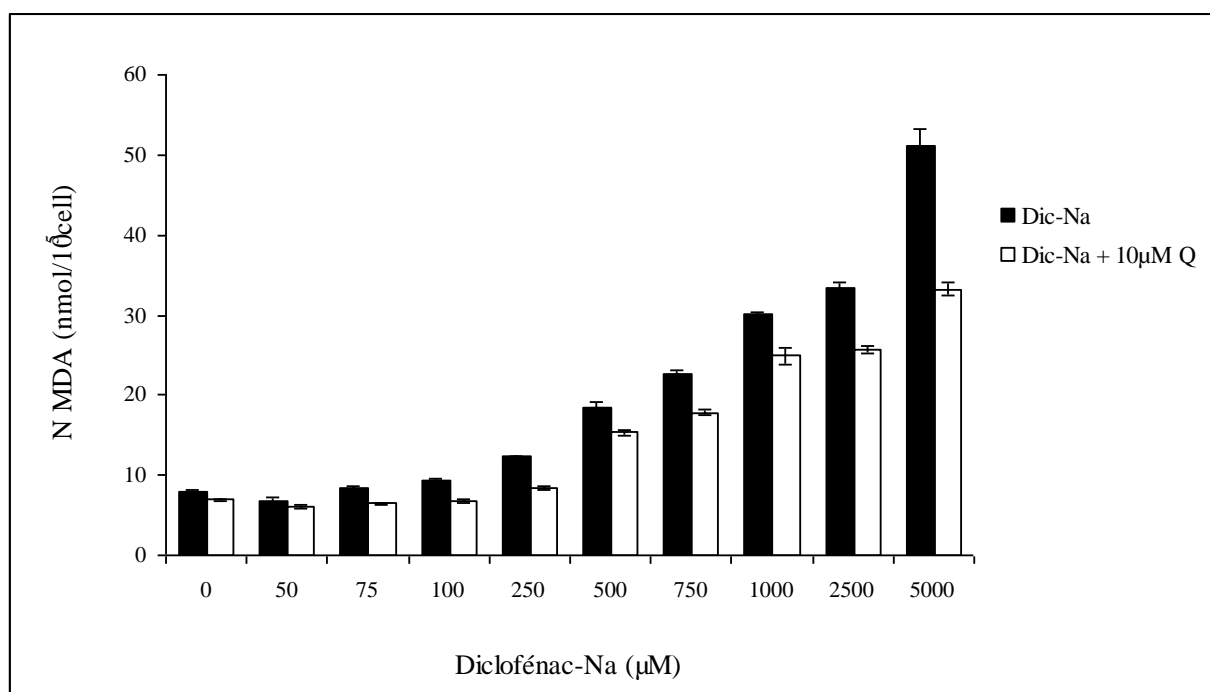
**Figure 25. Effet du Diclofénac-Na sur la peroxydation lipidique**

La perte de la structure tridimensionnelle de la bicouche lipidique membranaire ainsi que des membranes internes induit une perte de la fluidité de membrane, une réduction du potentiel membranaire puis une augmentation de la perméabilité membranaire. Une membrane lésée, ne peut plus jouer son rôle de barrière ni d'échanges.

### 3.1.5.2- Effet de la quercétine sur les taux de MDA produits par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes diclofénac-Na

Le prétraitement par 10  $\mu\text{M}$  de quercétine en présence des concentrations croissantes de diclofénac-Na (50, 75 et 100  $\mu\text{M}$ ) prévient la peroxydation lipidique et la réduit respectivement (24.81%, 18.25% et 15.25%) par rapport au témoin.

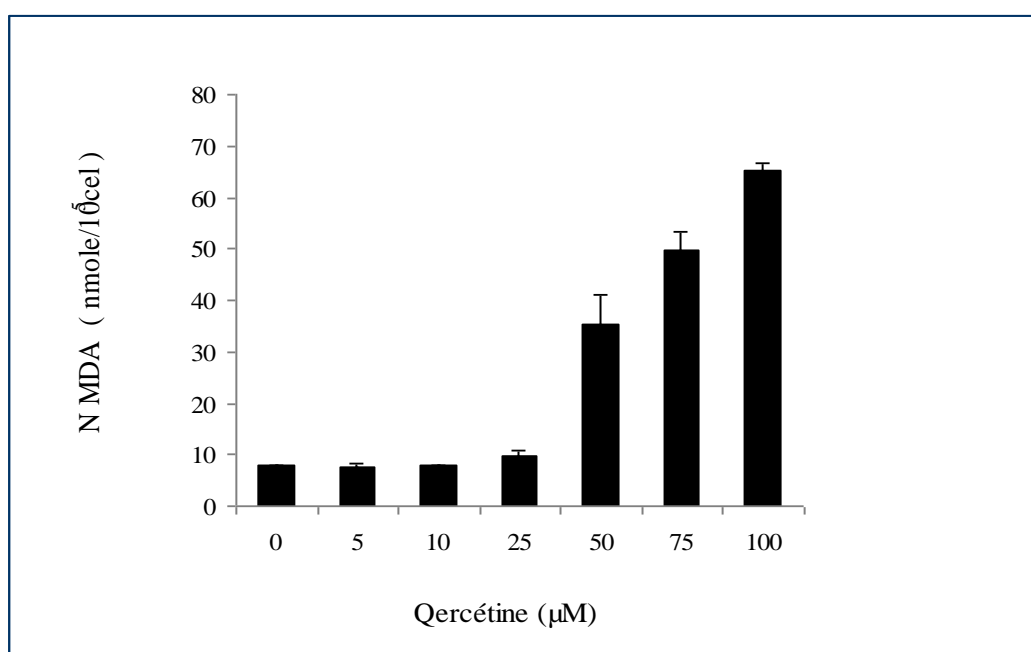
La quercétine 10  $\mu\text{M}$  en présence de concentrations plus élevées du diclofénac-Na (250, 500 et 750  $\mu\text{M}$ ) prévient partiellement la peroxydation lipidique respectivement de (49.04%, 40.87% et 62.12%) par rapport aux cellules traitées par les mêmes concentrations de diclofénac-Na (Tableau 12, Figure 26).



**Figure 26.** Effet de la quercétine sur les taux de MDA produits par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes Diclofénac-Na

### 3.1.5.3- Effet de la quercétine sur les taux de MDA produits par les cellules VERO

La quercétine interfère différemment sur la peroxydation lipidique. Le traitement à faible concentration de quercétine (5, 10 et 25  $\mu\text{M}$ ) diminue légèrement les pourcentages de la peroxydation lipidique comparé au témoin à 2.51%, 1.36%. Par contre la dose 25  $\mu\text{M}$  de quercétine augmente la peroxydation lipidique à près de 24.25%, alors que l'administration des concentrations plus élevés de quercétine (50, 75 et 100  $\mu\text{M}$ ) augmente fortement les pourcentages de la peroxydation lipidique par rapport au témoin respectivement à 346.32% ; 526.70% et 721.79% (Tableau 13 ; Figure 27).

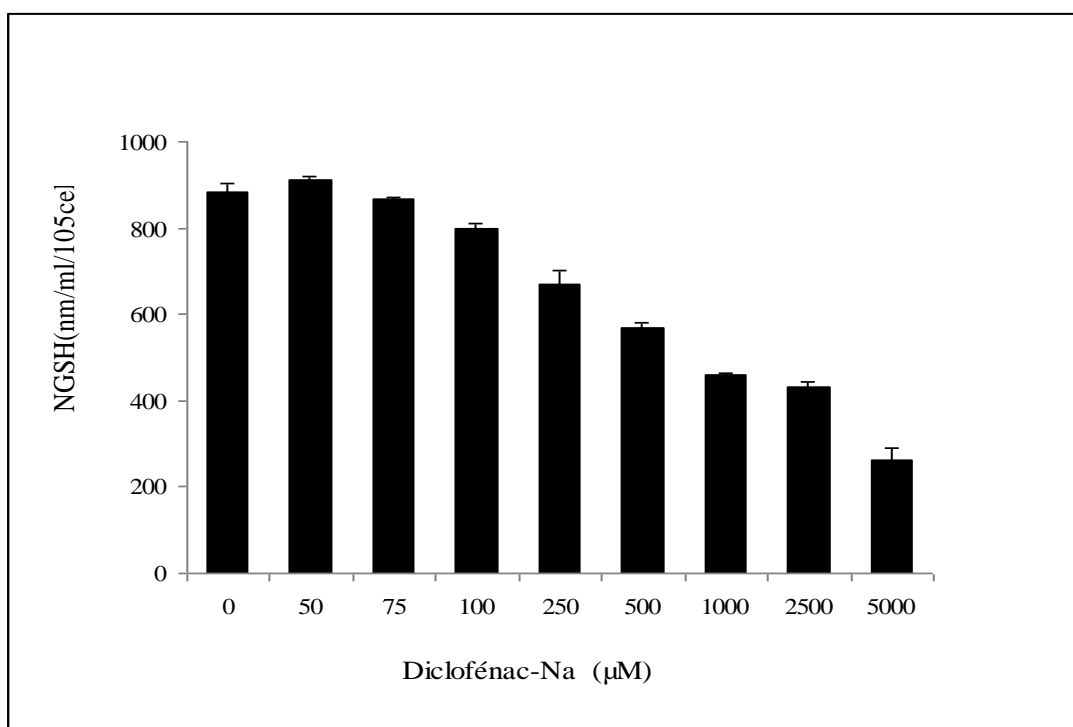


**Figure 27. Effet de la quercétine sur les taux de malonaldehyde (MDA) produits par les cellules VERO**

### 3.1.6- Évaluation du système antioxydant dans les cellules VERO par la mesure de GSH

#### 3.1.6.1- Effet de concentrations croissantes diclofénac-Na sur les taux de GSH produits par les cellules VERO

Le dosage du GSH est effectué selon le protocole de Boyne et Elman (1972). Le taux de GSH des cellules VERO traitées par les concentrations de diclofénac-Na (50 à 250  $\mu\text{M}$ ) ne change pas dans cette zone de concentration. Par contre à partir de 250  $\mu\text{M}$  de diclofénac-Na les quantités de GSH sont inférieures à celles trouvés chez les cellules VERO témoins (cellules non traitées). Cette baisse peut être expliquée par la peroxydation des lipides membranaires des cellules VERO induite par la production importante des ROS (Tableau 14 ; Figure 28).

