

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de
la Vie

Département de Biologie Moléculaire
et Cellulaire



جامعة جيجل

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2691

**Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme
de Master en Biologie**

Option : Pharmacologie Expérimentale

Intitulé

***Evaluation du profil de stress oxydatif induit par le
Diclofénac et ses dérivés de biodégradation chez la souris***

Membre du jury:

Président : Dr. KEBIECHE Mohamed
Examineur : Dr. RECHRECHE Hocine
Examineur : Dr. ALYANE Mohamed
Encadreur : Mme BENGUEDOUAR Lamia

Présenté par :

BIROUK Sarra
HADJICI Mériem
HARROUCHE Nouzha

Remerciement

Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux à DIEU le tout puissant qui a inséré dans nos cœurs la patience et le courage pour pouvoir réaliser ce travail.

Nombreux sont ceux qui ont contribués d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. C'est là un geste tout naturel que de remercier ces personnes :

À notre guide et encadreur assidu, Mme BENGUEDOUAR Lamia, pour sa patience, sa grande disponibilité et les conseils avisés qu'elle nous a constamment prodigués. Nous exprimons nos plus vifs remerciements et lui témoignons notre profonde reconnaissance.

Un remerciement spécial aux membres de jury :

À Dr. KEBEICHE Mohamed qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury. Hommage respectueux,

À Dr. RECHRECHE Hocine, Pour le temps et la patience qu'il a consacré à examiner notre travail ainsi que pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de faire partie de ce jury.

Un grand merci à Dr. ALYANE Mohamed, pour l'honneur qu'il nous fait en participant au jury de ce travail.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants du département Biologie Moléculaire et Cellulaire, qui ont contribué à notre formation.

Nous remercions infiniment tous les membres du laboratoire, et plus particulièrement :

À Mme ZINE Houria du laboratoire de pédagogie pour son soutien .Toujours prête à nous rendre service, avec sa patience et sa profonde gentillesse.

À Mr. BOUSDIRA Yahia et M^{lle} AISSAOVI Salima du laboratoire de Toxicologie Moléculaire pour leur accueil, leur modestie et bonne humeur. Ils ont veillé à ce qu'on ait tout le matériel et les produits nécessaires à la réalisation de notre travail de recherche.

Nous adressons l'expression de notre profonde gratitude :

Au professeur KHELILILI du laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie qui nous a fourni tout le matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail.

À Mr.FERKHI pour nous avoir permis de réaliser une bonne partie de notre travail dans le laboratoire de Chimie.

Nous leurs exprimons nos plus vifs remerciements et leur témoignons notre profonde reconnaissance.

Nous adressons nos remerciement à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à se présent travail.

Enfin, nous remercions infiniment nos familles, nos amis qui ont été là dans les bons comme dans les mauvais moments, pour leur soutien inestimable et leur accompagnement jusqu'au jour de la soutenance.

Merci pour tout le monde !

Sommaire

Sommaire	i
Liste des abréviations	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Introduction	1
Partie 1 : Analyse bibliographique	
Chapitre I : Le stress oxydatif	2
I.1. Les radicaux libres	2
I.2. Les sources des ROS.....	4
I.3. Le système antioxydant.....	5
I.4. Les dommages du stress oxydant.....	10
Chapitre II : Pharmacologie du Diclofénac.....	14
II.1. Structure et propriétés.....	15
II.2. Pharmacocinétique.....	16
II.3. Métabolisme du Diclofénac.....	16
II.4. Pharmacodynamie.....	17
II.5. Toxicité du Diclofénac	18
II.6. Dégradation du Diclofénac dans l'environnement	18
Partie 2 : Partie expérimentale	
I. Etude expérimentale de l'effet du Diclofénac et ses dérivés sur le profil de stress oxydatif.....	19
I.1. Les animaux	19
I.2. Les traitements	19
I.3. Groupes Expérimentaux.....	19
I.4. Sacrifice des animaux et prélèvement du foie	20
I.5. Evaluation du stress oxydatif dans le foie	20
I.6. Evaluation du stress oxydatif dans le plasma et le sérum	25
I.7. Evaluation statistique	26

II. Résultats et Discussions.....	27
II.1. Evaluation du stress oxydatif dans le foie	27
II.2. Evaluation du stress oxydatif dans le plasma et le sérum.....	34
Conclusion.....	37
Références bibliographiques	38
Résumé	44
Annexes.....	46

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
4-HNE	4-Hydroxynonéal
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CAT	Catalase
CDNB	1-Chloro-2-4-Dinitrobenzène
$\text{CO}_3^{\circ-}$	Radical Carbonate
CuZn-SOD	SOD à Cuivre et à Zinc
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
CYP2C9	Cytochrome P450 2C9
DTNB	5-5'-Dithiobis2-Nitrobenzoïque
FAOOH	Acides Gras Hydroperoxides
GPx	Glutathion Peroxydase
GR	Glutathion Réductase
GSH	Glutathion Réduit
GSSG	Glutathion Oxydé
GST	Glutathion S-Transférase
HO_2°	Radical Hydroperoxyle
HOCl	Acide Hypochlorure
MDA	Malondialdehyde
Mn-SOD	SOD à Manganèse
NaCN	Cyanide de Sodium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBT	Nitro Blue Tétrazolium
NO°	Monoxyde d'azote
NO_2°	Dioxyde d'azote
NOX	NADPH Oxydase
$\text{O}_2^{\circ-}$	Anion Superoxyde
OH°	Radical Hydroxyle
ONOO^-	Peroxynitrite
Prx	Thiorédoxine Peroxydase
QR	Quercétine

RNS	Espèces Réactives de l'azote (Reactive Nitrogen Species)
RO°	Radical Alcoxyle
ROO°	Radical Peroxyl
ROOH	Hydroperoxydes Lipidiques
ROS	Espèces Réactives De L'oxygène (ReactiveOxygenSpecies)
SOD	Superoxyde Dismutase
TBA	Acide Thiobarbiturique
TBARS	Thiobarbituric Reactive Species
TCA	Acide Trichloroacétique
TNB	Thionitrobenzoïque
TrxR	Thiorédoxine Réductase
XO	Xanthine Oxydase

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des défenses antioxydants enzymatiques	6
Figure 2 : Schéma des réactions d'élimination de H ₂ O ₂ par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR.....	8
Figure 3: Schéma des réaction d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C.....	9
Figure 4: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétiques des cellules	12
Figure 5 : Formule du Diclofénac	15
Figure 6 : Voies principales de métabolisme de Diclofénac chez l'homme : l'hydroxylation et la glucuronidation.....	17
Figure 7 : Structure moléculaire proposée de 5HDQI (de p-Benzoquinone imine de 5-HydroxiDiclofénac), le métabolite principal de la biodégradation en sédiment de fleuve.	18
Figure 8 : Variation du taux des MDA cytosoliques hépatique chez les souris traités par le Diclofénac (DJA, DF, DT) ces Produits de bioDégradation et la Quercétine	28
Figure 8 : Variation des concentrations de GSH cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA, DF, DT) ces Produits de bioDégradation et la Quercétine.....	29
Figure 10 : Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA, DF, DT) ces Produits de bioDégradation et la Quercétine.....	30
Figure 11 : Variation de l'activité enzymatique de la Catalase cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA, DF, DT) ces Produits de bioDégradation et la Quercétine	32
Figure 12: Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA, DF, DT) ces Produits de bioDégradation et la Quercétine.....	33
Figure 13 : Variation des concentrations de GSH plasmatique chez les souris traitées par le Diclofénac traités par le Diclofénac (DJA, DF, DT) ces Produits de bioDégradation et la Quercétine	34
Figure 14: Variation de l'activité enzymatique de la GST sérique chez les souris traitées par le Diclofénac traités par le Diclofénac (DJA, DF, DT) ces Produits de bioDégradation et la Quercétine.....	35

Liste des tableaux

Tableau I : Vue d'ensemble des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	3
Tableau II : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur le taux des MDA cytosolique	27
Tableau III : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur la concentration de GSH cytosolique	29
Tableau IV : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de GST cytosolique	30
Tableau V : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la Catalase cytosolique.....	31
Tableau VI : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique	33
Tableau VII : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur la concentration du GSH plasmatique	34
Tableau VIII : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique du GST sérique	35

Introduction

Suite à leur utilisation, les médicaments sont souvent partiellement métabolisés; ainsi ces substances pharmaceutiques et/ou leurs métabolites sont rejetés continuellement dans les eaux usées. Leur présence et accumulation dans les eaux naturelles constituent une pollution émergente conduisant à la perturbation des écosystèmes. L'exposition continue à ces xénobiotiques pourrait conduire à un état de stress oxydatif ayant des effets nocifs conduisant à différentes pathologies.

Pour se protéger contre les effets délétères des xénobiotiques l'organisme utilise un système de défense enzymatique et non enzymatique pour réduire les attaques des macromolécules cellulaires par les ROS.

Le diclofénac est un AINS largement utilisé pour le traitement des maladies inflammatoire très répondues (polyarthrites, rhumatismes) ainsi que dans l'usage vétérinaire. Il est retrouvé dans l'environnement sous forme intacte c.-à-d. médicament issue des déchets hospitaliers ou pharmaceutiques après péremptions des stocks non utilisés, ainsi que sous forme de métabolites réactifs éliminés par voie urinaire et fécale après biotransformation hépatique.

La présente étude est axée sur la détermination de l'effet du diclofénac *in vivo* utilisé sous deux formes susceptibles de se retrouver dans la nature, s'agissant du principe actif d'une part et ses dérivés de biodégradation d'autre part, sur le profil de stress oxydatif par l'évaluation des paramètres enzymatiques (GST, SOD et CAT) et non enzymatiques (GSH et MDA) de détoxification dans le foie et le sang.

Des études menées dans plusieurs pays ont permis de montrer la présence de plus de 80 produits pharmaceutiques dans des eaux usées urbaines à des concentrations variant du ng L^{-1} au $\mu\text{g L}^{-1}$. Les temps de résidence des médicaments dans l'environnement varient en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

***Partie I : Analyse
bibliographique***

Chapitre I : Stress Oxydatif

I. Le stress oxydatif

En condition physiologique, l'oxygène, élément indispensable à la vie, est transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire (sous forme d'ATP) pour assurer ses multiples fonctions.

Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait car 0.4 à 4% de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (dont font partie les radicaux libres) particulièrement réactionnelles (Pincemail et *al.*, 2002 ; Haleng et *al.*, 2007 ; Weber, 2009).

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les prooxydants et les antioxydants (le système de défenses adaptatif de l'organisme) ; Ce déséquilibre est lié soit à une production accrue des ROS soit à une diminution de la capacité de défense antioxydant.

Deux classes de molécules sont connues comme des médiateurs de la majorité des réactions qui provoquent le stress oxydatif : les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (Sies, 1991 ; Sorg, 2004 ; Ježek et Hlavatà, 2005).

I.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome, molécule ou fragment de molécule, possédant un ou plusieurs électron(s) libre(s) (non apparié(s)) sur son orbitale externe, cela lui confère une grande réactivité vis-à-vis d'autres molécules donc une demi-vie très courte (de la nano- à la milliseconde) (Valko et *al.*, 2007 ; Berger, 2006 ; Kœchlin-Ramonatxo, 2006)

Les radicaux libres peuvent être formés : soit au cours d'une réaction redox (perte ou gain d'un électron d'une molécule non-radicalaire), soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente d'une molécule non-radicalaire (clivage homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron (Oldham et Bowen, 1998 ; Kœchlin-Ramonatxo, 2006).

Les radicaux dérivés de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS) ainsi que les radicaux dérivés de l'azote (Reactive Nitrogen Species ou RNS) représentent la classe la plus importante des espèces radicalaires produite dans les systèmes vivants (Dasuri et *al.*, 2012 ; Balaraman, 2013 ; Macásek et *al.*, 2011).

Les ROS regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}), hydroxyle (OH^{\cdot}), carbonate ($CO_3^{\cdot-}$), peroxy (RO_2^{\cdot}), et alkoxy (RO^{\cdot}) ainsi que les espèces non-radicalaires comme le peroxide

d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), le monoxyde d'azote (NO^\bullet), l'acide hypochlorure ($HOCl$), les acides gras hydroperoxides ($FAOOH$), les aldéhydes réactives.

De même les RNS regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de nitrogène comme le monoxyde d'azote (NO^\bullet) et le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet), ainsi que les espèces non-radicalaire comme le peroxydinitrite ($ONOO^-$), N_2O_3 , N-nitrosoamines, S-nitrosothiols, les acides gras nitrosés, et d'autres composés (Carocho et Ferreira, 2013 ; Ježek et Hlavatà, 2005).

Le tableau suivant représente des exemples de la majorité des espèces réactives de l'oxygène et de nitrogène.