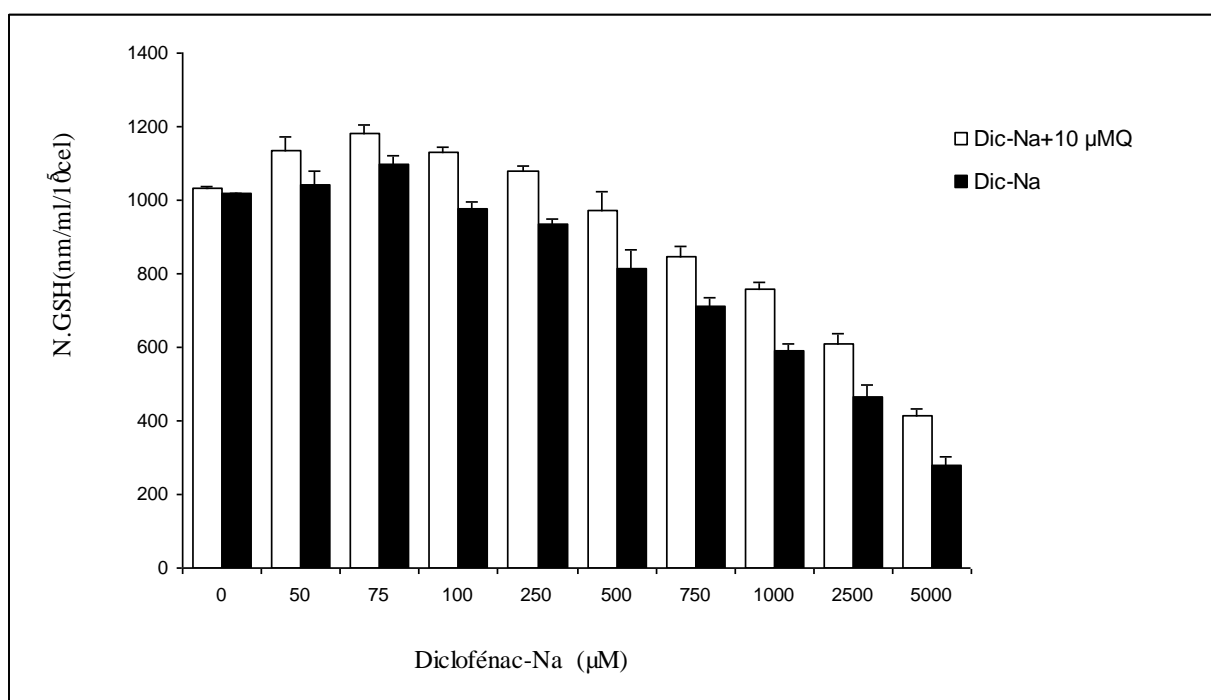


**Figure 28.** Evaluation du système antioxydant dans les cellules VERO par la mesure de GSH

**3.1.6.2- Effet de la quercétine sur les taux de GSH produits par les cellules VERO en présence de concentration croissantes de diclofénac-Na**

L'administration de 10  $\mu\text{M}$  de quercétine en présence des concentrations croissantes de diclofénac-Na (50-750  $\mu\text{M}$ ) restaure efficacement la production du GSH. Les pourcentages sont 8.88%, 7.73%, 15.42%, 15.72%, 19.70%, 19.36%.

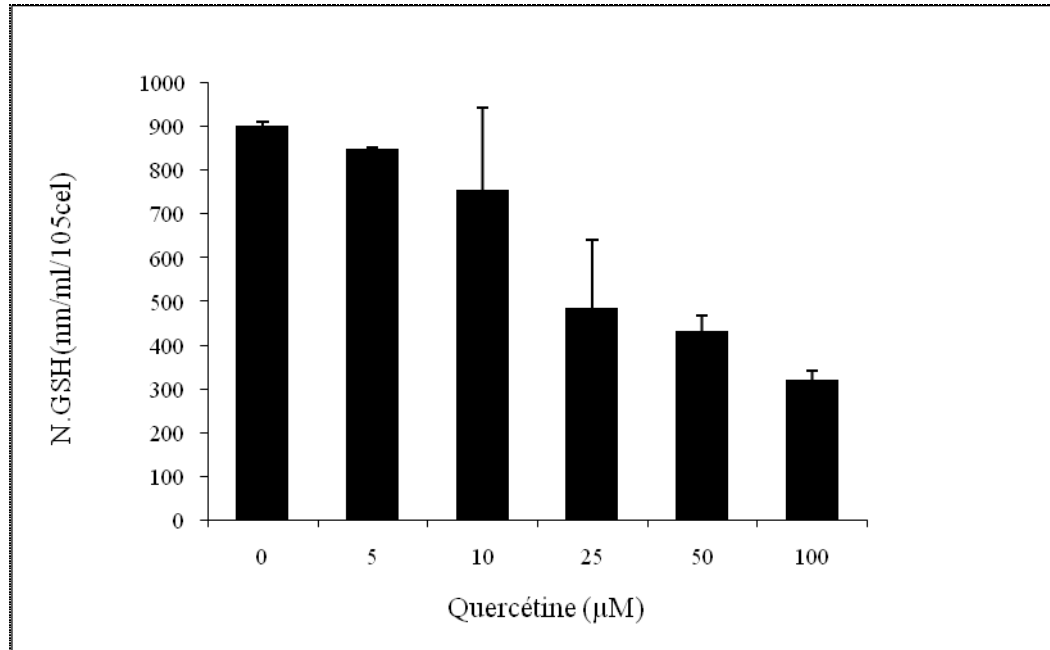
Tandis que la présence de 10 $\mu\text{M}$  de quercétine avec des concentrations de diclofénac-Na de 750-5000  $\mu\text{M}$ ) augmente les taux en GSH de 28.25%, 30.77% et 58.08%) comparé aux taux trouvés chez les cellules traitées avec le diclofénac-Na seule (Tableau 15 ; Figure 29).



**Figure 29. Effet de la quercétine sur les taux de glutathion réduit (GSH) produits par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes diclofénac-Na**

### 3.1.6.3- Effet de la quercétine sur les taux de GSH produits par les cellules VERO

L'administration de 5 et 10  $\mu\text{M}$  de quercétine n'interfère pratiquement pas sur la production du GSH, alors que le traitement par 25, 50 et 100  $\mu\text{M}$  réduit les taux du GSH de manière progressive (Tableau 16; Figure30).



**Figure 30 : Effet de la quercétine sur les taux de glutathion réduit (GSH)**

## DISCUSSION GENERALE

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les médicaments les plus prescrits dans le monde pour traiter les symptômes de nombreuses maladies inflammatoires. Toutefois, l'utilisation prolongée de concentrations thérapeutiques d'AINS, ou la prise d'une seule dose supra thérapeutique, provoque des altérations histologiques et fonctionnelles au niveau des organes cibles. Ce sont les effets secondaires, indissociables des effets thérapeutiques des AINS (Scheiman et Coll., 1997 ; Somasundaram et Coll., 2000; Basivireddy et Coll., 2003 ; Basivireddy et Coll., 2004).

Les manifestations toxiques des AINS ont été corrélées à l'inhibition de la production des prostaglandines (PG) cytoprotectrices, synthétisées par la cyclooxygénase 1 (COX1) constitutive. L'efficacité des AINS à réduire les symptômes de l'inflammation (oedème, douleur et fièvre) résulte de l'inhibition sélective de l'isoforme induite COX2, qui intervient dans les processus inflammatoires (Brooks et Coll., 1999 ; Mardini et Coll., 2001).

Les cellules VERO, sont dérivées de cellules épithéliales de reins de singe vert d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*) (Macfarlane et Sommerville, 1969). Elles sont non cancéreuses, adhérentes et se différencient spontanément lorsqu'elles sont en confluence (Phonnok, 2008). Les cellules VERO sont classiquement utilisées pour la production ou le contrôle de vaccins viraux (Crill et Roehrig, 2001; Balamurugan et Coll., 2006) et pour évaluer la toxicité des venins et les toxines (Giron et Coll., 2005; Bouaziz et Coll., 2006).

Nous avons utilisé les cellules VERO pour évaluer la toxicité du diclofénac-Na, *ex vivo*. Nous avons montré que cet AINS induit un stress oxydatif, qui est atténué par un antioxydant naturel, la quercétine.

## 1. Effets toxiques du diclofénac-Na

### 1.1- sur la viabilité cellulaire

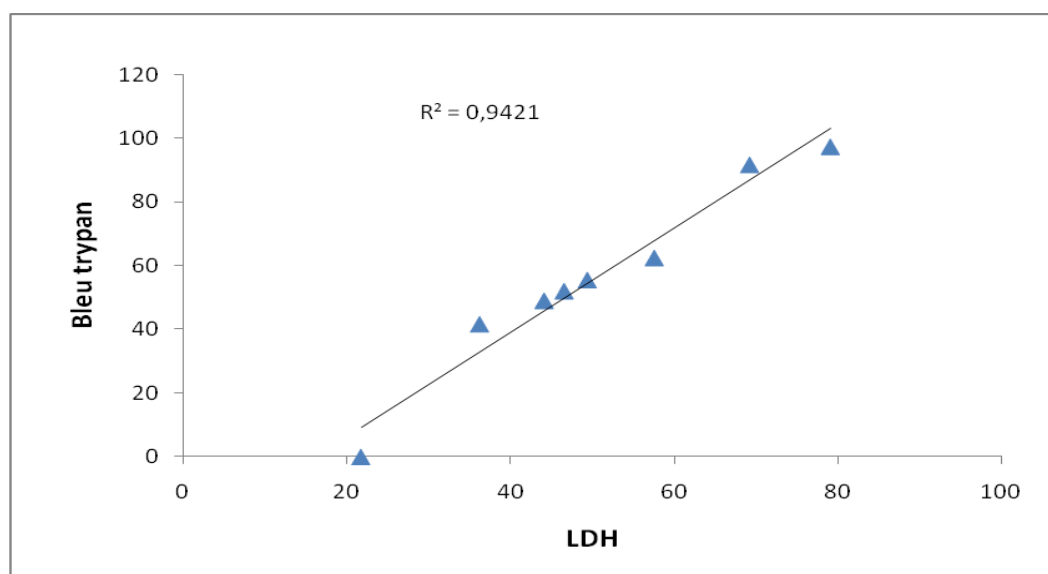
La détermination de l'effet du Diclofénac-Na sur la viabilité cellulaire a été abordée *in vitro* par l'incubation des cellules VERO exposées à des concentrations croissantes de diclofénac-Na. Nos résultats expérimentaux obtenus pour la mesure de la viabilité cellulaire par le test au bleu trypan et de l'intégrité membranaire par la mesure de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH), démontrent clairement que le diclofénac-Na induit une toxicité temps et dose dépendants, conduisant à la mort cellulaire.

L'altération des mitochondries par les AINS, conduit à la mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose (Kroemer et Coll., 1998). En effet, les AINS induisent l'ouverture des pores de transition de perméabilité ou MPT (Mitochondrial Permeability Transition) (Szewczyk et Vojtczak, 2002).

La mitochondrie a pris une place essentielle dans la description de la mort cellulaire programmée et de ses mécanismes de régulation. En effet, La chute du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), induit par un stress cellulaire comme une dose toxique d'AINS, augmente la perméabilité membranaire par ouverture des pores MPT. Le Cyt c et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) sont relargués rapidement dans le cytosol et contribuent à la formation de l'apoptosome, l'oligomérisation de l'Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor) et l'activation de la caspase3 (Lemasters et Coll.1998 ; Lemasters, 1999).

La libération de la lactate déshydrogénase cytosolique dans les surnageants des cultures conforte ces résultats et indique une détérioration de la membrane cellulaire. Cette cytotoxicité peut être due à une action directe du diclofénac-Na sur les cellules, ou indirectement par l'implication d'autres médiateurs cytotoxiques, se traduisant soit par une inhibition de la prolifération cellulaire ou une mort cellulaire.

Les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire, et notamment l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle à la mort cellulaire.



**Figure 31. Corrélation entre la mort cellulaire (bleu au trypan ) et la LDH**

### **1.2- Perturbation de la balance Redox par la production des ROS conduisant à un stress oxydatif**

Dans cette étude, des marqueurs biochimiques de stress oxydatif (NO, MDA,  $O_2^{\cdot-}$ , GSH) ont été explorés afin de quantifier le stress oxydatif induit par le diclofénac-Na.

La toxicité induite par le diclofénac-Na s'est traduite par un stress oxydatif caractérisé par une augmentation de taux de MDA et du taux de NO et la production des anions superoxyde. Parallèlement, le marqueur du potentiel antioxydant est réduit. Le taux de GSH est inférieur aux taux cellules témoins. Cette toxicité est proportionnelle à la dose du traitement.