Tableau I : Vue d'ensemble des espèces réactives de l'oxygène (Macášek et al, 2011)

<i>Espèces réactives de l'oxygène</i>	Radicaux libres	l'oxygène triplet (3O_2)
		L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)
		Le radical hydroxy (HO^\bullet)
		Le radical alcoyle (RO^\bullet)
		L'hydroperoxyde (HO_2^\bullet)
		Le radical peroxyde (ROO^\bullet)
	Substances non-radicalaires	Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
		acide hypochloreux ($HClO$)
		L'ozone (O_3)
		L'oxygène singulet (1O_2)
<i>Espèces réactives de l'azote</i>	Radicaux libres	Le monoxyde d'azote (NO^\bullet)
		Le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet)
		L'anion nitroxyde ($NO^{\bullet -}$)
	Substances non-radicalaires	L'ion nitrosonium (NO^+)
		Tetraoxyde de diazote (N_2O_4)
		L'acide nitreux (HNO_2)
		Trioxyde d'azote (N_2O_3)
		L'ion nitronium (NO_2^+)
		Le peroxydinitrite ($ONOO^-$)
		L'alkylperoxydinitrite ($ROONO$)

À des concentrations basses ou modérées les ROS et les RNS jouent un rôle vital dans plusieurs processus biologiques, y compris la croissance des cellules, la signalisation cellulaires, la relaxation des muscles, les réactions immunitaires, la synthèse des molécules biologiques, la modulation de tension artérielle et la mort cellulaire programmée (Dasuri et al., 2012 ; Buonocore et al., 2010).

I.2. Les sources des ROS

Les ROS sont produites par deux sources principales : Endogènes et Exogènes.

I.2.1 Les sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres.

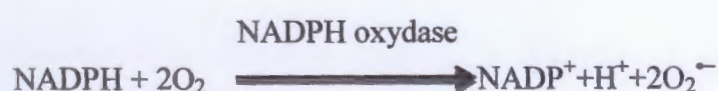
Parmi ces agents, on cite : Les rayonnements qui sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou γ , soit en activant des molécules photo-sensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (Favier, 2003).

La pollution des eaux et de l'air, l'ozone, les fumées de combustions (de cigarette, de bois,...), les métaux lourds ou/et de transition (Cd, Hg, Pb, Fe, As), les solvants industriels, les pesticides, la consommation excessive de l'alcool, l'amiante, et certains médicaments notamment les anticancéreux (Pham-Huy et al., 2008 ; Haleng et al., 2007)

I.2.2. Les sources endogènes

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS. Une des plus grandes sources endogènes de la production des radicaux libres est la mitochondrie essentiellement à travers la fuite des électrons au cours de leur transfert au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (Beaudeau et al., 2006 ; Sardina et al., 2012)

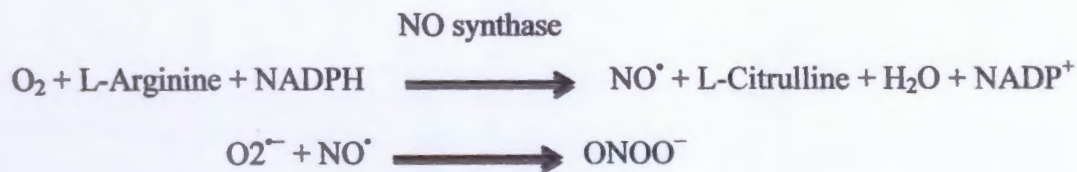
Les ROS sont aussi produites par d'autres systèmes enzymatiques tel que le NADPH oxydase (NOX) qui est une enzyme liée à la membrane plasmique et qui génère l' $O_2^{\cdot-}$ par l'oxydation de NADPH intracellulaire selon la réaction suivante (Cash et al., 2007 ; Maghzal et al., 2012) :



La xanthine oxydase (XO) joue aussi un rôle important dans la génération des ROS en catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique, ce qui conduit à la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon les réactions suivantes (Buonocore et *al.*, 2010 ; Pham-Huy et *al.*, 2008 ; Pasquier, 1995):



De plus, la NO synthase catalyse l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline selon la réaction ci-dessous en donnant naissance au monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), ce dernier réagit avec le superoxyde pour donner le puissant oxydant le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot -}$) (Sorg, 2004 ; Pham-Huy et *al.*, 2008).



Le réticulum endoplasmique est une autre source cellulaire des ROS. Il contient le cytochrome P450, enzyme responsable de l'oxydation des acides gras insaturés et des xénobiotiques, formant l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Cash et *al.*, 2007).

D'autres sources endogènes, tels que les cyclo-oxygénase, les lipoxygénases, les cellules immunitaires (les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages), les peroxysomes, les microsomes sont contribuées également à la production des ROS (Sardina et *al.*, 2012 ; Buonocore et *al.*, 2010 ; Cash et *al.*, 2007) .

I.3. Le système antioxydant

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques, localisé dans les compartiments intra- et extracellulaire.

Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle présente une concentration très faible dans le milieu où elle intervient.

I.3.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

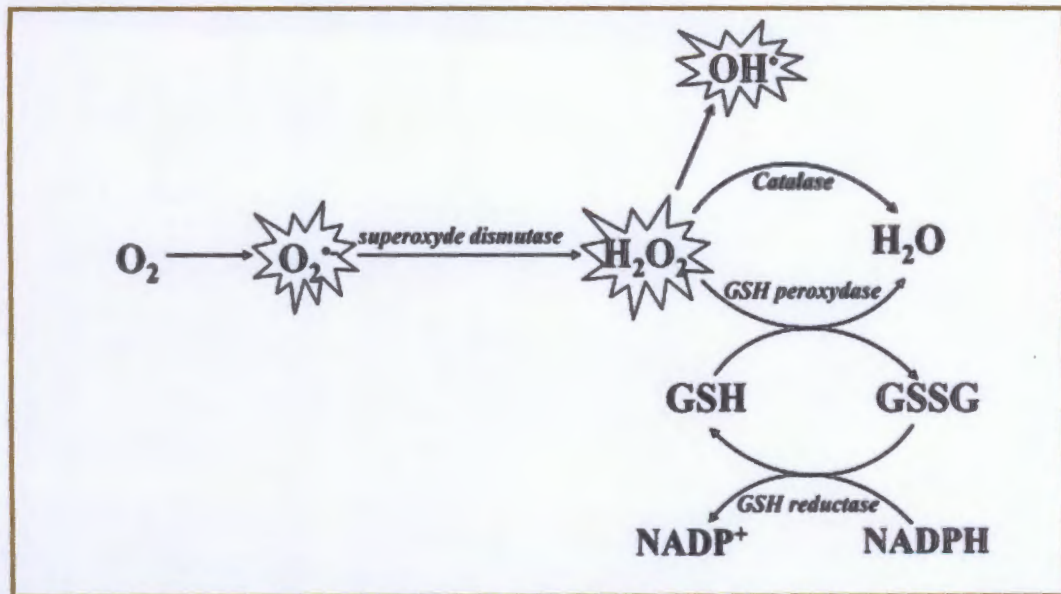
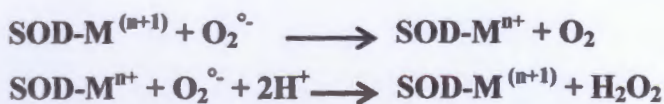


Figure 1 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques. (H_2O_2) : peroxyde d'hydrogène, ($O_2^{\circ-}$) : anion superoxyde, (GSH peroxydase) : glutathion peroxydase, (GSH reductase) : glutathion reductase, (NADPH) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé.

a. La Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD), est une métalloprotéine ; Elle représente une des premières lignes de défense contre le stress oxydant (Pham-Huy et *al.*, 2008).

Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (Afonso et *al.*, 2007 ; Cash et *al.*, 2007 ; Dasuri et *al.*, 2012) :



Avec: M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2).

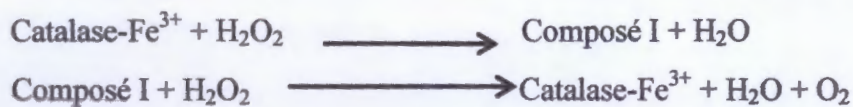
Il existe trois isoformes de la SOD chez les mammifères : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et Zinc (SOD Cyto), une forme mitochondriale associée au

manganèse (SOD Mn) et une forme extracellulaire (SOD-EC) (Balaraman, 2013 ; Lee et *al.*, 2012 ; Afonso et *al.*, 2007).

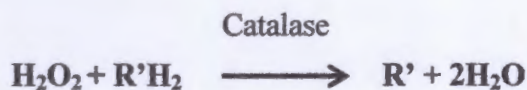
b. La catalase

C'est une enzyme homotétramérique, chaque unité contient de l'hème et de NADPH, la liaison de ce dernier avec la catalase la protège contre l'inactivation et augmente leur efficacité.

La catalase est localisée principalement dans les peroxysomes, où elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et en eau. C'est une réaction de dismutation du peroxide d'hydrogène qui se fait en deux étapes (Balaraman, 2013):



Elle intervient aussi dans la détoxification de différentes substances tel que : l'alcool, le phénol, le nitrite.....etc.



Un autre rôle antioxydant de la catalase est l'abaissement du risque de la formation des radicaux d'hydroxyles (OH^\bullet) à partir de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'intermédiaire de la réaction de Fenton catalysée par les ions de Cu ou de Fe (Nordberg et Arnér, 2001 ; Fransen et *al.*, 2012 ; Cash et *al.*, 2007).

c. La glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une sélénoprotéine, présente sous plusieurs isoformes. Elle réduit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes lipidiques (ROOH) formant l' H_2O et l'alcool respectivement (Forman et Cadenas, 1997).

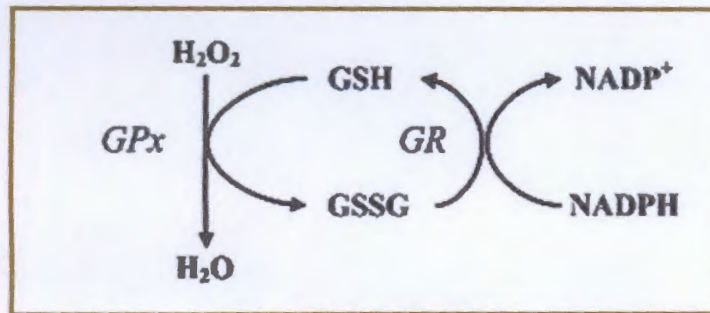


Figure 2 : Schéma des réactions d'élimination de H_2O_2 par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR. (H_2O_2) : peroxyde d'hydrogène, (GPx) : glutathion peroxydase, (GR) : glutathion reductase, (NADPH) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé.

Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elle transfère l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG). Ce dernier est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électrons (Valko et al., 2006 ; Goudable et Favier, 1997).

d. La glutathion S-transférase (GST)

C'est une enzyme multifonctionnelle qui joue un rôle essentiel dans la détoxification des débris cellulaires résultant d'une attaque par les radicaux libres (comme les hydroperoxydes et les aldéhydes issue de la peroxydation lipidique), ainsi que des xénobiotiques, et ceci par leurs conjugaisons avec le glutathion réduit (GSH) pour être éliminés par la suite de l'organisme (Fransen et al., 2012 ; Reichl et al., 2010).

e. La thiorédoxine peroxydase (Prx)

C'est une enzyme localisée dans le cytosol, la mitochondrie et le peroxysome. Elle catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène, hydroperoxyde organique et peroxynitrite en utilisant la thiorédoxine comme donneur d'électrons.

Une fois oxydée, la thiorédoxine est régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif (Dasuri et al., 2012 ; Ježek et Hlavatà, 2005).

I.3.2. Les antioxydants non-enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Il s'agit principalement du glutathion, de vitamines, et de certains oligoéléments.

Le glutathion est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine), synthétisé par toutes les cellules de l'organisme. Il existe sous deux formes chimiques, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH), qui représente 98 à 99% du glutathion totale (Xiong *et al.*, 2011)

Le GSH participe à l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des lipides peroxydés, en servant de co-substrat à l'enzyme GPx. Il s'avère aussi efficace comme piègeur direct de certains ROS, tels que les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). En plus, il est considéré comme le régénérateur final des vitamines C et E de leur forme radicalaire (Pastore *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2010).

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être les vitamines les plus importants qui entre dans la lutte contre le stress oxydant.

La vitamine C, hydrosoluble, est un excellent piègeur des espèces réactives de l'oxygène tel que le OH^\cdot et le $\text{O}_2^{\cdot-}$, elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E.

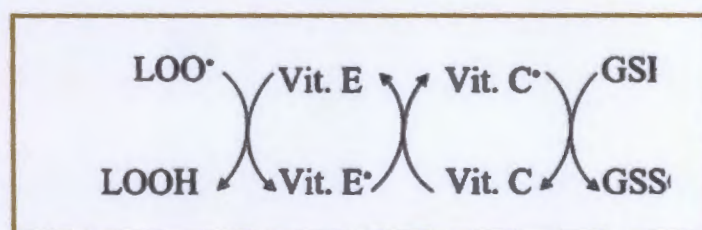


Figure 3: Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. (LOO $^\cdot$) : radical peroxyde lipidique, (LOOH) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) : vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé.

La vitamine E, possède un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où elle joue un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes (ROO $^\cdot$) et alcoxydes pour former le radical

tocophéryle, et empêche ainsi les réactions de peroxydation lipidique (Reichl et *al.*, 2010 ; Dasuri et *al.*, 2012 ; Nordberg et Amèr, 2001).

À cela, s'ajoutent quelques oligoéléments qui sont des cofacteurs enzymatiques impliqués dans toutes les grandes voies métaboliques et notamment dans la protection contre les espèces radicalaires.

Le zinc a un effet antioxydant dans sa participation au maintien de l'activité de la SOD cytoplasmique cuivre et zinc dépendante. Le cuivre agit en synergie avec le zinc dans la SOD cytosolique possédant ainsi un effet antioxydant (Haleng et *al.*, 2007).

Le sélénium connu pour son pouvoir anti-peroxydant agit par l'intermédiaire des GPX dans la lutte contre les ROS toxiques. Sous forme de sélénocystéine, il entre dans la composition structurale du site actif des GPX (Dennert et *al.*, 2011).

Le manganèse exerce une action antioxydante spécifique à travers l'activité des SOD mitochondriales pour lutter contre la surproduction des radicaux libres au cours de la respiration cellulaire (lors de la phosphorylation oxydative) (Das et *al.*, 1997).

A toute ces antioxydants citées, sont t'ajouter également de nombreux autres antioxydants non-enzymatiques comme : la thiorédoxine, la bilirubine, l'acide urique, la β -carotène,...etc.

I.4. Les dommages du stress oxydatif

I.4.1. Dommages oxydatifs des lipides

Les milieux biologiques contiennent une variété d'acides gras polyinsaturés qui sont localisés préférentiellement dans les lipides membranaires, assurant sa fluidité, mais particulièrement sensibles à l'attaque radicalaire (notamment le OH°) de par leur localisation.

Le radical hydroxyle (OH°) est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (ROO^\bullet).

Il s'agit d'une réaction en chaîne appelée peroxydation lipidique qui se poursuit par la transformation du radical peroxyde, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué.

Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (Esterbauer et *al.*, 1992), c'est la phase d'initiation. Le radical diène conjugué réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO•), suffisamment réactif pour arracher un H⁺ à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction.

Ultimement, le système de propagation doit être arrêté. Cette étape de terminaison est atteinte lorsque deux radicaux libres se rencontrent et partagent de façon covalente leurs électrons ou lorsque des systèmes antioxydants entrent en jeu. A cette fin, la stratégie communément utilisée par la cellule consiste à former un composé stable électroniquement. Cette nouvelle structure électronique a un pouvoir réactif faible qui devra être régénéré sous sa forme antioxydante ou éliminé par l'organisme. C'est le cas notamment du tocophérol, de l'ascorbate et du système de glutathion (Favier, 2003 ; Balaraman, 2013 ; Nordberg & Arnér, 2001).

I.4.2. Dommages oxydatifs de l'ADN

L'ADN est une cible privilégiée des espèces réactives de l'oxygène notamment le radical hydroxyle (OH°) où plusieurs classes de dommages oxydatifs peuvent être générées : les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intra-caténaux, des cassures de brins, des pontages (cross-links) inter et intra brin et des pontages protéine-ADN (Wang, 2008).

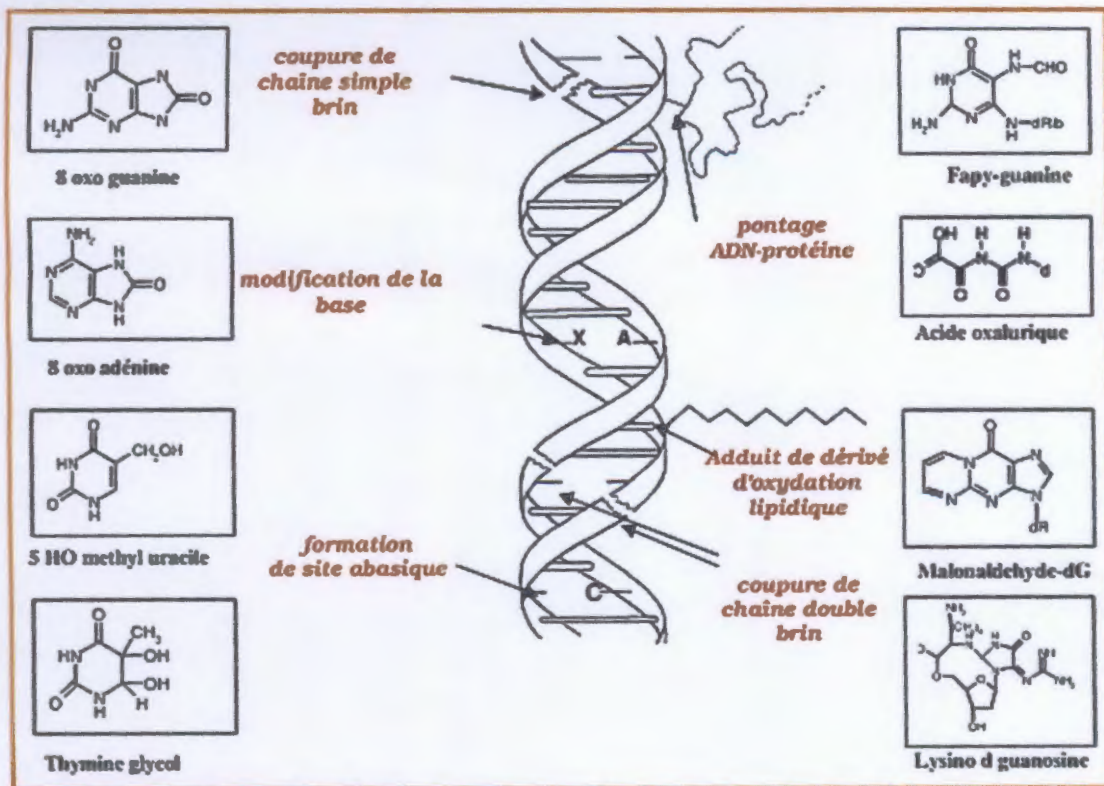


Figure 4: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétiques des cellules (Favier, 2003).

La guanine, par exemple, peut réagir avec le $\cdot\text{OH}$ pour former la 8-hydroxydeoxy-guanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Calderon-Garciduenas et al., 1999).

1.4.5. Dommages oxydatifs des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories: d'une part la modification de la chaîne protéique par cassure des liaisons peptidiques, et d'autre part les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE.

Ces changements conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases et notamment du protéasome...) (Levine, 2002 ; Peng *et al.*, 2000).

Les protéines peuvent aussi subir soit des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine soit des modifications de certains acides aminés (en particulier la cystéine et la méthionine) par l'oxydation des chaînes latérales de leurs résidus (Buonocore *et al.*, 2006).

Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules (Favier, 2003).

Chapitre II :
Pharmacologie du
Diclofénac

Depuis les années 80 et grâce, notamment, aux progrès de l'analyse physico-chimique, de nombreuses molécules pharmaceutiques ont été détectées dans l'environnement (Garricet *al.*, 2002) et leur présence dans les effluents et les boues de stations d'épuration urbaines, le milieu aquatique et les sols, a été établie à l'échelle mondiale. La première mise en évidence de la présence de médicaments dans les eaux remonte à 1976. De nombreux travaux ont confirmé l'ubiquité des substances médicamenteuses dans les eaux de surface et les eaux souterraines, mais également dans le tissu de poissons, Au début des années 2000, plus de 80 substances pharmaceutiques avaient ainsi été mesurées dans des effluents de stations d'épuration (STEP) et des eaux de surface (Heberer, 2002 ; Garric et *al.*, 2002).

Les médicaments peuvent atteindre et contaminer l'environnement de plusieurs manières. Concernant les médicaments à usage humain, la consommation des médicaments par la population pourrait représenter la principale source de contamination des milieux. Après leur utilisation thérapeutique ou diagnostique, les médicaments ne sont pas toujours complètement métabolisés. Ainsi, les médicaments humains et/ou leurs métabolites sont rejetés continuellement dans les eaux usées. Or les stations d'épuration ne permettent pas leur complète élimination et leurs résidus rejoignent le milieu récepteur constitué essentiellement par des eaux de surface. Ce rejet en continu dans le milieu aquatique confère à ces molécules un caractère de pseudo-persistance (Al Aukidy et *al.*, 2012).

Les effluents hospitaliers représentent une source particulière de contamination médicamenteuse et peuvent présenter un profil spécifique de contamination : antibiotiques, anti-infectieux, produits de contraste iodés et anticancéreux. Les effluents hospitaliers n'étant pas traités sur place, les substances pharmaceutiques se retrouvent dans les eaux usées de l'agglomération et gagnent les STEP urbaines, puis finalement les eaux de surface (Hallingsorensen et *al.*, 2000).

La voie d'entrée des médicaments vétérinaires est différente puisque ceux-ci peuvent être dispersés directement dans les écosystèmes (utilisation en aquaculture, traitement des animaux en champ...), soit les contaminer indirectement, par exemple via l'épandage de lisier contaminé (Garric et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 2008).



Jusqu'à maintenant, une grande diversité des médicaments a été trouvée dans l'environnement comprenant des analgésiques, des antibiotiques, des anticancéreux, des antidépresseurs, etc....

Des concentrations élevées des AINSs notamment le Diclofénac ont été détectées dans l'environnement en raison de leur consommation élevée par l'être humain (Le volume de diclofénac globalement consommé est estimé à être de 940 tonnes par an, avec une dose quotidienne définie 100 mg).

II. Diclofénac

II.1. Structure et propriétés

Le Diclofénac (2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl-acetate) est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) appartenant à la famille des acides aryl-alcanoïques de formule brute de $(C_{14}H_{11}Cl_2NO_2)$. C'est un dérivé de l'acide phényl-acétique (Oviedo-Gómez *et al.*, 2010) il possède des propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires.

Il est largement utilisé pour le traitement des rhumatismes inflammatoires chronique, des traumatismes musculo-squelettiques aigue (Poule, 2001) des douleurs postopératoire et dans la dysménorrhée (Medan, 2004).

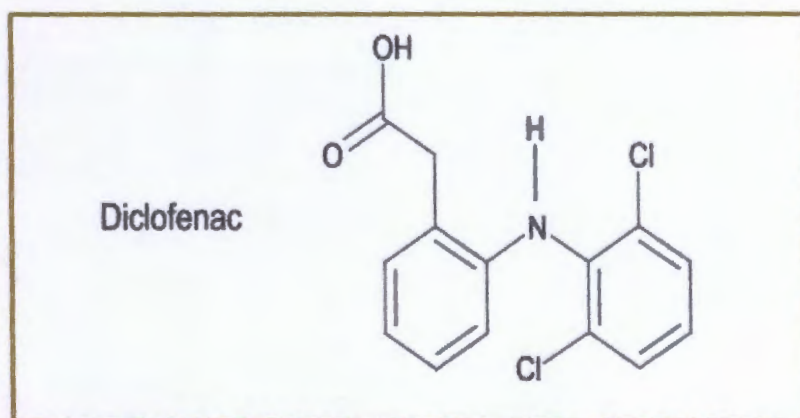


Figure5 : Formule du Diclofénac

II.2. Pharmacocinétique

Le Diclofénac est rapidement et complètement absorbé après administration orale ; le pic de concentration plasmatique est atteint en 2 à 3 heures. L'administration avec la nourriture ralentit la vitesse d'absorption mais ne modifie pas la quantité absorbée.

Il y a un effet de premier passage important, de telle sorte qu'environ 50 % seulement du diclofénac est systématiquement disponible (Poule, 2001).

Le produit est majoritairement lié aux protéines plasmatiques principalement l'albumine (99%) (Boelsterli, 2003 ; Medan, 2004), et sa demi-vie dans le plasma est de 1 à 2 heures. Le Diclofénac s'accumule dans le liquide synovial après administration orale, ce qui peut expliquer que la durée de l'action thérapeutique est beaucoup plus longue que la durée de la demi-vie.

Moins de 1 % du principe actif est éliminé inchangé dans les urines. Environ 60 % de la quantité administrée est éliminé sous forme de métabolites dans les urines, le reste est éliminé dans les fèces (Aouacheriet *al.*, 2009).

La clairance plasmatique totale est environ 263 ml/minute.

II.3. Métabolisme du Diclofénac

Le Diclofénac est intensément métabolisé dans le foie, et suit deux voies principales que ce soit chez l'Homme ou les animaux d'expériences.

Voie d'hydroxylation : le diclofénac subit une hydroxylation catalysée par le hCYP2C9 et hCYP3A4 (deux isozymes du cytochrome P450) ayant pour résultat la formation de 4'-hydroxy diclofénac (métabolite oxydant principal) et 5-hydroxy diclofénac respectivement. Ces deux métabolites ont le pouvoir d'être encore oxydés en 4'-hydroxy- et 5-hydroxy-diclofénac quinoneimines.

Voie de glucuronidation : l'isoforme impliqué dans la glucuronidation du Diclofénac est l'UGT2B7. Ce dernier assure la formation du diclofénac-acyle glucuronide (Naisbitt, *etal.*, 2007).