Nos résultats démontrent qu'à faibles concentrations (50-125 $\mu$ M), le diclofénac-Na modifie légèrement les taux de NO, MDA, anion superoxyde et GSH. Au contraire, à fortes concentrations, les taux des marqueurs du stress oxydatifs sont très élevés (LDH $\approx$ 52.9 $\pm$ 2.11 U/ml ; MDA $\approx$ 41.82 $\pm$ 0.398 nmol/ml ; NO $\approx$ 24.262 $\pm$ 0.523  $\mu$ M/ml) et le GSH est fortement consommé.

Ces résultats indiquent l'induction d'un stress oxydatif au niveau des cellules VERO.

Des travaux récents ont montré le rôle majeur des mitochondries dans la toxicité des AINS, par la production de quantités massives de ROS (Brzozowski et Coll., 2001; Bassivireddy et Coll., 2004).

Le diclofénac-Na provoque simultanément, une diminution de potentiel transmembranaire  $\Delta\psi_m$  et la diminution de la synthèse d'ATP dans la mitochondrie. Le  $\Delta\psi_m$  est maintenu par le pompage des protons de la matrice à travers la membrane mitochondriale interne vers l'espace inter membranaire (Masubuchi et Coll., 2002).

Le diclofénac-Na pourrait contribuer à ces altérations par au moins trois mécanismes

- 1) des effets directs sur la membrane mitochondriale interne,
- 2) le découplage et/ou l'inhibition de la respiration,
- 3) l'ouverture des pores de transition de la perméabilité de la membrane mitochondriale (Boelsterli, 2003).

*In vivo*, le stress oxydatif induit par le diclofénac-Na est principalement dû à la production de taux élevés de chimioattractants (LTB4) sur le site inflammatoire, par inhibition des cyclooxygénases. Le LTB4 augmente la perméabilité vasculaire et favorise l'infiltration leucocytaire (Gilroy et Coll., 1998 ; Koji et Coll., 2002 ; Pinheiro et Coll., 2002 ; Takeuchi et Coll., 2002).

Les AINS présentent en plus de leurs propriétés pharmacodynamiques qui sont COX-dépendantes, des effets COX-indépendants. Plusieurs travaux ont décrits l'effet antioxydant du diclofénac-Na (Perianin et Coll., 1987 ; Parij et Coll., 1998 Angelis-Stoforidis et Coll., 1991 ; Yuda et coll 1990).

Nos résultats suggèrent que les inhibiteurs de la COX peuvent avoir des effets différents sur la survie cellulaire et la production de NO selon le tissu et la dose (Tunçtan et Coll., 2003) et que le diclofénac-Na à une concentration de 10  $\mu$ M réduit faiblement l'accumulation de nitrites et l'expression de l'ARNm de iNOS (Sadowski et Steinmeyer ; 2001).

Le NO produit sous l'action de NO<sup>-</sup> synthétase est capable de diffuser dans l'environnement cellulaire grâce à ces propriétés lipophiles et hydrophiles aussi a ca demi vie la plus longue, et d'interagir avec O<sub>2</sub><sup>-</sup> entraînant la production de peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) pour voyeur de lésion tissulaire.

La cytotoxicité du NO est la conséquence de sa capacité à inhiber la glycolyse, le cycle de Krebs, la respiration mitochondriale et la synthèse d'ADN (Laubach et Coll., 1995). Le NO inhibe réversiblement la cytochrome c oxydase et entre en compétition avec l'oxygène au niveau du site III de la chaîne respiratoire (Borown et Borutaite., 2002). D'autre part, le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) radical mixte produit par l'interaction, inhibe le complexe I et III de manière irréversible inhibe également l'ATP synthase, l'aconitase, la créatine kinase et provoque l'ouverture des pores de perméabilités de transitions (Borown et Borutaite, 1999).

Le NO favorise la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par inhibition du complexe complexe IV de la chaîne respiratoire. L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est transformé par la Mn SOD en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorise la production du NO par activation du NF-kB responsable de l'expression de la iNOS (Han et Coll., 2001). Le NO à son tour inhibe la catalase de façon réversible en se fixant sur l'hème de cette enzyme. La catalase est une enzyme antioxydante qui catalyse la réduction d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène moléculaire. L'inhibition de la catalase par le NO augmente la concentration cellulaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le cycle continu (Brown, 1995).

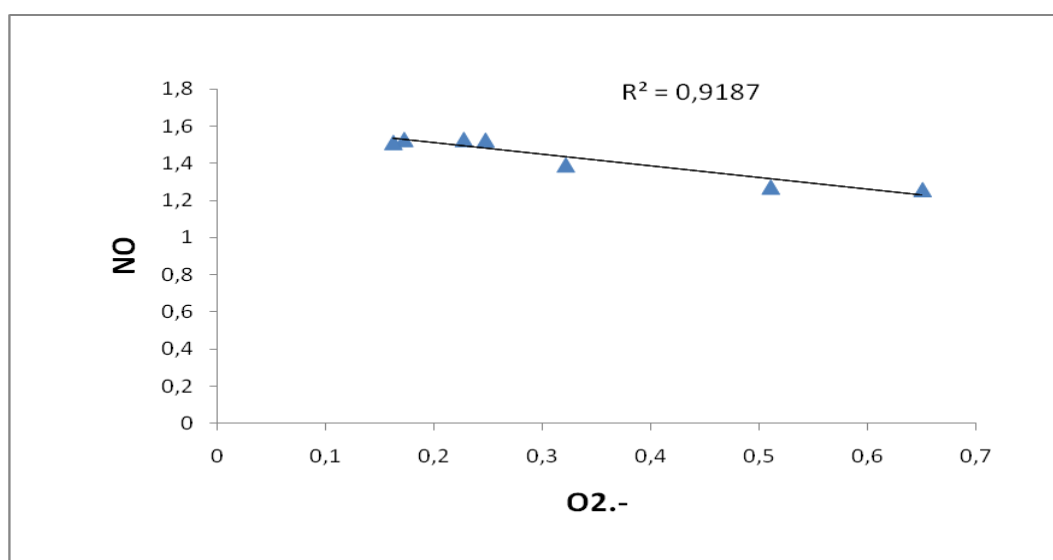
Le NO pourrait aussi réagir avec l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pour donner du peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), un puissant agent oxydant qui peut contribuer aux dommages tissulaires et qui aurait plusieurs cibles, comme la chaîne respiratoire mitochondriale, les lipides, les protéines et l'ADN (Laubach et Coll., 1995 ; Tavernier et Coll., 2001) .

Le radical superoxyde constitue le précurseur des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Haddad, 2002). Son métabolisme produit d'autres espèces radicalaires plus réactives comme le radical hydroxyle  $\bullet$ OH, radical peroxy ROO $\bullet$ , et radical alkoxy RO $\bullet$  (Haddad, 2002 ; Afonso et Coll., 2007). L'anion superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les phagocytes (neutrophiles, monocytes,

macrophages, éosinophiles) et participe à l'inactivation des virus et bactéries. Cependant, lorsque les phagocytes sont stimulées de manière excessive ou inappropriée, ces cellules sont sources d'une importante quantité de ROS à l'origine de lésions tissulaires sévères (Nohl, 1994).

Les effets pro-inflammatoires de l' $O_2^{\cdot-}$ , conduisent à l'altération des cellules endothéliales, l'augmentation de la perméabilité microvasculaire et le recrutement des polynucléaires neutrophiles (PN) sur les sites inflammatoires.).

L' $O_2^{\cdot-}$  réagit avec le NO pour donner une espèce radicalaire hautement réactive, le peroxydinitrite  $ONOO^{\cdot}$ . Celui-ci est un médiateur important de la peroxydation lipidique et de la nitration protéique, En l'absence de NO, l' $O_2^{\cdot-}$  est rapidement dismuté par la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Ce dernier est neutralisé par les catalases ou par la glutathion peroxydase (GSH-PX).



**Figure. 32 :** Corrélation entre la production du NO et la production des anions superoxyde  $O_2^{\cdot-}$

La présence des concentrations élevées en MDA ( $7.94 \text{ nmol}/10^5 \text{ cell}$  à  $51.16 \text{ nmol}/10^5$ ) en présence des doses de Diclofénac-Na (0 à  $5000 \mu\text{M}$ ) est un indicateur direct de la peroxydation des lipides membranaires des cellules VERO.

Le stress oxydant entraîne la destruction des macromolécules cellulaires (peroxydation lipidique, adduits de l'ADN et des protéines...), il induit alors l'apoptose ou la nécrose (Moer et barouki, 1998). En effet plusieurs biomolécules à propriété cytotoxique, provoquent une mort cellulaire par apoptose (Tortorella et Coll., 1998 ; Kumar et Coll., 2003 ; Bouaziz et Coll., 2006)

La mort cellulaire par apoptose diffère sur plusieurs aspects de la nécrose. La nécrose est la mort cellulaire engendrée suite à des dommages directs à la surface cellulaire, se caractérisant par un gonflement puis une lyse de la cellule avant l'altération morphologique du noyau. Alors que l'apoptose montre un rétrécissement cellulaire, une condensation de la chromatine et une hyper-segmentation nucléaire, avant la formation de corps apoptotiques par bourgeonnement (tang et Coll., 2002).

La peroxydation lipidique pourrait donner lieu à un produit final le MDA. Ce dernier, a la capacité de former des adduits avec les protéines et l'ADN responsables des effets mutagènes et carcinogènes (Chaudhary et Coll., 1994 ; Pratico, 2002). Les protéines sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, leur oxydation conduit soit à une perte de la fonction catalytique, dans le cas des enzymes, ou à la fonction structurale, pour des récepteurs ou protéines de transport. L'atteinte des enzymes impliquées dans la réplication ou la réparation de l'ADN conduit à des mutations ou à des erreurs dans la lecture (Barouki, 2006 ; Frelon, 2001)

Les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche lipidique. Par conséquent, la production de radical superoxyde, qui provoque une attaque nucléophile des groupements carbonyles des liaisons ester reliant les acides gras au glycérol, désorganise l'intégrité de la membrane (Halliwell et Coll., 1984).

La peroxydation des lipides membranaires ou des acides gras libres est due à une attaque par des espèces ayant une réactivité suffisante pour arracher un atome d'hydrogène. L'atome d'hydrogène est constitué d'un proton et d'un électron. Ainsi le fait d'arracher cet atome laisse un électron non apparié sur l'atome de carbone de la molécule cible.

Le radical carboné, dans le cas d'un acide gras polysaturé, tente de se restabiliser par réarrangement moléculaire en créant une liaison diène. Cette liaison réagit rapidement avec le dioxygène pour former un radical oxygéné. Ce radical arrache un atome d'hydrogène à un autre acide gras pour se restabiliser et la chaîne de réaction continue (Halliwell et Coll., 1984 et Jeantet., 2006).

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme les acides linoléiques ou arachidonique sont les cibles privilégiées des ROS et plus particulièrement des ROS ( $\cdot$ OH). Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH), Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en une série de sous-produits que sont les aldéhydes, dont le dialdéhyde malonique MDA et les hydrocarbures. Les aldéhydes sont très réactifs et peuvent augmenter les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Le MDA altère les protéines et l'ADN (Niitsu et Coll., 1995 ; Pincimail et Coll., 1999).

La perte de la structure tridimensionnelle de la bicouche lipidique membranaire ainsi que des membranes internes induit une perte de la fluidité de membrane, une réduction du potentiel du membranaire puis une augmentation de la perméabilité membranaire. Une membrane lésée ne peut plus jouer son rôle de barrière ni d'échanges.