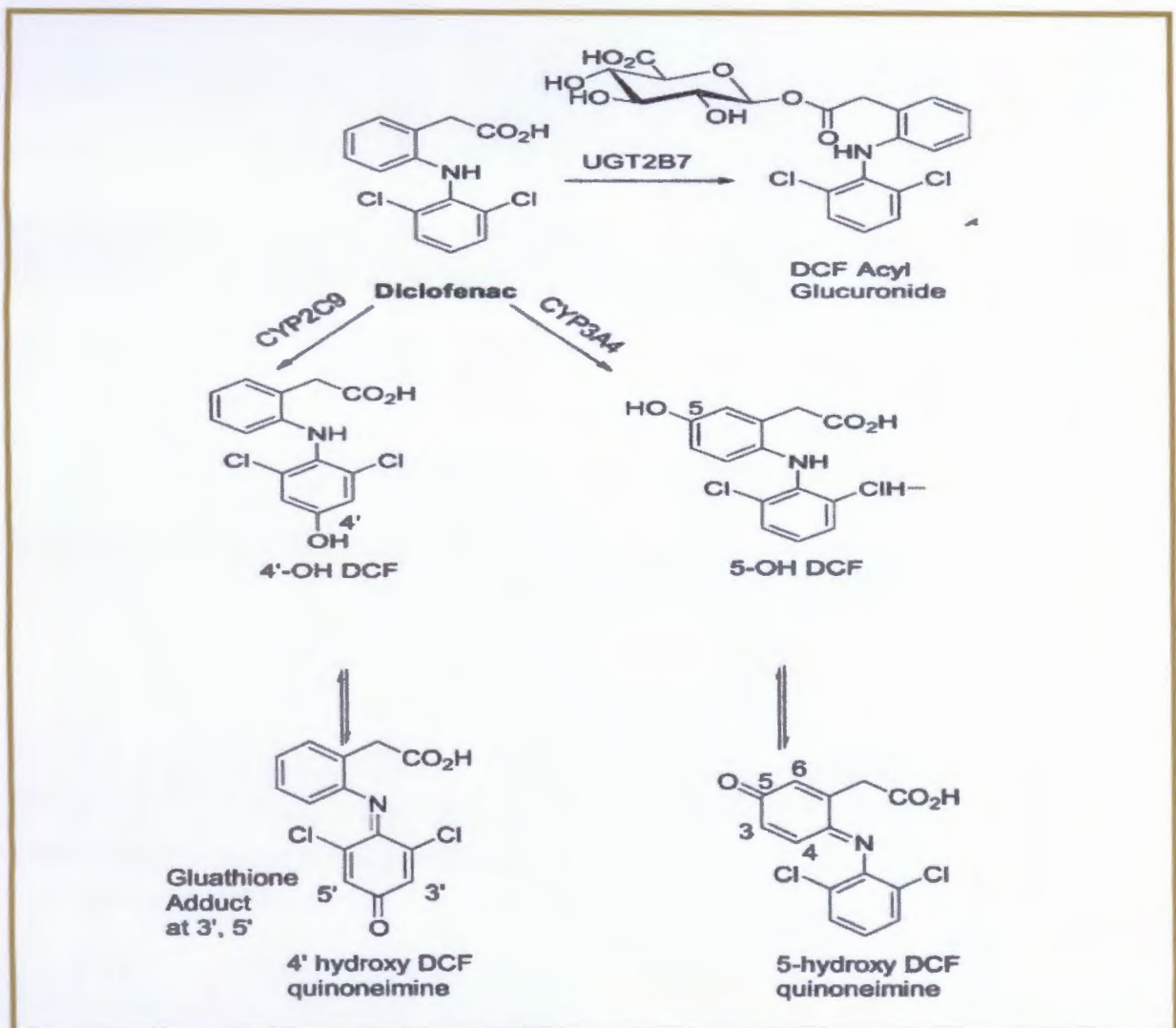


Figure 6 : Voies principales de métabolisme de Diclofénac chez l'homme : l'hydroxylation et la glucuronidation. (Naisbitt et al., 2007)

II.4. La pharmacodynamie

Le diclofénac est un inhibiteur réversible de la cyclooxygénase (COX) qui transforme l'acide arachidonique en prostaglandines et thromboxanes (Konstandinidou et al., 1998) entraînant une baisse des quantités des prostaglandines et des thromboxanes produites et donc une diminution de l'inflammation (action anti-inflammatoire), diminution de la fièvre (action antipyrétique), diminution de l'agrégation des plaquettes (action anti-agrégant plaquettaire) et diminution de la protection de l'estomac (action ulcérogène) (Poule, 2001).

Le Diclofénac peut avoir un autre mécanisme d'action. Des études expérimentales ont démontrées que le Diclofénac réduit la formation des produits de la voie de lipoxycgénase qui inclue l'acide 5-hydroxyeicosatetraenoic et les leukotrienes.

II.5. Toxicité du Diclofénac

Le Diclofénac provoque des effets indésirables dont les effets gastro-intestinaux sont les plus courant ; saignement, ulcération ou perforation de la paroi intestinale ont été observés (Poule, 2001). Le Diclofénac provoque aussi une augmentation asymptotique des transaminases plasmatiques (Satonori et *al.*, 2012).

Le métabolisme du Diclofénac dans le foie par le CYP 450 et ces isozymes donne naissance à des métabolites réactifs comme les quinoneimines. Ces derniers peuvent être impliqués dans le processus de stress oxydatif (Yano et *al.*, 2012).

II.6. Dégradation du Diclofénac dans l'environnement

Le diclofénac peut être dégradé dans l'environnement par deux voies majeur : la photodégradation et la biodégradation.

Gröning et *al.* (2007) ont identifié un des trois métabolites issus de la biodégradation du diclofénac par HPLC qui est le 5HDQI (p-Benzoquinone imine de 5-Hydroxydiclofenac).

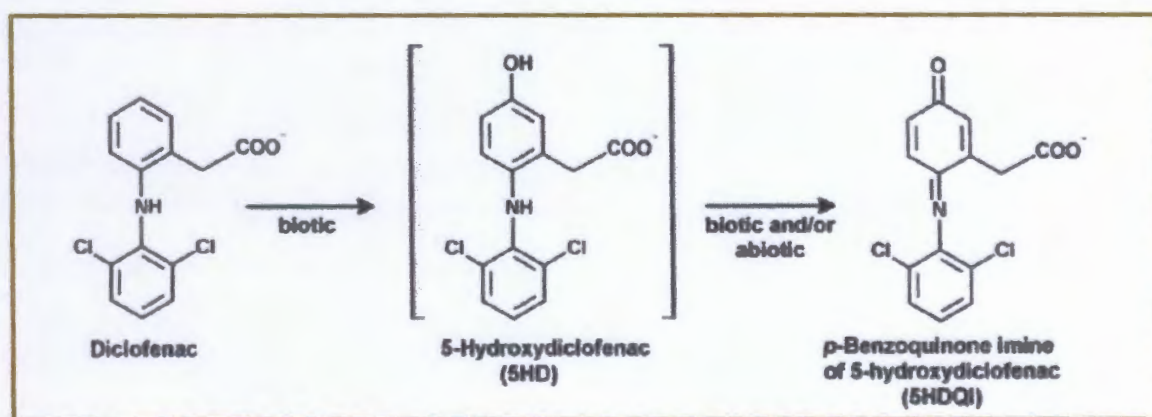


Figure 7 : Structure moléculaire proposée de 5HDQI (de p-Benzoquinone imine de 5-Hydroxydiclofenac), le métabolite principal de la biodégradation en sédiment de fleuve (modifié d'après Gröning et *al.*, 2007)

***Partie II : Partie
Expérimentale***

Matériels et Méthodes

I. Etude expérimentale de l'effet du Diclofénac et ses dérivés sur le profil de stress oxydatif

I.1. Les animaux

L'étude a été réalisée sur 48 souris femelles de souche NMRI provenant de l'Université de Constantine dont le poids initial varie de 15 à 21 g. Après une mise en quarantaine de 10 jours, les animaux sont maintenus dans des cages en plastiques avec accès libre à la nourriture standard (croquettes) et à l'eau, à température ambiante de $22 \pm 2C^\circ$ avec un cycle de 12 h de lumière et d'obscurité, au sein de l'animalerie du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Jijel.

L'évolution pondérale des animaux a été suivie durant toute la période de traitement. Les animaux ont été ainsi pesés avant et après le traitement.

I.2. Les traitements

Les traitements par le Diclofénac (DJA, DF, DT) sont à base de principe actif du médicament de Diclofénac reçu du laboratoire de Toxicologie Moléculaire.

Des solutions de principe actif de Diclofénac ont été préparées dans le milieu minimum (MM) (Annexe 6), afin d'administrer des doses de : 1.50 mg/kg/jour ; 1.50 mg/kg/jour ; 0.15 mg/kg/jour ; 130 mg/kg/jour pour les DJA, DF et DT respectivement. Le MM a servi de véhicule pour tous les groupes d'animaux.

Les produits de biodégradation sont issus de la biodégradation du principe actif de Diclofénac par des souches bactériennes *in vitro*, après un temps d'incubation, une filtration de milieu de culture est réalisée. Le filtrat contenant les produits de biodégradation du Diclofénac, vérifié par HPLC (Données non présentées dans le mémoire), a servi pour le traitement des animaux.

I.3. Groupes Expérimentaux

Les souris ont été réparties en 6 lots homogènes (n=8) :

Lot 1 : Témoin (T) : animaux recevant 1ml de milieu minimum (MM) deux fois par jour per os.

Lot 2 : Diclofénac Dose Journalière Admissible (DJA) : souris recevant 1ml du Diclofénac deux fois par jour (per os) à la dose de 1.50 mg/Kg/Jr

Lot 3 : Dose faible (DF) : souris recevant 1ml du Diclofénac deux fois par jour (per os) à une dose de 0.15 mg/Kg correspondant à la DJA/10

Lot 4: Dose toxique (DT) : souris recevant une dose unique du Diclofénac (130 mg/Kg) dans 1ml de MM per os correspondant à la DL50/3.

Lot 5: Produits de biodégradation (PD) : souris recevant 1ml de PD de Diclofénac deux fois par jour (per os) à une dose de 0.15 mg / Kg correspondant à la dose faible.

Lot 6: Quercétine (QR) : souris recevant 1ml de la Quercétine deux fois par jour (per os) à une dose de 14.28 mg/Kg/Jr.

I.4. Sacrifice des animaux et prélèvement du foie

Les souris sont sacrifiées 06 jours après le traitement par décapitation cervicale. Après la dissection, les foies sont étiquetés et conservés dans un congélateur à -20 C° jusqu' à la réalisation des différents tests (Dosage du MDA, du glutathion réduit, GST, protéines totales et la SOD).

Le sang a été prélevé par ponction cardiaque après sacrifice dans des tubes avec anticoagulant EDTA et sur tubes secs. Après centrifugation à 3600 rpm pendant 15 minutes, Le plasma a servi au dosage de glutathion et le sérum aux dosages de la glutathion S-transférase et des protéines totales.

I.5. Evaluation du stress oxydatif dans le foie

a. Préparation de la fraction cytosolique

Pour préparer la fraction cytosolique, on a suivi la méthode décrite par Iqbal et *al.*, 2003. Pour cela, 1 g du foie a été prélevé et directement plongé dans trois volumes de tampon phosphate KH_2PO_4 (0,1 M à pH 7,4) contenant du KCl 1,17 %. Après découpage en morceaux fins et homogénéisation à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 2000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C pour éliminer les débris nucléaires; le surnageant est ensuite centrifugé à 9 600 rpm pendant 45 minutes à 4 °C. Le surnageant final est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques.

b. Dosage du Malondialdéhyde MDA

Le malondialdéhyde est l'un des produits terminaux formés lors de la peroxydation lipidique, mais il existe d'autres entités radicalaires, qui peuvent également se former au cours de la peroxydation lipidique. Ces entités sont connues sous le nom de TBARS (Thio Barbituric Acid Reactive Substances). Le test de TBARS est le plus couramment utilisé pour déterminer indirectement la peroxydation lipidique, en mesurant le taux du MDA (Ohkawa et al., 1979).

La réaction de dosage du Malondialdéhyde repose sur la formation en milieu acide (pH 2 à 3) et à chaud (100°C) entre le Malondialdéhyde et deux molécules d'acide Thiobarbiturique (TBA), d'un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

Pour le dosage des MDA nous avons utilisé la méthode décrite par Ohkawa et al. (1979). En résumé, 1g de foie est coupé et homogénéisé avec trois volumes du KCL (1,15 M) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. Puis, 0.5 ml de cet homogénat est récupéré et additionné de 0.5 ml de TCA 20% et 0.5 ml de TBA 0.67%. Ce mélange est ensuite incubé pendant 15 min au bain-marie à 100°C, refroidis puis additionné de 4 ml de n-Butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm.

La conversion de l'absorbance, mesurée à 530 nm, en équivalents de malonaldéhyde (mg/kg d'échantillon) est obtenue en utilisant le coefficient d'extinction molaire du complexe MDA (TBA : $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Buedge et coll., 1978).