Les résultats de notre étude, montrent une libération précoce du malondialdéhyde après 24 heures d'incubation corrélée avec la production du glutathion en réponse à la perturbation induit par un stress oxydatif ( $R=0.97$ ). La déplétion ou la réduction du glutathion précède ou accompagne souvent la peroxydation lipidique et le stress oxydatif comme une réponse à un dérèglement de l'équilibre redox (Verma et Coll., 2009 ; Wang et Coll., 2009).

La production massive des ROS provoque l'altération du système antioxydant suite à l'inhibition de l'activité et la synthèse de ses enzymes (Jaeschke., 2006). D'autre part, l'inhibition de la chaîne respiratoire est à l'origine d'une production massive des ROS ce qui provoque la peroxydation des acides gras et empêche leur  $\beta$ - oxydation (Fosslien, 1998 et 2001).

La production excessive de ROS provoque des lésions directes des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment

lors de l'oxydation des lipides. Ainsi, l'action du radical  $\cdot\text{OH}$  sur l'ADN peut engendrer :

- une oxydation des bases puriques et pyrimidiques, l'oxydation de la guanine 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH2DG) ;
- des cassures de brins d'ADN résultant de l'attaque des sucres ;
- des cassures des pontages ADN-protéines.

Cette modification de l'ADN induit des mutations (cancer) ou aboutira à la mise en route du d'une mort cellulaire par apoptose (Pincimail et Coll., 1999).

L'équilibre entre la production des ROS et leur neutralisation est lié à la présence de nombreux systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques). Cet état d'équilibre permet de maintenir la fonction cellulaire et tissulaire normale (Afonso et Coll., 2007).

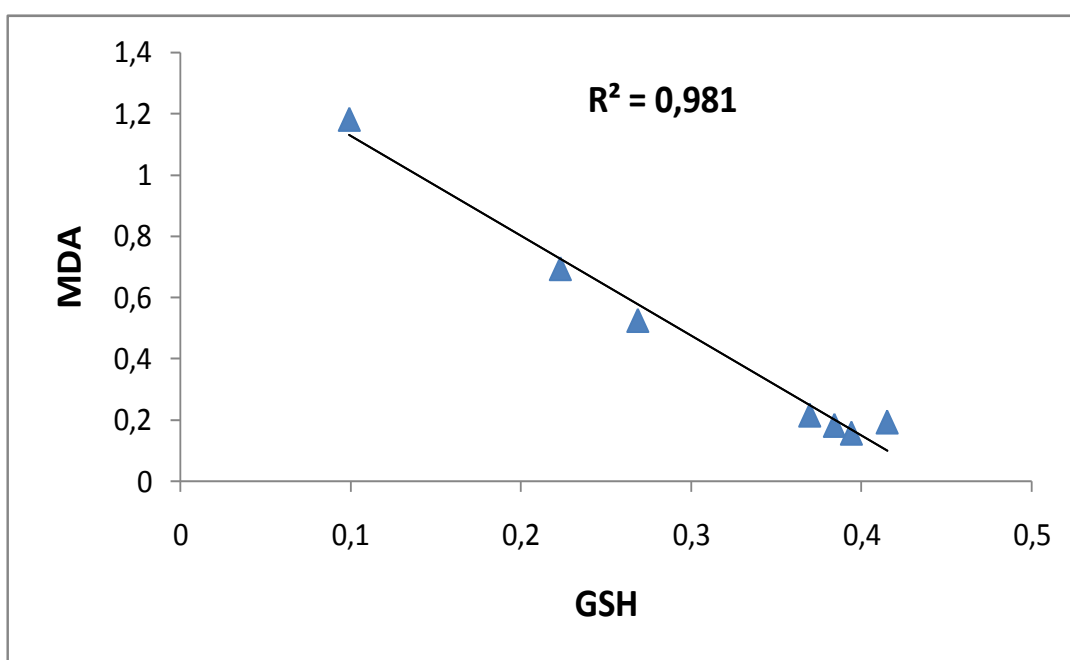
Une réduction du taux de glutathion (GSH) a été mesuré avec de fortes concentrations de diclofénac-Na, suggérant ainsi leur implication dans les mécanismes de détoxification cellulaire en réponse aux toxicité du diclofénac-Na.

La glutathion réductase est une enzyme NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) dépendante qui catalyse la réduction du glutathion oxydé GSSG en glutathion GSH.

Le glutathion est le principal antioxydant cellulaire. C'est un tripeptide (composé de cystéine, de glycine et de glutamate) qui sous sa forme réduite (GSH), agit comme antioxydant, soit directement en interagissant avec  $\text{OH}^-$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , soit indirectement en tant que substrat de l'enzyme glutathion peroxydase. La glutathion peroxydase est une enzyme cytoplasmique qui permis de convertir le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau et de maintenir sous forme réduite les protéines et la vitamine E, Le Sélénium est un cofacteur à l'activité de cette enzyme (Dervaux et Coll., 2006).

Le GSH intervient dans les réactions de détoxification des xénobiotiques auxquels il est conjugué par la GSH S-transférase. Il est également impliqué dans la synthèse des désoxyribonucléiques, leucotriènes, prostaglandines, stéroïdes et des mélanines. Enfin, il permet de garder les groupements SH des protéines cellulaires sous forme réduite, contribuant ainsi au maintien du potentiel redox de la cellule et donc au maintien de bon nombre de processus de signalisation (Nafia et Coll., 2005).

Le glutathion (GSH,) protège les cellules contre les attaques électrophiles, des xénobiotiques, des ROS et des peroxydes. L'augmentation de MDA produit final de la peroxydation lipidique réduit le taux du GSH, ce qui concorde avec nos résultats (Didem Deliorman et Coll., 2007).



**Figure33 : Corrélation entre la peroxydation lipidique (MDA) et le GSH**

## **2. La Quercétine restaure les activités enzymatiques et rétablit la balance Redox**

Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus, illustrent l'efficacité de ce traitement contre le stress oxydatif et en restaurant le système de défense cellulaire.

L'effet préventif de la quercétine au cours du stress oxydatif induit par le diclofénac-Na peut être expliqué :

- par inhibition de la iNOS, responsable de la production excessive du NO,
- par neutralisation des ROS particulièrement les ions superoxyde et hydroxyle
- par inhibition de la peroxydation lipidique responsable des dommages radicalaires de l'ADN et des lipides contribuant à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

La quercétine est un flavonoïde de la classe de polyphénols, retrouvé dans les fruits, légumes, huile d'olive, thé. Elle manifeste un potentiel antioxydant élevé comparé aux autres flavonoïdes. L'activité antioxydante de la quercétine est basée sur son effet scavenger des ROS.

Les flavonoïdes et en particulier la quercétine qui présente sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique (Erben-Russ et Coll. ; 1987). Ce sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique (Yoshino et Coll., 1994), ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (Galvez et Coll., 1995).

Plusieurs études ont montré que la quercétine est un puissant inhibiteur des radicaux libres (Kavutcu et Melzig., 1999)

Parallèlement plusieurs travaux ont montré le rôle des flavonoïdes dans la désactivation des radicaux libres. Les extraits de propolis semblent apporter une protection contre les radicaux libres formés par des métabolismes hépatique des trois médicaments (paracétamol, vinblastine et cyclophosphamide). Ils empêchent la liaison de ces métabolites

métabolites réactifs avec les lipides membranaires de la cellule hépatique, ce qui se traduit par la diminution des taux de MDA tissulaires. Principale conséquence : la peroxydation lipidique et une oxydation des groupes thiols des protéines. ( Lahouel et Coll., 2004).

Les anions superoxydes est responsable de la fragmentation de DNA, mais elle est prévenue par les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, flavanol, quercétine (Sandra Yucra et Coll., 2008).

De nombreux travaux rapportent les propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes (Da Silva et Coll., 1994 ; Galati et Coll., 1994 ; Read, 1995) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton et Elliott, 1992).

La quercétine inhibe la prolifération des lymphocytes T. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C et protéine tyrosine kinase) (Mookerjee et Coll., 1986 ; Namgoong et Coll., 1994). La quercétine à 10  $\mu\text{M}$  agit sur la croissance cellulaire (augmente de 25% le nombre de cellules vivante en culture) (Jean-Pierre Ternaux et Paule Portalier., 2002).

Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des mastocytes (cellules dont le cytoplasme contient de nombreuses granulations basophiles) (Middleton et Drzewiecki ; 1984).

La quercétine inhibe le peroxyde d'hydrogène, qui dénature le DNA ce qui conduit à des dégâts chez les lymphocytes humaines (Ochir et Coll., 2004).

Quercétine 10  $\mu\text{M}$  inhibe de 79% la génération des métabolites lipidiques (Mia Sandberg Lundblada et Coll., 2004).

Ce qui concorde avec nos résultats. Le traitement par l'antioxydant réduit efficacement le stress oxydatif, en présence des fortes concentrations du diclofénac-Na ce qui explique l'avantage de ce type de traitement en cas de surdosage.

## **CONCLUSION GENERALE**

Dans cette étude, il a été montré qu'un traitement réalisé in vitro par des doses croissantes de Diclofénac-Na, a provoqué un stress oxydatif chez les cellules Véro. Cette réponse est marquée par l'augmentation de l'activité de la LDH qu'explique la lyse cellulaire, les teneurs élevés en MDA (marqueur de la peroxydation lipidique) et de faibles teneurs en GSH (indicateur de l'état du système antioxydant). L'augmentation des nitrites et des anions superoxydes indique que la production des ROS est à l'origine de ce stress.

Les conséquences biologiques du stress oxydatif seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines de l'adhérence, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que des stress sévères provoquent une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates.

Le prétraitement in vitro des cellules Véro par la quercétine avère modulée cette réponse (l'activité antioxydant de la quercétine est basée sur l'effet scavenger des radicaux libre c'est un réactive stabilisant des ROS).

L'utilisation d'antioxydants naturels qui présentent des effets adverses moindres, permettrait d'optimiser les traitements de référence, dans de nombreuses pathologies impliquant un stress oxydatif.

## CONCLUSION GENERALE

Dans cette étude, il a été montré qu'un traitement réalisé in vitro par des doses croissantes de Diclofénac-Na, a provoqué un stress oxydatif chez les cellules Véro. Cette réponse est marquée par l'augmentation de l'activité de la LDH qu'explique la lyse cellulaire, les teneurs élevées en MDA (marqueur de la peroxydation lipidique) et de faibles teneurs en GSH (indicateur de l'état du système antioxydant). L'augmentation des nitrites et des anions superoxydes indique que la production des ROS est à l'origine de ce stress.

Les conséquences biologiques du stress oxydatif seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines de l'adhérence, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que des stress sévères provoquent une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates.

Le prétraitement in vitro des cellules Véro par la quercétine avère modulée cette réponse (l'activité antioxydant de la quercétine est basée sur l'effet scavenger des radicaux libre c'est un réactive stabilisant des ROS).

L'utilisation d'antioxydants naturels qui présentent des effets adverses moindres, permettrait d'optimiser les traitements de référence, dans de nombreuses pathologies impliquant un stress oxydatif.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**A**

- 1) Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Rhumatisme*; 74 636–643.
- 2) Ames BN., Shigenaga MK., Hagen TM. 1993 Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Natl Acad Sci USA*. 90(17):7915-22.