Le mode de calcul est le suivant :

$$\text{mg équivalent MDA/Kg} = (A_{530} \times V_{\text{KCl}} \times 2 \times M \times 10^{-2}) / (1.56 \times m).$$

- Sachant que :
- V_{KCl} : volume du solvant d'extraction (4ml)
 - m : masse de l'échantillon analysée (g)
 - M : masse moléculaire du malonaldéhyde = 72 g / mol

c. Dosage du glutathion

Le glutathion ou γ -L-glutamyl-L-cystéin glycine constitue le principal antioxydant propre à la cellule grâce à son groupement SH libre. Il peut en effet non seulement réduire H_2O_2 en eau et des peroxydes de types ROOH en alcools, mais également interagir directement avec les ROS formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de

peroxydation lipidique. Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman (1959).

Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm.

Pour évaluer le taux du glutathion, un gramme du foie est découpé, homogénéisé avec trois volumes de l'acide trichloracétique (TCA) (5 %) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE, puis centrifugé à 2 000 rpm. Une aliquote de 50 µL du surnageant est ensuite diluée dans 10 ml de tampon phosphate Na_2HPO_4 (0,1 M, pH = 8). À 3 ml du mélange de dilution, nous avons additionné 20 µl DTNB (acide 5, 5'-dithiobis- 2-nitrobenzoic) (0,1 M). Après 15 minutes d'incubation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5 %).

Les concentrations ont été exprimées en millimoles de glutathion par gramme de foie. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

d. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST)

La GST catalyse la conjugaison du glutathion réduit à de nombreux substrats facilitant ainsi leur élimination de l'organisme. L'activité de la GST est évaluée par la méthode de Habig et al. (1974).

Cette méthode est basée sur la mesure de la formation d'un complexe entre le glutathion et un substrat artificiel de la GST, le 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB), qui peut être visualisée par l'augmentation de la densité optique à 340 nm et à 25°C.

Pour cela, 100 µl de CDNB 20 mM sont additionnés à 1,7ml du tampon phosphate KH_2PO_2 (0,1 M ; pH=6,5) et incubés à 37°C pendant 10 min. après incubation, on a ajouté 100 µl du glutathion 20 mM. Enfin, 100 µl du cytosol dilué au 1/100^{ème} sont ajoutés à la cuve de mesure au zéro. L'absorbance est suivie pendant 5 min avec une minute d'intervalle contre le blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon.

L'activité enzymatique de la GST est exprimée en nmoles du complexe formé/min/mg de protéines.

Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzymes catalysant la formation de 1 μmole de complexe par minute. [Constante d'extinction molaire du complexe formé $\varepsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

L'activité spécifique est définie comme étant l'unité d'activité enzymatique par mg de protéines mesurées par la méthode de Bradford.

$$\text{GST activité } (\mu\text{moles/min}) = \frac{\Delta \text{ abs } 340 / \text{min test} \times V_t}{V_{ez}} \times \frac{1}{9.6} \times \frac{1}{F}$$

Sachant que : $-\Delta \text{ abs } 340 / \text{min test}$: différence de l'absorbance

- V_t : volume total de cuvette par ml

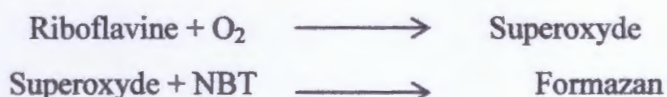
- V_{ez} : volume de fraction cytosolique ajouté par ml

- F : facteur de dilution

e. *Mesure de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)*

La SOD est une enzyme antioxydante puissante, elle constitue le premier et l'un des principaux maillons du processus de défense contre le stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. L'activité de la SOD est déterminée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971).

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitro-bleu de tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine selon la réaction suivante :



La réduction du NBT (incolore) par l'anion superoxyde en Formazan (bleu) a été suivie à 560 nm.

Cinq μl de la source enzymatique (fraction cytosolique) ont été ajoutés à 2 ml du mélange réactionnel (cyanure de sodium $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, solution du NBT $1,76 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, EDTA $6,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, riboflavine $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, méthionine 10^{-2} M), puis le mélange a été irradié avec une lampe de 15 Watts pendant 10 minutes. L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 560 nm. L'activité de la SOD est évaluée en % d'inhibition par rapport à un contrôle dépourvu de la source enzymatique (SOD).

Les valeurs ont été exprimées en UI.mg⁻¹ de protéines. Une unité d'activité de la SOD est définie entant que la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50%.

$$\% \text{ d'inhibition} = (A \text{ du contrôle} - A \text{ de l'essai}) / A \text{ du contrôle} \times 100$$

$$\text{SOD U/mg} = \% \text{ d'inhibition} \times 6.35$$

f. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase

La catalase est responsable de la dégradation d'H₂O₂ en H₂O et O₂, empêchant donc cette molécule de participer à la réaction de Fenton. L'activité de la catalase est déterminée selon la méthode de Clairborne(1985).

Le principe est basé sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène à 25°C du fait de l'activité de la catalase contenant dans la fraction cytosolique.

On prépare dans une cuve de mesure en quartz, une solution substrat composée de 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄, 0,1 M, pH 7,2), 0,950 ml de H₂O₂ (0,019 M), 0,025 ml de la source enzymatique (fraction cytosolique). La réaction est suivie par l'enregistrement de l'absorbance à 240 nm chaque minute pendant deux minutes. Le contrôle est préparé dans les mêmes conditions mais en absence de la source enzymatique.

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au modèle Michaelien, nous n'utilisant pas la loi de Beer-Lamber. En effet, la constante de vitesse est définie par la relation suivante :

$$K = 2.3033 / \Delta t \times \log (DO_0 / DO_t)$$

Sachant que :

- DO₀: Absorbance au temps 0 mn
- DO_t: Absorbance après 1 mn
- Δt : intervalle de temps en mn
- K : UI

g. Dosage des protéines totales

Les protéines totales sont dosées par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur le changement de coloration du réactif de Bradford, Bleu Brillant de Coomassie, qui développe en présence de protéines une coloration bleu quantifiable à 595 nm, et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

La fraction cytosolique est au préalable diluée au 1/5^{ème} dans l'eau distillée. 100 µl d'échantillons dilués sont ensuite ajoutés à 4 ml du réactif de Bradford (BBC). Après agitation la réaction se poursuit à T° ambiante pendant cinq minutes puis l'absorbance est lue à 595 nm.

Les résultats sont déterminés à partir d'une droite d'étalonnage de protéines standard obtenue avec l'albumine sérique bovine (BSA) [0.06 – 1 mg / ml] et sont exprimés en mg /ml.

L.6. Evaluation du stress oxydatif dans le plasma et le sérum

a. Dosage de glutathion dans le plasma

Le glutathion réduit (GSH) est déterminé dans le plasma par la méthode d'Ellman., 1959. Pour cela, une aliquote de plasma (0.1 ml) est ajoutée à 0.85ml du tampon phosphate Na₂HPO₄ (0.3 M ; pH =7.4). Le mélange est additionné de 0.05 ml du DTNB (acide 5, 5'-dithiobis- 2-nitrobenzoic) (0.01M). L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

Les concentrations du glutathion sont déterminées à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions et sont exprimés en micromoles par millilitre de plasma

b. Dosage de la glutathion S-transférase (GST) dans le sérum

La GST joue un rôle physiologique très important à travers la détoxification des produits potentiellement alkylés y compris les substances pharmacologiques, cette enzyme catalyse la réaction entre ces molécules et le groupement SH de la glutathion pour les rendre des produits hydrosolubles facile à éliminer (Habig et al., 1974).

Nous avons mesuré l'activité de cette enzyme par la méthode décrite précédemment par Habig et al.,(1974) en suivant le changement de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre en présence d'un donneur du groupement alkyle qui est le CDNB (1-chloro-2-4-dinitrobenzène) .

Pour cela, 850 µl de tampon phosphate KH₂PO₄ (0,1 M ; pH 6,5) et 50 µl du CDNB (20 mM) sont pré-incubés à 37°C pendant 10 minutes. La Réaction est déclenchée par l'addition de 50 µl de GSH (20mM) et 50 µl de sérum.

L'absorbance est suivie pendant 5 min avec une minute d'intervalle contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en absence du sérum.

L'activité enzymatique de le GST est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ selon la formule suivante :

$$\frac{DOEch - DOBlanc}{9.6 \times 0.05} \times 1000 \text{ IU / ltr}$$

c. Dosage des protéines totales dans le sérum

Pour le dosage des protéines totales dans le sérum, On a suivi le même protocole déjà décrit pour le dosage dans le foie.

I.7. Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test *t* de Student. La valeur trouvée par le calcul du *t* peut affirmer que les populations sont différentes par rapport au témoin négatif avec un risque d'erreur *p* tel que :

- $p > 0,05$ = la différence n'est pas significative ;
- $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative* ;
- $p < 0,01$ = la différence est hautement significative**;
- $P < 0,001$ = la différence est très hautement significative***.

Le calcul statistique est réalisé par EXCEL 2010.

Résultats et Discussion

II. Résultats et Discussions

La présente étude menée in vivo sur des souris traitées par le Diclofénac en différentes doses (DJA, DF, DT) et par les produits de biodégradation a été réalisée en vue d'établir l'effet du Diclofénac à une dose toxique (DL50/3) donc prooxydante, ainsi que la dose thérapeutique sur le profil des paramètres du stress oxydatif en comparaison avec des traitements par une dose comparable de produit existant dans l'environnement à l'état de traces.

Les flavonoïdes tels que la Quercétine sont connus pour leur effets antioxydant. Pour cela, nous avons appuyé notre étude par comparaison avec un traitement antioxydant.

II.1. Evaluation du stress oxydatif dans le foie

II.1.1. Evaluation de la peroxydation lipidique

L'évaluation des lésions dues au stress oxydatif au niveau des lipides hépatocytaires est réalisée en mesurant le taux d'un des produits terminaux de leur oxydation par les radicaux libres ; le MDA. Le tableau II et la figure 8 représentent l'effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur la variation du MDA cytosolique dans les cellules hépatiques.

Tableau II : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur le taux des MDA cytosolique

	Témoin	DJA	DF	DT	PD	QR
[MDA] mg équivalent MDA/g tissus	1,523±0,271	2,73±0,227 ***	1,903±0,154	2,207±0,13*	1,442±0,213	1,492±0,233

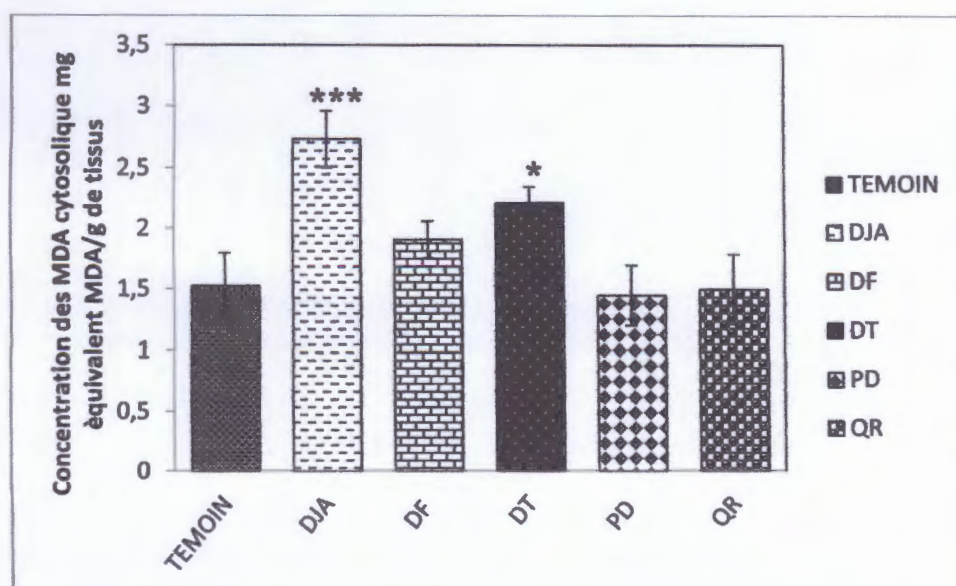


Figure 8 : Variation du taux des MDA cytosoliques hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA : Dose Journalière Admissible 1,43 mg/kg, DF : Dose Faible 0,143 mg/kg, DT : Dose Toxique), ses Produits de bioDégradation (PD : 0,143 mg/kg) et la Quercétine (QR : 14,28mg/kg). Les résultats sont donnés en Moyenne \pm écart type, n=8, test de student : * : $p < 0.05$; *** : $p < 0,001$: comparaison par rapport au témoin.

Les résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0,001$) du taux des MDA cytosoliques ($2,730 \pm 0,227$ mg équivalent MDA/ g de tissus) chez les souris recevant la dose journalière admissible du Diclofénac par rapport aux souris recevant le milieu minimum (témoin) ($1,52 \pm 0,27$ mg équivalent MDA/ g de tissus). Les souris recevant une dose toxique du Diclofénac ont aussi un taux des MDA ($2,20 \pm 0,13$ mg équivalent MDA/ g de tissus) significativement élevé ($p < 0,05$) par rapport aux souris témoin ($1,52 \pm 0,27$ mg équivalent MDA/ g de tissus). Par contre, cette augmentation est non significative chez les souris recevant la dose faible du Diclofénac par rapport aux souris témoin.