**B**

- 3) Balamurugan V., Sen A., Saravanan P., Rasool T.J., Yadav M. P., Bandyopadhyay S.K., Singh R.K. (2006). Development and characterization of a stable vero cell line constitutively expressing *peste des petits ruminants virus* (pprv) hemagglutinin protein and its potential use as antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for serosurveillance of pprv. *Cinical and vaccine immunology*, vol. 13, no. 12. 1367–1372.
- 4) Basivireddy J., Jacob M., Ramamoorthy P., Pulimood A.B., and Balasubramanian K.A, 2003. Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. *Biochemical Pharmacology*. 65: 683-695.
- 5) Basivireddy J., Jacob M, Pulimood AB., and Balasubramanian KA, 2004. indomethacin-induced renal damage: role of oxygen free radicals. *Biochem Pharmacol*. 67: 587-99.
- 6) Beckman BS ., Mason-Garcia M., Martinez MI.1990. Fermin CEnhanced expression of the beta II subspecies of protein kinase in differentiating erythroleukemia cells *Exp Cell Res*. 191(2):319-22.
- 7) Beckman ML., Bernstein EM., Quick MW. 1998. Protein Kinase C regulates the interaction between a GABA transporter and systaxin 1A. *J Neurosci*, 15; 18(16):6103-12.

- 8) Boelsterli U.A. 2003. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 1 ;192(3) :307-22.
- 9) Brooks P., Emery P., Evens J.F., Fenner H., Hawkey C.J., Patrono C., Smolen J., Breedveld F., Day R., Dougados M., Ehrich E.W., Gijon-Banos J., Kvien T.K., Van Rijswijk M.H., Warner T., and Zeidler H. 1999. Interpreting the clinical significance of the deferential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatol.* 38 : 779-788.
- 10) Bouaziz C., Abid-Essefi S., Bouslimi A., El Golli E., Bacha H. 2006 Cytotoxicity and related effects of t-2 toxin on cultured vero cells. *Toxicon*, 48: 343-352.
- 11) Brown G.C. (1995). Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem*; 232(1):188-91.
- 12) Brown GC, and Borutaite V. 1999. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem. Soc Symp.*66:17-25 .
- 13) Brown G.C., Borutaite V. 2002. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.*33(11):1440-50.
- 14) Brzozowski T., Konturek P.C., Konturek S.J., Sliwowski Z., Pajdo R., Drozdowicz D., Ptak A., Hahn E.G, 2001. Classic NSAID and selective cyclooxygenase COX-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc. Res. Tech.*5 :343-53.
- 15) Brzozowski T., Kwiecica S., Konturek P., Konturek1 S.J., Ptak A., Mitis-Musiol M, and Duda A .(2001). Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med Sci Monit* ; 4 : 592-599.
- 16) Brooks JD., Paton V. 1999. Potent induction of carcinogen defence enzymes with sulforaphane, a putative prostate cancer chemopreventive agent. *Prostate cancer Prostatic Dis*, 2(S3):S8.
- 17) Bu-Abbas A., Clifford MN., Ioannides C., Walker R.1995. Stimulation of rat hepatic USP-glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food Chem Toxicol*, 33(1):27-30.

C

- 18) Cann RL and Wilson AC. 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* 104 : 699-711.
- 19) Chan J., Rees CR., Song AK., Pham S. 2001. Usefulness of catheter-directed thrombolysis using alteplase in peripheral vascular occlusion. *proc (Bayl Univ Med Cent)*.14(1):3-7.
- 20) Champiat D., Roux A., Lhomme O., Nosenzo G. 1994. Biochemiluminescence and biomedical applications. *Cell Biol Toxicol*, 10(5-6):345-51.
- 21) Comhair SA., Erzurum SC. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283(2): L246-55.
- 22) Cossu C., Doyotte A., Jacquin MC., Babut M., Exinger A., and Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Envir Saf*. 38(2): 122-31.
- 23) Crill W.D. et Roehrig J.T., 2001. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells *Journal OF Virology*, 75, (16): 7769–7773.
- 24) Cross AR., Segal AW. 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1657(1): 1-22.

D

- 25) Da Silva JC Jr., Shi XJ., Johns CA., Jefferson DM., Grubman SA, Madias NE., Perrone RD. 1994. Experimental renal failure in the rat modulates cardiac Na,K-ATPase alpha 2 mRNA but not protein. *J Am Soc Nephrol*, 5(1) :27-35.
- 26) Decker T., Lohmann-Matthes M., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*. 150 :61-69.

- 27) Delbert Ch. 2000 Les mitochondries : biologie et incidences physipatologiques Editions Médicales Internationales. pp : 63-81.
- 28) Demers J.P. 1999. Les radicaux libres: une question d'équilibre. Editions Paris.
- 29) Devaux Y., Seguin C., Grosjean S., Talance N., Cameati V., Burlanda., Zannad F., Meistelman C ., Mertes P and Dan L, 2001. Lipopolysaccharides- induced increase of prostaglandins E2 is mediated by inducible nitric oxide synthase activation of the constitutive cyclooxygénase and induction of membrane-associated prostaglandins E synthase. *J. Immunol.* 167: 3962-3971.
- 30) Didem Deliorman Orhan., Nilüfer Sendogdu Orhan., Ender Ergun., Fatma Ergun. 2007 Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Journal of ethnopharmacology.* 112(1):145-51.
- 31) Dröge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

## E

- 32) Echtay KS., Esteves TC., Pakay JL., Jekabsons MB., Lambert AJ., Portero-Otín M., Pamplona R., Vidal-Puig AJ., Wang S., Roebuck SJ., Brand MD. 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J*, 15; 22(16) : 4103-4110.
- 33) Erben-Russ M., Bors W., Saran M.1987 Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 52(3): 393-412.
- 34) Essig DA., Nosek TM.1997. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species?. *Can J Appl Physiol.* 22(5):409-28.
- 35) Evans CP., Shih SJ., Dall'Era MA., He P., Yang JC., Westphal HR., Sweep CG. 2000. Regulation of angiogenesis in human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 3(S1):S12.

**F**

- 36) Finkel MS. 2000. Nitric oxide and viral cardiomyopathy. *Circulation*, 31; 102(18): 2162-4.
- 37) Freshney I. A. 1987. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. A.R. LISS, Inc., new York.
- 38) Fridovich I. 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen ?. *Ann N Y Acad Sci*, 893:13-8.
- 39) Fosslien E. 1998 Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci*. 28:67-81.
- 40) Fosslien E. 2001. Review. Mitochondrial medicine--molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Annals of clinical Laboratory Science*.31.
- 41) Fuhrman B Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*, 61(3) :549-54.

**G**

- 42) Galati EM Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forestieri AM, Trovato A, Tripodo MM. 1994 Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note D): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco*.40(11) :709-12.
- 43) Galvez J , de la Cruz JP, Zarzuelo A, Sanchez de la Cuesta F. 1995. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology*, 51(2) :127-33.
- 44) Girón ME, Aguilar I, Romero L, Sánchez EE, Pérez JC, Rodriguez-Acosta A. 2005. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. *rev. inst. Med. Trop. S. Paulo* 47(3) :147-15.

45) Govorkova EA., Murti G., Meignier B., De Taisne C., Webster R.G., (1996). African green monkey kidney (vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and b viruses. *J virology*, 70(8): 5519–5524.

46) Grace SC., Logan BA. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;355(1402):1499-510.

47) Grand RJ 2002. Section Editor's Commentary. Anti-TNF Therapies Have Eliminated the Need for Steroids in Pediatric Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.*;7(4):345-346.

## H

48) Haddad J.J. 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal*; 14:879–897.

49) Halliwell B ., Gutteridge M.C.1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J. I* ;219(1): 1-14 .

50) Han D., Williams E., Cadenas E. 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J.* 15;353(Pt 2): 411-6.

51) Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now. *Free. Radic. Biol. Med.* 33: 774-797.

51) Harrison R. 2002. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now. *Free. Radic. Biol. Med.* 33: 774-797.

52) Hobbs A. J., Higgs A. and Moncada S. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Ann. Rev. Pharm. Tox.* 39: 191-220

53) Huang H.Y., Wen Y., Valbuena D., Kriissel J.S., Polan M.L. (1997). Interleukin-1 regulates vero cell interleukin-1 receptor type I messenger ribonucleic acid expression. *Biology of reproduction* 57, 783-790.

54) Hulbert AJ, Else PL.2005. Membranes and the setting of energy demand. *J Exp Biol.* ;208(Pt 9):1593-9.

**J**

56) Jeaschke Hartmut. 2001. Oxidant stress and liver injury. *Toxicology Letters* 164,(1) :S4.

57) Jeantet M., Croguennec T., Schuk P., Brule G. 2006. *Sciences des aliments. Biochimie. Microbiologie. Procédés. Produits. Volume 1. Stabilisation biologique et physico-chimique. 1<sup>ère</sup> édition Paris : Edition Tec et Doc. Chapitre 4*

58) Ji B., Lounis N., Truffot-Pernot C., Grosset J. 1992. Selection of resistant mutants of *Mycobacterium avium* in beige mice by clarithromycin monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother.* ;36(12):2839-40.

59) Juurlink BH., (1997) Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. *Neurosci Biobehav Rev*;21:151–66.

**K**

60) Kalgutkar AS., Crews BC., Rowlinson SW., Garner C., Seibert K., and Marnett LJ.1998. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. *Science.* 280:1268-1270.

61) Kirkman HN., Rolfo M., Ferraris AM., Gaetani GF.1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* 1999 May 14;274(20):13908-14.

62) Konowalchuk J., Speirs J. I., et Stavric S., (1977). Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infeccion And Immunity.* 18(3):775-779.

63) Kroemer G, Dallaporta B, and Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev Physiol.*60 :619-642.

64) Kushnareva Y., Murphy AN., Andreyev A. 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem. J.* 368(pt2):545-53.

**L**

65) Lambeth J.D. 2005. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *EMBO.J.* 21: 6312-6320 .

66) Laubach VE, Shesely EG, Smithies O, Sherman PA. 1995. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;92(23):10688-92.

67) Legrand C., Bour J.M., Jacob C., Capiamont J., Martial A., Wudtke M., Kretzmer G., Demangel C., Duval D., Hache J, 1992. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *Journal of Biotechnology.* 25 : 231-243.

68) Lemasters JJ, Nieminen Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, and Crowe RA. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta.* 1366: 177-196

69) Lemasters JJ. 1999. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes : one paradox after another. *Cardiovasc Res* ; 44 (3) :470-473.

70) Levine RL. 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free. Radic. Biol. Med.* 32: 790-796.

71) Li W., Choy D.F., Lam M.S., Morgan T., Sullivan M.E. (2003) Use of cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins post toxicology *in vitro.* *J.M.* 17: 107-113.

72) Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, DuBois R , Graham D, and Simon LS. 2000. Unresolved issues in the role of Cyclooxygenase-2 in normal physiology processes and disease. *Arch.Int. Med.* 160:913-920

M

- 73) Macfarlane D.E., Sommerville R.G., (1969). VERO Cells (Cercopithecus Aethiops Kidney) Growth Characteristics and Viral Susceptibility for Use in Diagnostic Virology. *Archiv fur die gesamte Virusforschung* 27: 379—385.
- 74) MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF.1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13;94(10):5243-8.
- 75) Mardini I. A., and FitzGerald G. A. 2001. Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. A Growing Class of Anti-Inflammatory Drugs. *Mol Interv.*, 1:30-38
- 76) Massey V. 1994. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem.* 9 ; 269(36) : 22459-22462
- 77) Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T.2002. Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. *Hepatology.* ;35(3):544-51.
- 78) Mates JM., Pérez-Gómez C., Núñez De Castro I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32 : 595-603.
- 79) McManaman JL., Palmer CA, Wright RM, Neville MC.2002. Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion. *J Physiol.* 1;545(Pt 2):567-79.
- 80) Middleton E Jr., Drzewiecki G.1984. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem Pharmacol.* 1;33(21):3333-8.
- 81) Middleton E Jr., Kandaswami C.1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol.* 17;43(6):1167-79.
- 82) Middleton RE., Pheasant DJ., Miller C. 1996. Homodimeric architecture of a CIC-type chloride ion channel. *Nature.* 26;383(6598):337-40.
- 83) Mookerjee BK., Lee TP., Lippes HA., Middleton E Jr.1986. Some effects of flavonoids on lymphocyte proliferative responses. *J Immunopharmacol.* ; 8(3): 371-92.

- 84) Morel P., Vandiel B.1999. Adverse drug reaction monitoring and the Internet: evaluation of the use of the Internet by French Pharmacovigilance Centres and a non-exhaustive survey of websites of interest for collecting information about adverse drug reaction. *Therapie*. 54(5):525-32.
- 85) Moran JL., Peake SL., Solomon PJ.2001. Reporting of clinical trials using group sequential methods. *Crit Care Resusc*. 2001 Sep;3(3):146-147.
- 86) Murphy SK., Lindberg JB., Prussack DA.1994. Alteration of phosphoinositide metabolism by attenuation of cAMP resulting from expression of the H-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Dec 15;205(2):1121-9.
- 87) Nafia I., Nieoullon A., Le Goff LK., Had-Aissouni L.2005. Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability].24(5) : 502-509.
- 88) Nahapetian A.T., Thomas J.N, Thilly W.G., (1986). Optimization of environment for high density vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites. *j. cell sci*. 81, 65-103.
- 89) Namgoong SY., Son KH., Chang HW., Kang SS., Kim HP. 1994. Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture.
- 90) Nathan PA., Keniston RC., Meadows KD., Lockwood RS. 1994. The relationship between body mass index and the diagnosis of carpal tunnel syndrome.*Muscle Nerve*. 17(12) : 1491-1493.
- 100) Niitsu M., Ohya T, Xu XS, Samejima K.1995. Identification of N4-(2-propenal)spermidine as a major reaction product of malondialdehyde and spermidine. *Biol Pharm Bull*. 1995 Aug;18(8):1162-4.
- 101) Nishino H., Ohkita H, Fukamizu A, Satake K, Umeyama K, Kinoshita Y.1984. Prolongation of survival time of rat pancreatic islet allografts by tissue culture. *Transplant Proc*. ;16(6):1687-93. No abstract available.

102) Nohl H. (1994). Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann Biol Clin*; 52:199-204.

103) Staniek K., Kozlov AV. 2005. The existence and significance of a mitochondrial nitrite reductase. *Redox Rep.* 2005 ;10(6): 281-6.

## O

104) Obermeier MT., White RE., Yang CS.1995. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica.* 1995 Jun; 25(6): 575-84.

105) Okado-Matsumoto A., Fridovich I.2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 19;276(42):38388-93.

## P

106) Packer L., Tritschler HJ and Wessel K, 1997. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid.*Free Radic Biol Med* 22, 359-378.

107) Padmanbhan K Smith TJ.2002. A preliminary investigation of modified alginates as a matrix for gene transfection in a HeLa cell model. *Pharm Dev Technol.* 2002 Jan;7(1):97-101.

108) Pairet M., and Engelhardt G, 1996. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fund. Clin. Pharmacol.* 10:1-17.

109) Patrignani P Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, Cipollone F, Ganci A, Créminon C, Maclouf J,1994. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Dec;271(3):1705-12.

110) Pinheiro RM Calixto JB.2002. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation *Inflamm Res.* 2002 Dec;51(12):603-10

111) Phonnok S., (2008). Cytotoxicity test of microbial extracts against cancer cell lines *in vitro*. Srinakharinwirot University, Bangkok.

112) Parij N Nagy AM, Fondu P, Nève J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. *Eur J Pharmacol.* 1998 Jul 10;352(2-3):299-305.

113) Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. 1999. 'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons ; 4 :1-7.*

114) Powers SK and Lennon SL , 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.

115) P-Stoforidis Angelis., Vajda FJ., Christophidis N.1991. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on human polymorphonuclear leucocyte function in buffer and plasma. *Clin Exp Rheumatol.* 16(6): 703-708.

## R

116) Read MA., 1995. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *Am J Pathol ; 147(2) : 278-292.*

117) Richter C., Park JW., Ames BN.1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Sep;85(17):6465-7.

118) Rowlinson SW., Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutkar AS, Stallings WC.2003. Kurumbail RG, Marnett LJ. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385 *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):45763-9.

## S

119) Sadowski T and Steinmeyer J, 2001. Minocycline inhibits the production of inducible nitric oxide synthase in articular chondrocytes. *The Journal of Rheumatology.* 28: 336-340.

120) Sandra Yucra., Gasco M, Rubio J, Nieto J, Gonzales GF. 2008. Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats. *Fertil Steril.* 89(5):1461-7.

121) Scheiman J.M., Tillner A., Pohl T., Oldenburg A., Angermüller S., Görlach E., Engel G., Usadel K H., and K Kusterer K, 1997. Reduction of non-steroidal antiinflammatory drug induced gastric injury and leucocyte endothelial adhesion by octreotide. *Gut.* 40: 720-725.

122) Soares S., Martins H., Gutiérrez-Merino C., Aureliano M., 2008. Vanadium and cadmium *in vivo* effects in teleost cardiac muscle: Metal accumulation and oxidative stress markers 147 : 168-178 .

123) Somasundaram S., Sigthorsson G., Simpson R.J., Watts J., Jacob M., Tavares I.A., Rafi S, Roseth A., Foster R., Price A.B., Wrigglesworth J.M., and Bjarnason I, 2000. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID enteropathy in the rat. *Aliment Pharmacol Ther.* 14: 639-650.

124) Steinmeyer J. 2000. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res.* 2: 379-385 .

125) Sun J., Zhang X., Broderich M and Fein H, 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors.* 3: 276-284.

126) Szewczyk A., Wojtczak L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* 2002 Mar;54(1):101-27.

## T

127) Tang B., Jiang Q, He X, Shen H. 1999. [Study on the surface diffuse reflectance ultraviolet-visible spectra of the multicomponent metal catalysts]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.* 1999 Feb;19(1):98-101.

128) Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V.( 2001). Phosphorylation-dependent alteration in myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart. *Am J Respir Crit Care Med*; 163:362–367.

129) Tennant JR. 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. 2:685-94.

130) Ternaux., Portalier P. 2002. Effect of quercetine on survival and morphological properties of cultured embryonic rat spinal motoneurons. *Neurosci Lett*. 25; 332(1): 33-6.

131) Todd P. A. and Sorokin E. M. (1988). Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. 35: 244-285.

132) Tunctan B., Altug S, Uludag O, Demirkay B, Abacioglu N.2003. Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis *Pharmacol Res*. 2003 Jul;48(1):37-48.

## V

133) Verma SK Jain V., Katewa SS. 2009. Blood pressure lowering, fibrinolysis enhancing and antioxidant activities of cardamom (*Elettaria cardamomum*). *Indian J Biochem Biophys*. 46(6):503-6.

## W

134) Wattenberg LW., Borchert P, Destafney CM, Coccia JB.1983 Effects of p-methoxyphenol and diet on carcinogen-induced neoplasia of the mouse forestomach. *Cancer Res*. 43(10):4747-51.

135) Welch TR. 1992. Current management of selected childhood renal diseases.. *Curr Probl Pediatr*. 1992 Nov-Dec;22(10):432-51.

**Y**

136) Yoshino K., Hara Y, Sano M, Tomita I.1994. Antioxidative effects of black tea theaflavins and thearubigin on lipid peroxidation of rat liver homogenates induced by tert-butyl hydroperoxide. *Biol Pharm Bull.* 1994 Jan;17(1):146-9.

**Z**

137) Zingarelli B., Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Kong S, Aronow BJ.2003. Absence of poly(ADP-ribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury. *Mol Med.* 2003 May-Aug;9(5-8):143-53.

## ANNEXES

## TABLEAUX

**Tableau 1 : Effet cytotoxique dose du diclofénac-Na sur la viabilité des cellules VERO**

Diclofénac-Na en ( $\mu$ M)	%toxicité	%toxicité	%Toxicité moyen	écart-type
0	0,000	0,000	0,000	0,000
50	0,000	0,000	0,000	0,000
100	41,660	41,660	41,660	0,000
250	49,040	49,040	49,040	0,000
500	52,080	52,080	52,080	0,000
750	55,550	52,080	53,815	2,454
1000	62,500	62,500	62,500	0,000
2500	91,740	89,280	90,510	1,739
5000	97,400	97,400	97,400	0,000

**Tableau 2 : Effets cytotoxiques temps et dose du diclofénac-Na sur la viabilité des cellules VERO**

Diclofénac-Na en( $\mu$ M)	Pourcentage de cytotoxiques (%)					
	2hmoy	4hmoy	6h moy	Ecart-type	24h moy	Ecart-type
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
50	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
100	0,000	0,000	0,000	0,000	41,660	0,000
250	0,000	0,000	0,000	0,000	49,040	0,000
500	0,000	0,000	0,000	0,000	52,080	0,000
750	0,000	0,000	25,00	2,454	53,815	2,454
1000	0,000	0,000	40,00	0,000	62,500	0,000
2500	0,000	0,000	40,83	1,739	90,510	1,739
5000	0,000	0,000	57,19	0,000	97,400	0,000

**Tableau 3 : Pourcentage de relargage du lactate déshydrogénase**

Diclofénac-Na ( $\mu\text{M}$ )	DO1	DO2	DO moy	Ecart-type	% au total	Ecart-type
0	0,069	0,072	0,071	0,003		
50	0,097	0,105	0,101	0,006	9,154	0,528
75	0,144	0,148	0,146	0,003	22,664	0,442
100	0,181	0,174	0,177	0,005	32,213	0,826
250	0,193	0,181	0,187	0,009	35,175	1,646
500	0,202	0,196	0,199	0,004	38,609	0,803
1000	0,235	0,228	0,231	0,005	48,520	1,132
2500	0,282	0,274	0,278	0,005	62,649	1,216
<b>5000</b>	0,317	0,318	0,318	0,001	74,603	0,197

**Tableau 4 : Effet de la Quercétine sur le relargage de la LDH**

Quercétin ( $\mu\text{M}$ )	DO moy	% au témoin	Ecart-type
0	0,071	0,000	0,000
5	0,082	3,437	0,352
10	0,110	11,886	3,518
25	0,141	21,241	0,352
50	0,198	38,441	2,463
75	0,212	42,515	1,935
100	0,246	52,889	2,111

**Tableau 5 : Effet de la Quercétine 10  $\mu$ M sur le relargage de la LDH par les cellules VERO en présence des concentrations croissantes de diclofénac-Na**

Dicl+10 $\mu$ M Q	DO moy	Ecart-type	%au témoin	Ecart-type
0	0,070	0,004		1,055
50	0,083	0,004	3,765	0,879
75	0,111	0,008	12,199	1,935
100	0,119	0,004	14,759	1,055
250	0,137	0,006	20,181	1,407
1000	0,182	0,010	33,735	2,463
2500	0,224	0,004	46,386	1,055
5000	0,266	0,009	58,886	2,287

**Tableau 6 : Cinétique de l' effet de Diclofénac-Na sur la production des anions superoxyde par les cellules VERO après stimulation par le PMA 160 nM.**