Le taux des MDA est inchangé chez les souris recevant les produits de biodégradation ainsi que celles recevant la Quercétine par rapport aux souris témoin.

Les résultats obtenus ont montré que le Diclofénac à forte dose (DJA, DT) induit une perturbation du profil du stress oxydatif hépatique démontré par une augmentation significative de la peroxydation lipidique.

Ces résultats sont en accord avec des études montrant que le Diclofénac provoque un stress oxydatif massif dans le foie (Hikey et al., 2001).

II.1.2. Evaluation des concentrations de GSH

Les résultats de l'effet du Diclofénac et de ses produits de biodégradation sont présentés dans le tableau III et la figure 9 ci-dessous :

Tableau III : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur la concentration de GSH cytosolique

	Témoin	DJA	DF	DT	PD	QR
[GSH] mMole/g	1,337± 0,08	1,087±0,221*	1,343± 0,202	1,429±0,142*	1,351± 0,19	1,341± 0,096

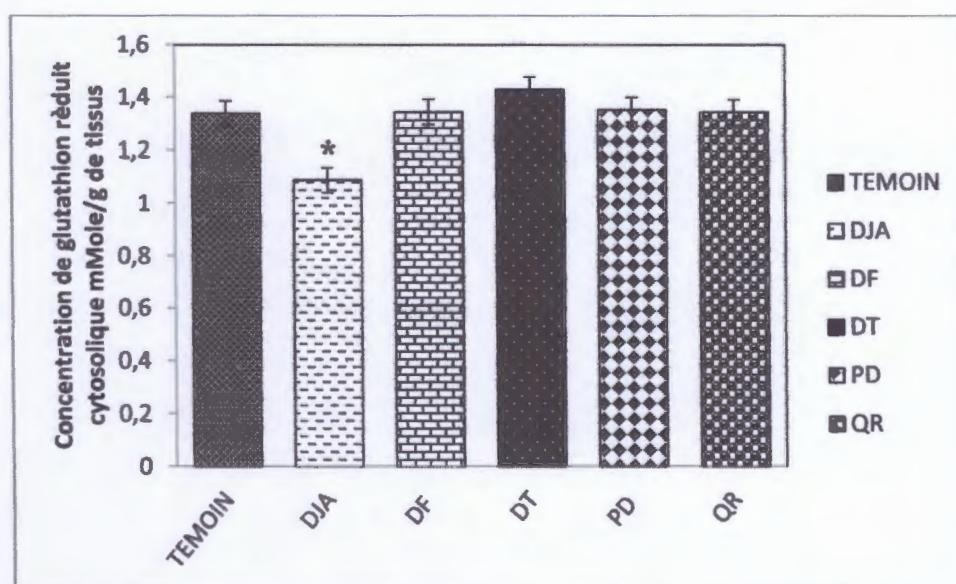


Figure 9 : Variation des concentrations de GSH cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA : Dose Journalière Admissible 1,43 mg/kg, DF : Dose Faible 0,143 mg/kg, DT : Dose Toxique), ses Produits de bioDégradation (PD : 0,143 mg/kg) et la Quercétine (QR : 14,28mg/kg). Les résultats sont donnés en Moyenne ± écart type, n=8, test de student : * p<0.05, comparaison par rapport au témoin.

Une diminution significative ($p<0,05$) de la réserve en GSH cytosolique est marquée chez les souris recevant la dose journalière admissible du Diclofénac ($1,087 \pm 0,221$ mmole/g de tissus) par rapport aux souris témoin ($1,337 \pm 0,080$ mg équivalent MDA/ g de tissus).

Le taux de GSH cytosolique est maintenu inchangé chez les souris des groupes restants DF, DT, PD et QR.

Le Diclofénac est métabolisé par le CYP3A4 en 5-OH-Diclofénac, qui est ensuite conjugué par voie urinaire en acide mércapturique chez l'humain (Boelsterli, 2003), ce qui explique la diminution de la réserve en GSH.

Une étude rapport que le rôle du stress oxydatif dans l'hépto-toxicité de Diclofénac est associé à l'augmentation dose-dépendante de la transcription des ARNm de l'hème oxygénase-1 une protéine du stress dans le foie des souris et dans les hépatocytes de rat.

Ils ont aussi observé une diminution de GSH, une augmentation des métabolites réactifs et une activation de la voie NF-kB et AP1 dans l'hépatocyte (Cautouni et al., 2003).

II.1.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la GST

Les résultats de l'effet du Diclofénac sur l'activité enzymatique du GST cytosolique et de ses produits de biodégradation sont présentés dans le tableau IV et la figure 10.

Tableau IV : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de GST cytosolique

	Témoin	DJA	DF	DT	PD	QR
Protéines(mg/ml)	14,261±2,006	13,694±2,648	16,253±2,561	18,376±1,542	14,156±2,512	16,217±2,339
Activité de GST µmole/min/mg de Prot.	1,423± 0,134	1,632±0,072**	1,485± 0,115	1,187±0,289	1,422± 0,194	1,208±0,090**

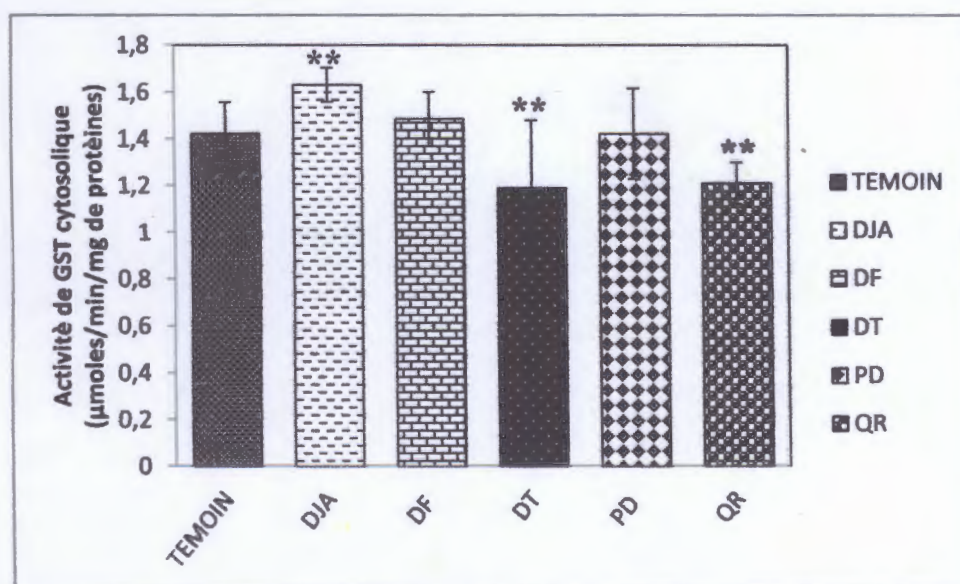


Figure 10: Variation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA : Dose Journalière Admissible 1,43 mg/kg, DF : Dose Faible 0,143 mg/kg, DT : Dose Toxique), ses Produits de bioDégradation (PD : 0,143 mg/kg) et la Quercétine (QR : 14,28mg/kg). Les résultats sont donnés en Moyenne ± écart type, n=8, test de student : ** p<0.01, comparaison par rapport au témoin.

L'activité enzymatique de la GST hépatique montre une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) chez les souris recevant la dose journalière admissible ($1,632 \pm 0,072$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot.) par rapport au témoin ($1,423 \pm 0,134$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot.).

Par contre, l'activité enzymatique est diminuée d'une façon hautement significatif ($p < 0,01$) chez les lots recevant le Diclofénac en dose toxique ($1,485 \pm 0,115$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot.) et celles recevant la Quercétine ($1,208 \pm 0,090$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de Prot.) en comparaison au témoin.

La variation de l'activité enzymatique de GST cytosolique chez les souris recevant la dose faible et les souris recevant les produits de biodégradation est non significative en comparaison avec le lot témoin.

D'autre part l'induction de la GST chez le groupe traité par le Diclofénac en DJA peut être traduite par l'état de stress oxydatif inhérent à la présence des ROS.

L'activité de la GST est diminuée chez le groupe traité par le Diclofénac en DT ce qui peut être expliquée par l'augmentation de la production des ROS induit par le Diclofénac conduisant à l'altération du GST.

II.1.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la Catalase

Les résultats de l'effet du Diclofénac et de ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique sont présentés dans le tableau V et la figure 11.

Tableau V : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la Catalase cytosolique

	Témoin	DJA	DF	DT	PD	QR
Protéines mg/ml	14,261 \pm 2,006	13,694 \pm 2,648	16,253 \pm 2,561	18,376 \pm 1,542	14,156 \pm 2,512	16,217 \pm 2,339
Activité de Catalase (moles H₂O₂/min/mg de Prot.)	0,029 \pm 0,003	0,043 \pm 0,003**	0,034 \pm 0,005	0,021 \pm 0,004	0,031 \pm 0,003	0,031 \pm 0,006

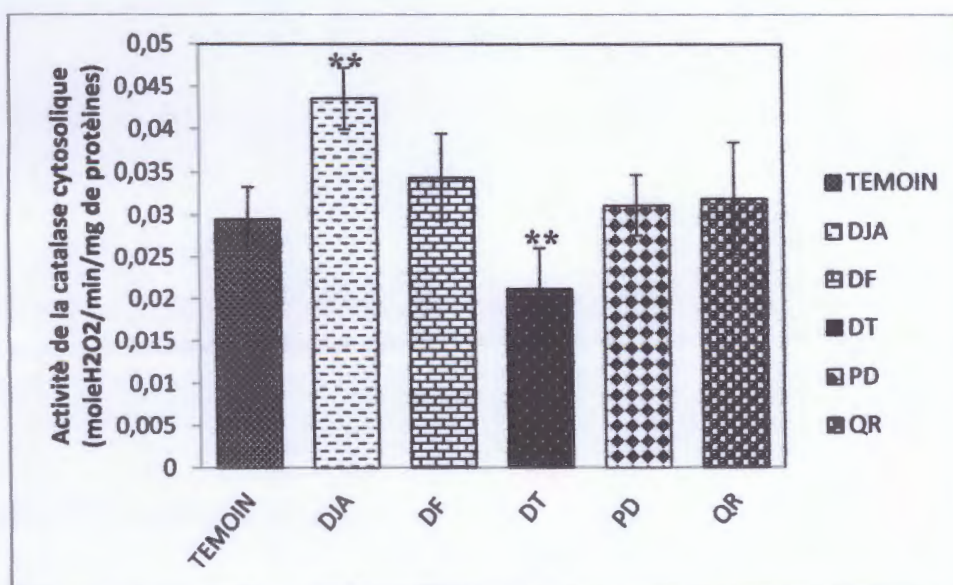


Figure 11: Variation de l'activité enzymatique de la Catalase cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA : Dose Journalière Admissible 1,43 mg/kg, DF : Dose Faible 0,143 mg/kg, DT : Dose Toxique), ses Produits de bioDégradation (PD : 0,143 mg/kg) et la Quercétine (QR : 14,28mg/kg). Les résultats sont donnés en Moyenne \pm écart type, $n=8$, test de student : $**p<0,001$, comparaison par rapport au témoin.

L'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique a diminué d'une façon hautement significative ($p<0,01$) chez les souris recevant la dose journalière admissible du Diclofénac ($0,043\pm 0,003$ moles H_2O_2 /min/mg de Prot.) par rapport les souris témoin ($0,029\pm 0,003$ moles H_2O_2 /min/mg de Prot.).

En outre, une diminution non significative de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique est marquée chez les souris recevant la dose toxique du Diclofénac ($0,021\pm 0,004$ moles H_2O_2 /min/mg de Prot.) en comparaison avec le lot témoin ($0,029\pm 0,003$ moles H_2O_2 /min/mg de Prot.). Cette activité enzymatique est maintenue inchangée chez les groupes restant (DF, PD, QR) par rapport toujours au groupe témoin.

Face au stress oxydatif dû à l'utilisation de xénobiotique tel que le Diclofénac, une induction des enzymes de détoxifications est observée dans les cellules hépatiques représentée par l'augmentation de l'activité du CAT.

II.1.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD

Les résultats de l'effet du Diclofénac et de ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique sont présentés dans le tableau VI et la figure 12.

Tableau VI : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique

	Témoin	DJA	DF	DT	PD	QR
Protéines mg/ml	14,261±2,006	13,694±2,648	16,253±2,561	18,376±1,542	14,156±2,512	16,217±2,339
Activité de SOD (U/mg de Prot.)	19,691±0,634	13,580±0,968 ***	18,023±1,362	5,655±0,893***	18,536±0,659	17,816±1,205

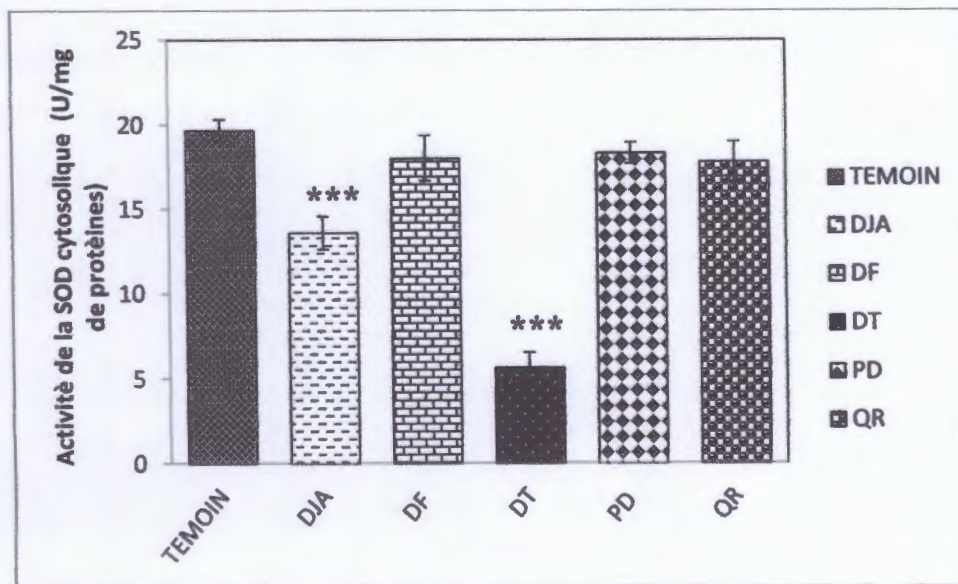


Figure 12: Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA : Dose Journalière Admissible 1,43 mg/kg, DF : Dose Faible 0,143 mg/kg, DT : Dose Toxique), ses Produits de bioDégradation (PD : 0,143 mg/kg) et la Quercétine (QR : 14,28mg/kg). Les résultats sont donnés en Moyenne ± écart type, n=8, test de student : ***p<0,001, comparaison par rapport au témoin.

L'activité enzymatique de la SOD cytosolique est diminuée d'une façon très hautement significative (p<0,001) chez les souris recevant la dose journalière admissible du Diclofénac (13,580±0,968 U/mg), ainsi que chez celles recevant la dose toxique (5,655± 0,893 U/mg) en comparaison au lot témoin (19,691±0,634 U/mg).

Cette activité enzymatique est maintenue inchangée chez le reste des lots (DF, PD et QR) par rapport au groupe témoin.

La diminution de l'activité de la SOD chez les lots recevant le diclofénac en forte doses (DJA et DT) est expliquée par l'augmentation du taux des ROS dans les hépatocytes et donc une production excessive de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) qui provoque l'altération de la SOD.

Des travaux de recherche rapportent que le Diclofénac induit une insuffisance mitochondriale induisant la génération des ROS conduisant au stress oxydatif et à l'apoptose dans l'hépatocyte (Sokol et al., 2001 ; Gomez-Lechon et al., 2003)

II.2. Evaluation du stress oxydatif dans le sérum

II.2.1. Evaluation des concentrations de GSH

Les résultats de l'effet du Diclofénac et de ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique sont présentés dans le tableau VII et la figure 13.

Tableau VII : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur la concentration du GSH plasmatique

	Témoin	DJA	DF	DT	PD	QR
GSH ($\mu\text{mol/ml}$ plasma)	0,166 \pm 0,015	0,190 \pm 0,033	0,168 \pm 0,008	0,158 \pm 0,001	0,192 \pm 0,028	0,268 \pm 0,030**

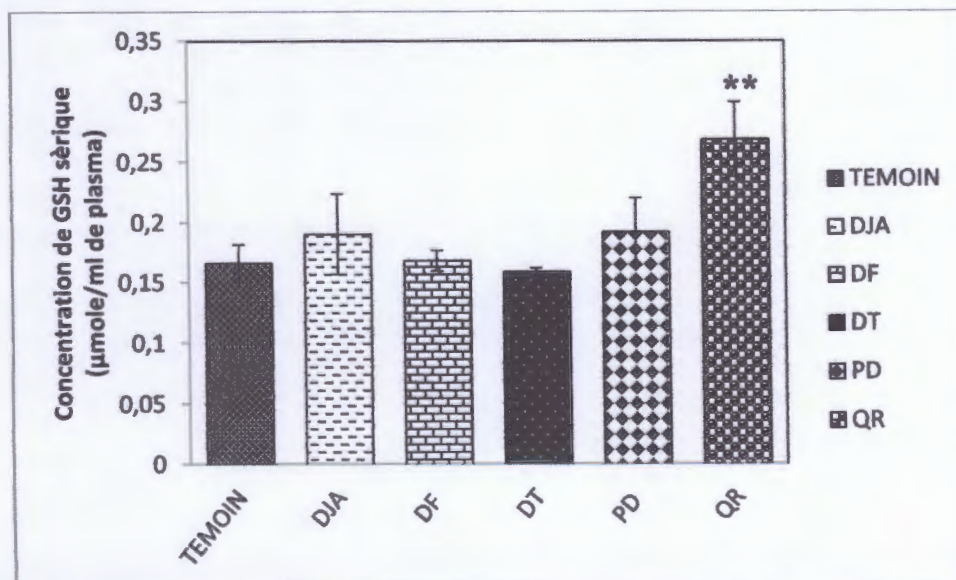


Figure 13: Variation des concentrations de GSH plasmatique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA : Dose Journalière Admissible 1,43 mg/kg, DF : Dose Faible 0,143 mg/kg, DT : Dose Toxique), ses Produits de bioDégradation (PD : 0,143 mg/kg) et la Quercétine (QR : 14,28mg/kg). Les résultats sont donnés en Moyenne \pm écart type, n=8, test de student : **p<0,001, comparaison par rapport au témoin.

Les résultats montrent une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) de la concentration du GSH plasmatique chez les souris recevant la Quercétine par rapport au témoin ($0,166 \pm 0,015 \mu\text{mol/ml}$ plasma).

Par contre la réserve de GSH plasmatique chez les lots recevant le Diclofénac (DJA, DF, DT) et les souris recevant les produits de biodégradation par rapport au témoin.

II.2.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la GST :

Les résultats de l'effet du Diclofénac et de ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique de la GST cytosolique sont présentés dans le tableau VIII et la figure 14.

Tableau VIII : Effet du Diclofénac et ses produits de biodégradation sur l'activité enzymatique du GST sérique

	TEMOIN	DJA	DF	DT	PD	QR
GST (UI/ml)	0,201±0,013	0,165±0,029	0,186±0,025	0,228±0,065	0,180±0,014	0,152±0,009**

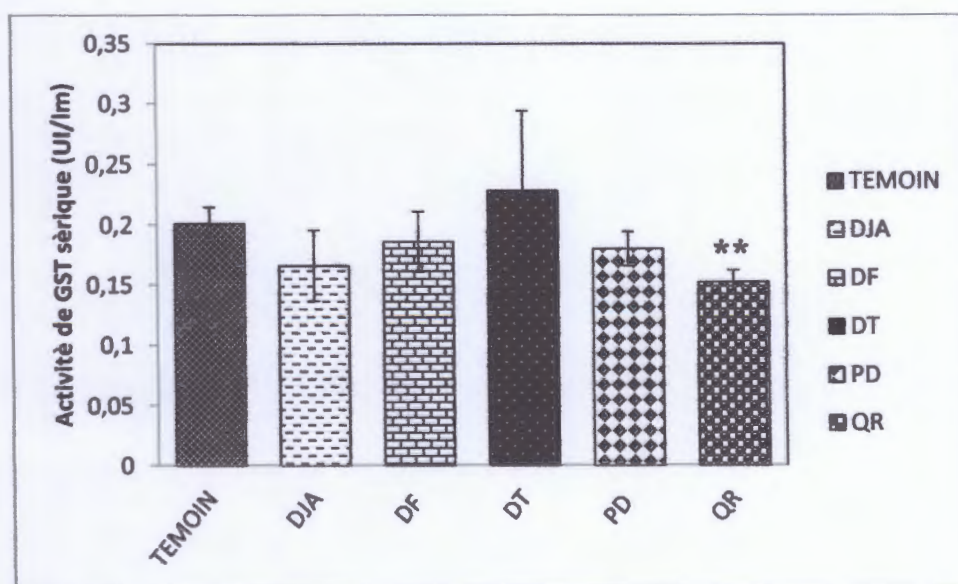


Figure 14: Variation de l'activité enzymatique de la GST sérique chez les souris traitées par le Diclofénac (DJA : Dose Journalière Admissible 1,43 mg/kg, DF : Dose Faible 0,143 mg/kg, DT : Dose Toxique), ses Produits de bioDégradation (PD : 0,143 mg/kg) et la Quercétine (QR : 14,28mg/kg). Les résultats sont donnés en Moyenne \pm écart type, $n=8$, test de student : ** $p < 0,001$, comparaison par rapport au témoin.

Une diminution hautement significative ($p < 0,01$) de l'activité enzymatique du GST sérique est enregistrée chez les souris recevant la Quercétine ($0,152 \pm 0,009$ UI/ml). Par rapport au témoin ($0,201 \pm 0,013$ UI/ml). Cette activité est diminuée non significativement chez les souris recevant le Diclofénac (DJA et DF) ainsi que celle recevant les produits de biodégradation en comparaison au témoin.

Par contre, les résultats montrent une augmentation non significative de l'activité enzymatique du GST chez les souris recevant la dose toxique ($0,228 \pm 0,065$ UI/ml) du Diclofénac par rapport au témoin ($0,201 \pm 0,013$ UI/ml).

Les dosages sériques analysés n'ont montrés aucunes différences significatives en comparaison avec le témoin.

Notre étude est menée pendant une courte durée (7 jours), cette période n'est pas suffisante pour obtenir des résultats significative, donc il faut faire une étude dont la période du traitement sera plus long.

Conclusion

Ces dernières décennies plusieurs études ont montré que la présence des produits pharmaceutique dans les eaux usées urbaines à des concentrations variant du ng.L^{-1} au $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les temps de résidence des médicaments dans l'environnement varient en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

L'exposition répétée à ces produits conduit à des effets secondaires délétères sur les fonctions physiologiques de l'organisme.

Le présent travail expérimental a montré par une étude de courte durée (07 jours) que l'exposition au diclofénac à différentes doses conduit à une perturbation des paramètres marqueurs du stress oxydatif représenté par une diminution de la réserve de GSH , une lipoperoxydation et une perturbation des activités des enzymes de détoxification hépatique (SOD ,CAT ,GST) .

Ces données contribuent à l'évaluation des effets toxiques du diclofénac après une exposition à des doses élevés (DJA, DT).En revanche le traitement par des doses faibles n'a pas eu de conséquences nocives sur les paramètres du stress.

En perspective, une exposition plus longue aux produits de biodégradation du diclofénac devrait compléter l'étude préliminaire que nous avons tenté de réaliser.

Références
Bibliographiques

A

Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 324-329.

Alukidy M., Varlicchi P., Jelic A., Petrovic M. and Barcelo D., 2012. Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment* 438: 15 – 25.

Aouacheri W., S. Saka, R. Djafer, G. Lefranc. 2009. *Effet protecteur du diclofénac contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez le rat*. *Ann Biol Clin* ; 67 (6) : 619-27.

B

Balaraman K., 2013. Oxidants, Antioxidants and Disease Mechanisms; *Redox Biology*. S2213-2317(13)00035-9.

Beauchamp C., Fridovich I., 1971. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem*. 44: 276 -287.

Beaudeau J. L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D. & Legrand A., Peynet J., 2006. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-anal. & Biol. spécialisée* 21, 144-150.

Berger M. M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances ; *Nutr. Clin. et métabolisme* 20, 48- 53.

Boelsterli U.A., 2003. *Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192: 307–322.

Boelsterli U.A., 2003; *Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity*, *Toxic. And Appl. Pharm.* 192:301-322.

Buonocore G., Perrone S., Tataranno M. L., 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species; *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 15, 186-190.

C

Calderon-Garciduenas L., Wen-Wang L., Zhang Y. J., Rodriguez-Alcaraz A., Osnaya N., Villareal-Calderon A. & Santella, R. M., 1999. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ. Health Perspect.* 107, 464-474.

Cantoni L., Rea Valaperta, Xavier Ponsoda, Jose V. Castell, Davide Barelli, Milena Rizzardini, Alessandra Mangolini, Lisa Hauri, Pia Villa. 2003. *Journal of Hepatology* 38: 776–783

Carocho M., Ferreira I. C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives; *Food and Chem. Toxicology* 51, 15–25.

Cash T. P., Pan Y., Celeste Simon M., 2007. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Rad. Biol. & Med.* 43, 1219 – 1225.

Clairborne A., 1985. Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 283-284.

D

Das K. C., Lewis-Molock Y., White C. W., 1997. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thiorédoxine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 713-726.

Dasuri K., Zhang L., Keller J. N., 2012. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*

Dennert G., Zwahlen M., Brinkman M., Vinceti M., Zeegers M. P. & Horneber M., 2011. Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 11: CD005195.

E

Ellman G. L., 1959. Plasma antioxidants. *Arch. Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77

Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13, p. 341.

F

Favier A., 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*.

Forman H. J. & Cadenas E., 1997. *Oxidative stress and signal transduction*. British Library.

Fransen M., Nordgren M., Wang B. & Apanasets O., 2012. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochim. et Biophys. Acta* 1822, 1363–1373.