Temps (min) Dic-Na ( $\mu$ M)	0	5	10	15	20	25	30
0	0.377 $\pm$ 0.042	1.390 $\pm$ 0.052	1.425 $\pm$ 0.019	1.554 $\pm$ 0.032	1.589 $\pm$ 0.024	1.648 $\pm$ 0.020	1.719 $\pm$ 0.015
50	0.298 $\pm$ 0.034	1.334 $\pm$ 0.012	1.343 $\pm$ 0.009	1.418 $\pm$ 0.029	1.476 $\pm$ 0.015	1.497 $\pm$ 0.007	1.530 $\pm$ 0.010
100	0.241 $\pm$ 0.010	1.306 $\pm$ 0.009	1.339 $\pm$ 0.009	1.42 $\pm$ 0.007	1.446 $\pm$ 0.005	1.484 $\pm$ 0.009	1.514 $\pm$ 0.019
250	0.201 $\pm$ 0.01	1.324 $\pm$ 0.004	1.305 $\pm$ 0.015	1.409 $\pm$ 0.009	1.451 $\pm$ 0.006	1.48 $\pm$ 0.012	1.526 $\pm$ 0.031
500	0.222 $\pm$ 0.01	1.345 $\pm$ 0.003	1.387 $\pm$ 0.009	1.428 $\pm$ 0.013	1.467 $\pm$ 0.010	1.495 $\pm$ 0.017	1.530 $\pm$ 0.011
750	0.205 $\pm$ 0.017	1.318 $\pm$ 0.007	1.335 $\pm$ 0.010	1.395 $\pm$ 0.008	1.429 $\pm$ 0.006	1.476 $\pm$ 0.013	1.512 $\pm$ 0.004
1000	0.181 $\pm$ 0.007	1.206 $\pm$ 0.014	1.248 $\pm$ 0.02	1.314 $\pm$ 0.013	1.344 $\pm$ 0.011	1.387 $\pm$ 0.012	1.398 $\pm$ 0.01
2500	0.152 $\pm$ 0.008	1.078 $\pm$ 0.007	1.26 $\pm$ 0.010	1.164 $\pm$ 0.016	1.190 $\pm$ 0.008	1.247 $\pm$ 0.005	1.293 $\pm$ 0.007
5000	0.110 $\pm$ 0.010	1.098 $\pm$ 0.019	1.143 $\pm$ 0.031	1.181 $\pm$ 0.019	1.217 $\pm$ 0.011	1.267 $\pm$ 0.016	1.274 $\pm$ 0.017

**Tableau 7 : Effet de la quercétin sur la production des anions superoxyde par les cellules VERO**

Quercétin ( $\mu\text{M}$ )	DO1	DO	DO moy	Ecart-type
0	0.377	0.351	0.364	0.018
5	0.130	0.122	0.126	0.006
10	0.116	0.128	0.122	0.008
50	0.132	0.149	0.141	0.012
75	0.174	0.184	0.179	0.007
100	0.185	0.201	0.193	0.011

**Tableau 8 : Effet de la quercétin sur la production des anions superoxyde par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes de diclof énac-Na**

Dic-Na( $\mu\text{M}$ ) %O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0	50	100	250	500	1000	2500	5000
Dic-Na %	100.000	89.321	88.510	89.010	89.105	87.256	75.218	74.799
Dic-Na %	100.000	89.005	88.07	88.77	89.005	87.958	75.218	74.694
Dic-Na % moy	100.000	89.163	88.290	88.890	89.057	87.607	75.485	74.747
Ecart-type	0.000	0.223	0.311	0.170	0.068	0.496	0.378	0.074
(D+Q) %	100.000	63.520	64.680	67.165	67.520	66.214	65.214	64.132
(D+Q) %	100.000	64.740	64.510	66.667	67.073	66.764	65.530	64.165
(D+Q) % moy	100.000	64.130	64.595	66.916	67.297	66.489	65.590	64.149
Ecart-type	0.000	0.863	0.120	0.352	0.316	0.389	0.085	0.023

**Tableau 9 : effet du Diclofénac-Na sur la production de Monoxyde D'azote (NO)**

Dic-Na( $\mu$ M)	0	50	75	100	250	500	750	1000	2500	5000
DO1	0.185	0.179	0.161	0.159	0.215	0.192	0.229	0.275	0.318	0.502
DO2	0.191	0.165	0.138	0.145	0.203	0.186	0.227	0.238	0.323	0.517
DOmoy	1.88	0.172	0.150	0.152	0.209	0.189	0.228	0.257	0.321	0.510
Ecart-type	0.004	0.010	0.016	0.010	0.008	0.004	0.001	0.026	0.004	0.011
(NO) $\mu$ M/ml	5.697	8.190	7.119	7.238	9.952	9.000	10.857	12.214	15.262	24.262

**Tableau 10 : Effet de la quercétin sur la production de Monoxyde D'azote (NO) par les cellules VERO traitées par des concentrations croissante du Diclofénac-Na**

Dic-Na ( $\mu$ M)	DOmoy	(NO) $\mu$ M/ml	Ecart-type	DOmoy (D+Q)	(NO) $\mu$ M/ml	Ecart-type
0	0.182	7.109	0.055	0.152	5.937	0.165
50	0.174	6.816	0.138	0.12	4.687	0.110
75	0.163	6.367	0.055	0.1225	4.785	0.138
100	0.173	6.777	0.414	0.1345	5.253	0.193
250	0.246	9.628	0.193	0.153	5.976	0.110
500	0.276	10.781	0.718	0.2115	8.261	0.359
750	0.353	13.789	0.165	0.247	9.648	0.055
1000	0.504	19.716	0.538	0.3015	11.777	0.027
5000	0.640	25.019	0.745	0.5935	23.183	0.248

**Tableau 11 : Effet de la quercétin sur la production de Monoxyde D'azote (NO) par les cellules VERO**

Quercétin( $\mu$ M)	0	5	10	25	50	75	100
DO1	0.181	0.176	0.165	0.228	0.232	0.277	0.352
DO2	0.173	0.162	0.158	0.211	0.251	0.289	0.334
DO moy	0.177	0.169	0.1615	0.2195	0.2415	0.283	0.343
Ecart-type	0.0056	0.0098	0.0049	0.0120	0.0134	0.008	0.0127
NO( $\mu$ mol/ml)	6.914	6.601	6.308	8.574	9.433	11.054	13.398
Ecart-type	0.220	0.386	0.193	0.469	0.524	0.331	0.497

**Tableau 12 : Effet du diclofénac-Na sur la peroxydation lipidique**

Dic-Na( $\mu$ M)	0	50	100	125	750	1000	2500	5000
DO moy	0.259	0.224	0.413	0.443	0.587	0.743	0.813	0.967
MDA(nmol/ml)	11.185	9.671	17.870	19.168	25.377	32.149	35.178	41.820
Ecart-type	0.826	0.031	0.306	0.184	0.520	0.367	0.490	0.398

**Tableau 13 : Effet du diclofénac-Na sur les taux de MDA produits par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes du Diclofénac-Na**

<b>Dic-Na (<math>\mu</math>M)</b>	<b>DO moy</b>	<b>MDA (nmol/ml)</b>	<b>Ecart-type</b>	<b>D+Q moy</b>	<b>MDA (nmol/ml)</b>	<b>Ecart-type</b>
<b>0</b>	<b>0.184</b>	<b>7.940</b>	<b>0.337</b>	<b>0.160</b>	<b>6.923</b>	<b>0.122</b>
<b>50</b>	<b>0.158</b>	<b>6.837</b>	<b>0.428</b>	<b>0.139</b>	<b>5.993</b>	<b>0.214</b>
<b>75</b>	<b>0.195</b>	<b>8.416</b>	<b>0.214</b>	<b>0.150</b>	<b>6.490</b>	<b>0.122</b>
<b>100</b>	<b>0.217</b>	<b>9.368</b>	<b>0.092</b>	<b>0.156</b>	<b>6.728</b>	<b>0.214</b>
<b>250</b>	<b>0.284</b>	<b>12.288</b>	<b>0.184</b>	<b>0.194</b>	<b>8.394</b>	<b>0.306</b>
<b>500</b>	<b>0.429</b>	<b>18.541</b>	<b>0.643</b>	<b>0.354</b>	<b>15.296</b>	<b>0.337</b>
<b>750</b>	<b>0.526</b>	<b>22.760</b>	<b>0.367</b>	<b>0.412</b>	<b>17.827</b>	<b>0.367</b>
<b>1000</b>	<b>0.695</b>	<b>30.072</b>	<b>0.367</b>	<b>0.579</b>	<b>24.923</b>	<b>1.101</b>
<b>2500</b>	<b>0.774</b>	<b>33.490</b>	<b>0.551</b>	<b>0.594</b>	<b>25.702</b>	<b>0.428</b>
<b>5000</b>	<b>1.183</b>	<b>51.166</b>	<b>1.989</b>	<b>0.768</b>	<b>33.231</b>	<b>0.857</b>

**Tableau 14 : Evaluation du système antioxydant dans les cellules VERO par la mesure de GSH**

Dic-Na (µM)	0	50	75	100	250	500	1000	2500	5000
DO1	0.339	0.347	0.329	0.299	0.245	0.218	0.173	0.166	0.091
DO2	0.328	0.342	0.326	0.305	0.261	0.212	0.175	0.161	0.107
DOmoy	0.333	0.344	0.327	0.302	0.253	0.215	0.174	0.163	0.099
Ecart-type	0.007	0.003	0.002	0.004	0.011	0.004	0.001	0.003	0.011
Ecart-type	20.589	9.358	5.615	11.230	29.948	11.230	3.743	9.358	29.948
GSH (nmol/ml)	882,794	911,91	866.91	799.41	669.70	569.117	460.588	432.79	262.06

**Tableau 15 : Effet de la quercétine sur les taux de glutathion réduit (GSH) produits par les cellules VERO traitées par des concentrations croissantes du Diclofénac-Na**

Dic-Na (µM)	D DO Moy	D+Q DO Moy	D (nmol/ml)	Ecart-type	D+Q (nmol/ml)	Ecart-type
0	0.384	0.39	1016.470	3.743	1032.352	3.743
50	0.394	0.429	1042.941	37.435	1135.588	37.435
75	0.4149	0.447	1098.264	22.461	1183.235	22.461
100	0.3695	0.426	978.088	16.845	1128.970	16.845
250	0.353	0.408	934.411	13.102	1081.323	13.102
500	0.307	0.367	812.647	50.537	972.794	50.537
750	0.2685	0.320	710.735	24.332	848.382	24.332
1000	0.223	0.286	590.294	18.717	757.058	18.717
2500	0.1755	0.229	464.558	31.819	607.5	31.819
5000	0.099	0.156	262.058	20.589	414.264	20.589

**Tableau 16 : Effet de la quercétine sur les taux de glutathion réduit (GSH)**

<b>Quercétine(<math>\mu</math>M)</b>	<b>DO moy</b>	<b>Ecart-type</b>	<b>GSH(nmol/ml)</b>	<b>Ecart-type</b>
<b>0</b>	<b>0.341</b>	<b>0.0035</b>	<b>902.647</b>	<b>9.264</b>
<b>5</b>	<b>0.321</b>	<b>0.00141</b>	<b>849.705</b>	<b>3.732</b>
<b>10</b>	<b>0.286</b>	<b>0.071</b>	<b>757.058</b>	<b>187.941</b>
<b>25</b>	<b>0.184</b>	<b>0.058</b>	<b>487.058</b>	<b>153.529</b>
<b>50</b>	<b>0.164</b>	<b>0.0127</b>	<b>434.117</b>	<b>33.617</b>
<b>100</b>	<b>0.122</b>	<b>0.007</b>	<b>322.941</b>	<b>18.529</b>

## ANNEXE 2

**Préparation des solutions:****Préparation du milieu de culture (DMEM):**

- SVF..... 10%
- Glutamine..... 10 ml
- Antibiotique..... 1.8 ml

Le milieu de culture doit être filtré pour éviter tout type de contamination.