Franz-Xavier Reichl et al., 2010. *Guide pratique de toxicologie* (2^{ème} éd.). deboeck. Paris. P : 146-150

G

Gomez-Lechon MJ., Ponsoda X., O'Conno E., Donato T., Jose V. Castell, Jover R. 2003. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical Pharmacology* 66: 2155–2167

Goudable J. & Favier A., 1997; Radicaux libres oxygénés et antioxydants; *Nutr. Clin. Mdtabol.* 11, 115-20.

Gröning J. Held C., Garten C., Claussnitzer U., Kaschabek S.R., Schlömann M., 2007. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate, *Chemosphere* 69: 509-519.

H

Habig W. H., Pabst, M. J. et Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*; 249: 7130-7139.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P., 2007. Le stress oxydant. *Rev. Med. Liege.* 62:10, 628-638.

Halling-Sorensen B, Holten H.C, Anderson H.R and F. Ingerslev., 2000. Environmental risk of antibiotics: Comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: 46. Suppl. S1.53-58

Heberer T., 2002 Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131:5–17

Hickey E.J., Raje R.R., Reid V.E., Gross S.M. & Ray S.D., 2001; Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death; *Free Rad. Biol. Mes.* 31: 139-52.

J

Ježek P., Hlavatà L., 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 37, 2478–2503.

K

Koechlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr. Clin. et métabolisme* 20, 165 – 177.

Kolanjiappana K., Manoharana S. et Kayalvizhi M., 2002; Mesurment of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidant and osmotic fragility in cervical cancer patients; *Clinica Chimica*, 326:143-149.

Konstandinidou M., Angeliki K., Minas Y., Lygeri H., Dimitra K-D., Sotiris H, Mavroudis., 1998 *Anti-inflammatory properties of diclofenac transition metalloelement complexes*. J. Inorg. Biochem. 70: 63–69.

L

Lee J.C., Son Y.O., kumar P.P., Shi X., 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis. Free Rad. Biol. and Med. 53, 742–757.

Lee M., Cho T., Jantaratnotai N., Wang Y. T., McGeer E. & McGeer P. L., 2010. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. FASEB J. 24, 2533-2545.

Levine R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free. Radic. Biol. Med. 32, 790-796.

M

Macášek J., Zeman M., Vecka M., Vávrová L., Kodydková J., Tvrzická E. & Íák A., 2011. Reaktivní kyslíkové a dusíkové sloučeniny v klinické medicíně. časopis lékařů českých. 150 (8).

Maghzal G. J., Krause K.H., Stocker R., Jaquet V., 2012. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. Free Rad. Biol. and Med. 53, 1903–1918.

MEDAN J., 2004. Dictionnaire Vidal, 8^{éd}, Paris, 1928-1929.

N

Naisbitt D.J., Naisbitt, Louise S. Sanderson, Xiaoli M, Andrew V. Stachulski, Stephen E. Clarke, B. Kevin Park., 2007. *Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenac metabolites*. Toxicology Letters 168: 45–50

Nordberg J. & Arnér E. S. J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Rad. Biol. & Med. Vol, 31.No, 11. 25, 1287–1312.

O

Ohkawa H., Ohishi, N., Yagi K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. Analytical Biochemistry 95: 351-35

Oldham K. M., Bowen P. E., 1998. Oxidative stress in critical care: Is antioxidant supplementation beneficial?. Am. J. Diet. Assoc. 98, 1001 – 1008.

Oviedo-Gómez D.G.C., Marcela G-M, Sandra G-M, Celene R-E, Leobardo Manuel Gómez-Oliván., 2010. *Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in Hyalella Azteca*. Environmental Toxicology and Pharmacology 29: 39–43.

P

Pasquier C., 1995. Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*. N ° 276.

Pasrore A., Federici G., Bertini E. & Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin.Chim.Acta*. 333, 19-39.

Peng J. Jones G.L. & Watson K., 2000, Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free. Radic. Biol. Med.* 28, 1598-1606.

Pham-Huy L. A., He H. & Pham-Huy C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* vol. 4 no. 2.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16, 233–239.

S

Sardina J. L., López-Ruano G., Sánchez-Sánchez B., Llanillo M., Hernández-Hernández A., 2012. Reactive oxygen species: Are they important for haematopoiesis?. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 81, 257–274.

Sies H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91, 31S-38S.

Sokol R.J., Straka M.S., Daha R., Devereaux M.W., Yerushalmi B., Gumprich E., et al., 2001; Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acid; *Pediatric Res.* 49:519-31.

Sorg O., 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *C. R. Biologies* 327, 649–662.

V

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T.D., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 39, 44–84.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biolog. Interac.* 160,1-40.

W

Wang Y., 2008. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 276-281.

Weber B., 2009. Capacité antioxydante totale, antioxydants et marqueurs du stress oxydatif. Dosages effectués aux Laboratoires Réunis, Junglinster (Luxembourg).

X

Xiong Y., Tew J.D., Townsend D.M., 2011. S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid.Redox Signal.* 15, 233-270.

Y

Yano A., 2012. Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *Toxicology* 293: 107–114.

Z

Zhang Y., Geißen SU., Carmen G., 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73:1151–1161

Résumé

Résumé

Le Diclofénac est un Anti inflammatoire Non Stéroïdien(AINS) parmi les agents thérapeutiques les plus fréquemment prescriten clinique et en vétérinaire pour le traitement des maladies inflammatoires, des arthrites. Il est souvent associé à l'insuffisance hépatique.

L'effet pro-oxydant du Diclofénac a été démontré par le traitement à une dose thérapeutique ou toxique. En revanche le traitement par les produits de biodégradation n'a montré aucun effet sur les paramètres du stress oxydatif pour une étude de courte durée (sept jours). Notre étude a montré que le traitement thérapeutique par le Diclofénac entraine une perturbation du profil de stress oxydatif hépatique et sérique par mesure des paramètres biomarqueurs tels que le GSH, le MDA et les activités enzymatiques (GST, SOD, Cat).

Mots clés: Diclofénac, stress oxydative, produits de biodégradation

Abstract

Diclofenac is a Non-Steroidal Anti-inflammatory drug (NSAID) among the most frequently prescribed therapeutic agents worldwide used in clinical and veterinary treatments of inflammatory diseases, arthritis. It is often associated with liver failure.

The pro-oxidant effect of Diclofenac was demonstrated by treatment with toxic doses. However treatment by biodegradation products showed no effect on oxidative stress parameters for short-term study (seven days). Our study showed that therapeutic treatment with Diclofenac disturbed the oxidative stress profile in liver and serum after assessment of stress parameters such as GSH, MDA and enzyme activities (GST, SOD and CAT).

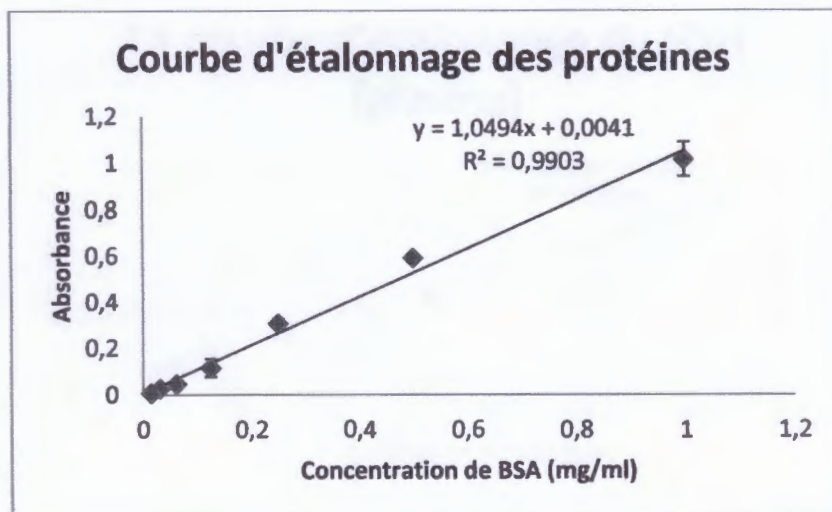
Keywords: Diclofenac, oxidative stress, products of biodegradation

Annexes

Annexe 1 : La courbe d'étalonnage des protéines

Tableau : concentration pour la réalisation de la gamme d'étalonnage de la BSA

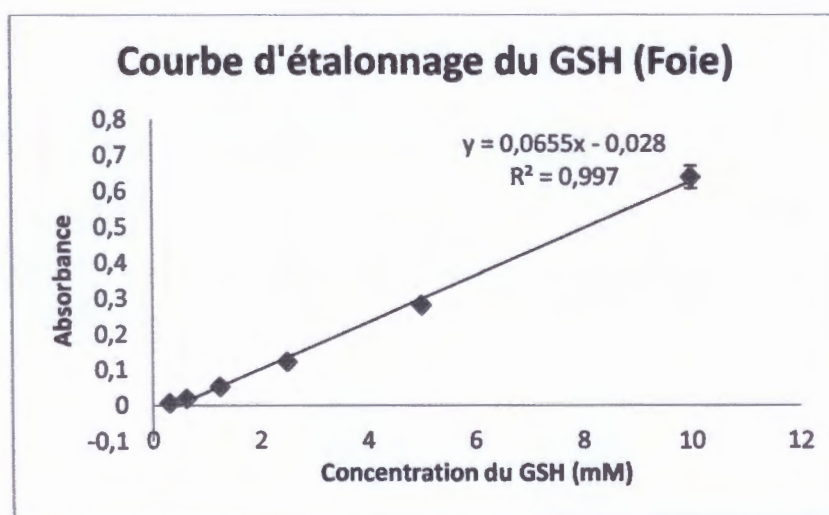
Concentration de BSA (mg/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015
D.O.1	0,964	0,583	0,293	0,088	0,034	0,023	0,006
D.O.2	1,068	0,602	0,321	0,142	0,057	0,031	0,007



Annexe 2 : La courbe d'étalonnage de GSH (pour le dosage dans le foie)

Tableau : concentration pour la réalisation de la gamme d'étalonnage du GSH

Concentration de GSH (mM)	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312
D.O.1	0,617	0,274	0,117	0,05	0,015	0,001
D.O.2	0,661	0,289	0,128	0,056	0,024	0,012



Présenté par : Birouk Sara
Hadjici Mériem
Harrouche Nouzha

Encadreur : Mme Benguedouar

Date de soutenance : 04 Juillet 2013

Thème :

Evaluation du profil de stress oxydatif induit par le Diclofénac et ses dérivés de biodégradation chez la souris

Résumé :

Le Diclofénac est un Anti inflammatoire Non Stéroïdien (AINS) parmi les agents thérapeutiques les plus fréquemment prescrits cliniquement et en vétérinaire pour le traitement des maladies inflammatoires, des arthrites. Il est souvent associé à l'insuffisance hépatique. L'effet pro-oxydant du Diclofénac a été démontré par le traitement à une dose thérapeutique ou toxique. En revanche le traitement par les produits de biodégradation de Diclofénac n'a montré aucun effet sur les paramètres du stress oxydatif pour une étude de courte durée (sept jours). Notre étude a montré que le traitement thérapeutique par le Diclofénac entraîne une perturbation du profil de stress oxydatif hépatique et sérique par mesure des paramètres biomarqueurs tels que le GSH, le MDA et les activités enzymatiques (GST, SOD, Cat).

Mots clés: Diclofénac, stress oxydative, produits de biodégradation

Abstract :

Diclofenac is a Non-Steroidal Anti-inflammatory drug (NSAID) among the most frequently prescribed therapeutic agents worldwide used in clinical and veterinary treatments of inflammatory diseases, arthritis. It is often associated with liver failure.

The pro-oxidant effect of Diclofenac was demonstrated by treatment with therapeutic or toxic doses. However treatment by biodegradation products of Diclofenac showed no effect on oxidative stress parameters for short-term study (seven days). Our study showed that therapeutic treatment with Diclofenac disturbed the oxidative stress profile in liver and serum after assessment of stress parameters such as GSH, MDA and enzyme activities (GST, SOD and CAT).

Keywords: Diclofenac, oxidative stress, products of biodegradation

المخلص

الديكلوفيناك هو مضاد للالتهاب غير ستيرويدي من بين المؤثرات العلاجية الأكثر وصفاً لعلاج أمراض الالتهاب، التهاب المفاصل وفي الطب البيطري، غالباً ما يكون مرفوقاً بعجز كبدية. تأثير الديكلوفيناك المسبب للأكسدة تم تأكيده عن طريق العلاج بجرعات علاجية أو سامة، لكن العلاج بنواتج التحلل البيولوجي للديكلوفيناك لم يظهر أي تأثير على معلمات الاجهاد التأكسدي من خلال دراسة تمت في وقت قصير (سبعة أيام). أظهرت دراستنا أن العلاج بالديكلوفيناك يسبب اضطراب معلمات الاجهاد التأكسدي الكبدية المصلية بواسطة قياس معلمات المؤشرات الحيوية مثل GSH، MDA، و الأنتشطة الإنزيمية، (CAT, SOD, GST).

الكلمات المفتاحية: الديكلوفيناك، الاجهاد التأكسدي، نواتج التحلل البيولوجي.