**Solution de trypsine-Versene: pH=7.2.****- Solution de trypsine: PH =7.2 – 7.3.**

- NaCl..... 8g
- KCl..... 0.2g
- Rouge de phénol.....0.02g.
- Trypsine..... 2.5g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O..... 1.41g

(Quantité suffisante pour 1000ml).

**-Solution de versene :**

- NaCl..... 8g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O..... 1.41g
- Versene..... 0.2g
- Rouge phénol..... 0.019g
- KCl..... 0.29g

Quantité suffisante pour préparer 1000 ml de solution versene.

**-L'eau physiologique :**

- NaCl..... 9g
- Eau distillée (autoclavage a 105°C pendant 30min).... 1000ml

Quantité suffisante pour préparer 1000ml d'eau physiologique.

La solution sera filtrée par la suite.

**Solution de griess:**

-N-naphthylène-diamine dihydrochloride.....	0.03g
-Sulffanilamide.....	0.3g
-Eau distillé.....	30ml
-Acide orthophosphorique à 80%.....	882 µl

**Solution NBT:**

- NBT.....	0.02 g
- DMSO.....	250 µl
-PBS.....	750 µl
-PBS (compléter).....	10ml

**Solution de DTNB:**

-Pour une solution de 0.03 M.	
-Réactif DTNB.....	0.02 g
-Tampon phosphate (0.2 M, PH= 8).....	16.5 ml

**Solution NAD**

-NAD. ....	28.5 mg
-Eau distillée.....	4 ml

**Solution lactate:**

-Lactate.....	65.62 µL
-Tampon phosphate (10 mM,PH=9).....	20 ml

**Solution TBA:0.8%**

-TBA.....	0.032 g
-Acide acitique. 20%, PH=3.5.....	4 ml

**Solution SDS:**

-SDS.....	0.0324 g
-Acide acitique ph3.5 à 20 %.....	500µl

## ANNEXE 3

## CORRELATIONS

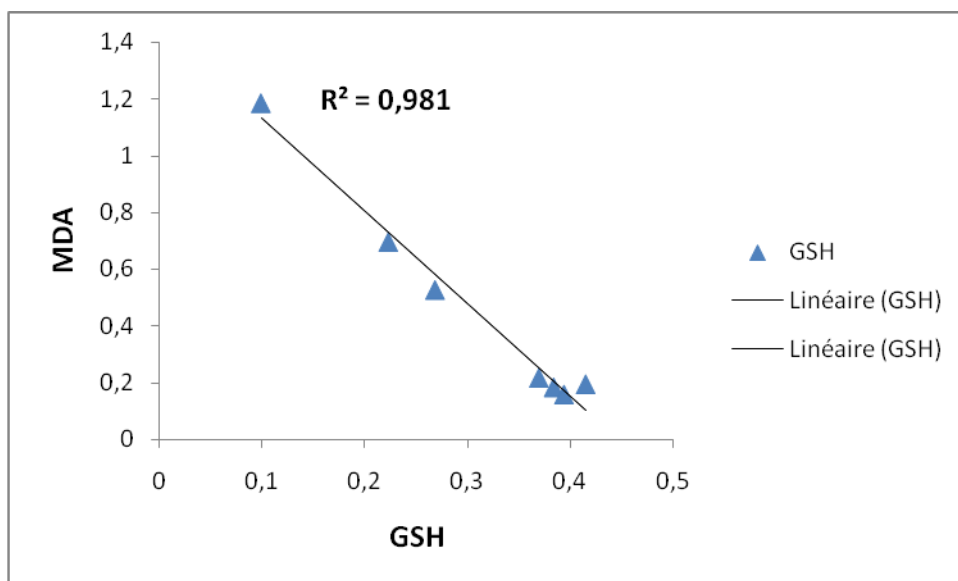


Figure 34 Correlation entre l'oxydation lipidique et la GSH

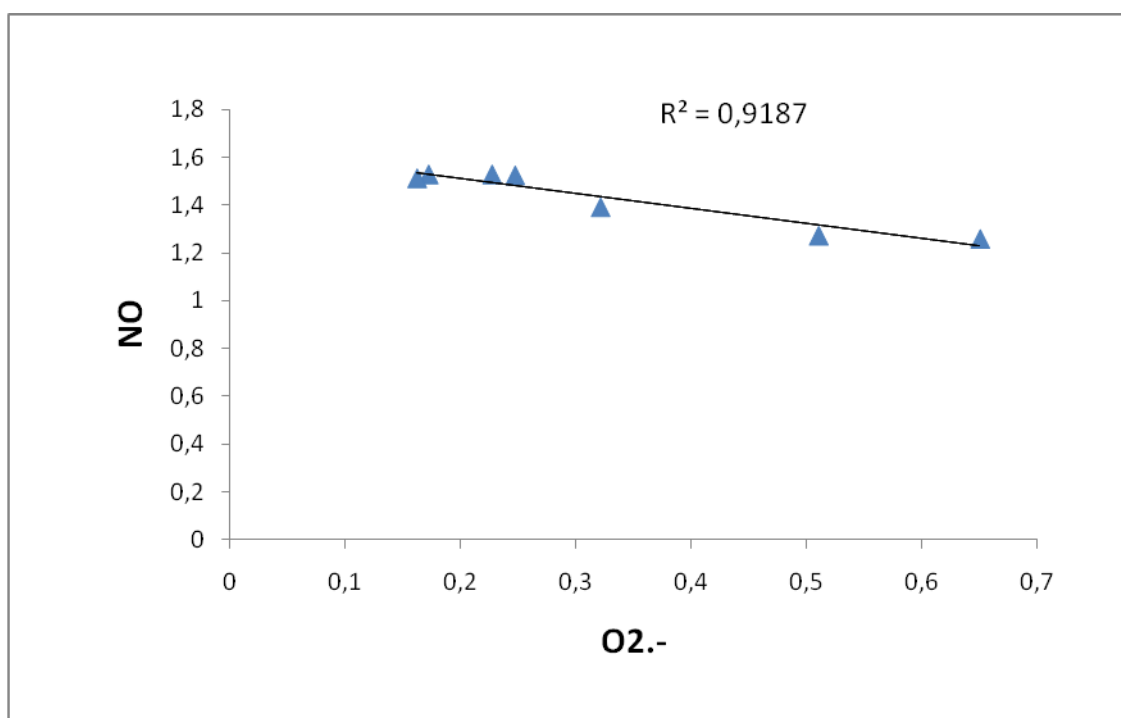


Figure 35 Corrélation entre la production d'anion superoxyde et le NO

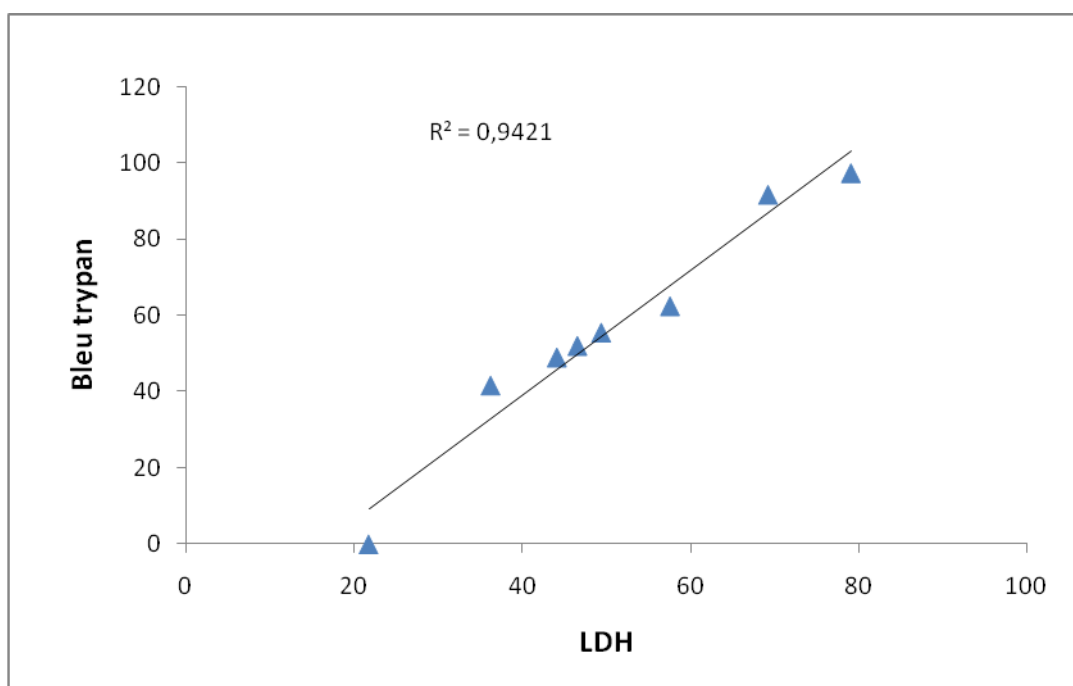


Figure 36 Corrélation entre la LDH et le taux de la mort cellulaire

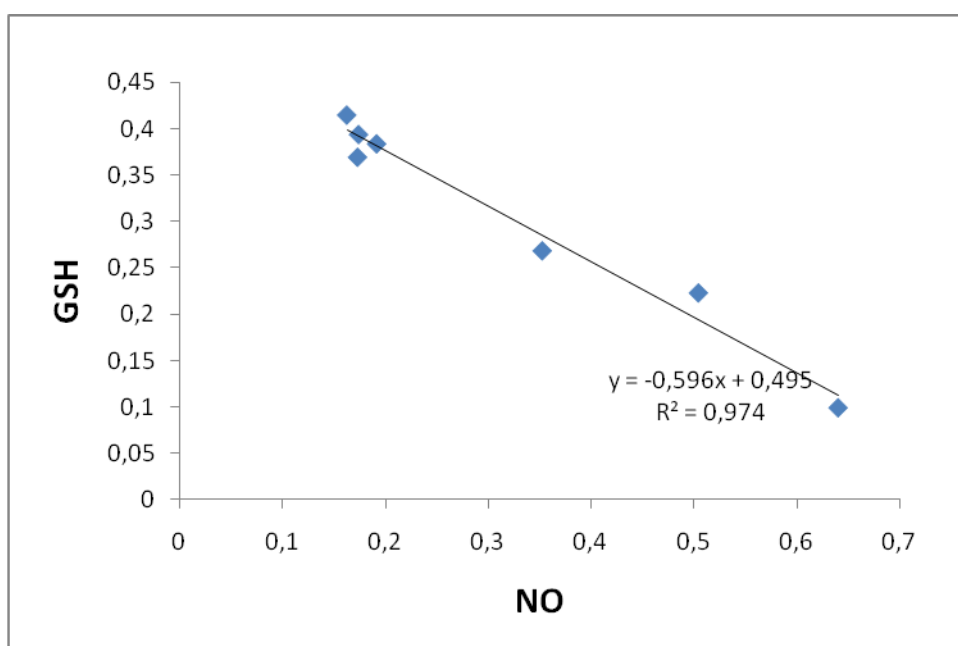


Figure 37 Corrélation entre le taux GSH et le taux de nitrite NO