



الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Option : TOXICOLOGIE

Intitulé

**Evaluation à l'échelle cellulaire et subcellulaire de la toxicité d'un
composé de la famille des dihydropyridines sur un modèle
expérimental bioindicateur de stress.**

Présentée Par : CHERAIT Asma

Membres du Jury :

Dr. KHEBBAB Mohammed El Hadi	Prof.	Université d'Annaba	Président
Dr. DJEBAR Mohammed Réda	Prof.	Université d'Annaba	Directeur de thèse
Dr. BERREBBAH Houria	Prof.	Université d'Annaba	Examineur
Dr. ROUABHI Rachid	Prof.	Université de Tébessa	Examineur
Dr. GRARA Nedjoud	M.C.A.	Université de Guelma	Examineur

Année universitaire : 2014 /2015

Remerciements

Je remercie DIEU de m'avoir donné la force, le courage, la patience, et un peu de sa grande sagesse pour être ce que je suis aujourd'hui.

*J'aimerais aussi adresser mes plus sincères gratitudee à mon directeur de thèse,
le Professeur DJEBAR Mohammed Reda,
un homme de science passionné, dévoué et perspicace, qui a à cœur la formation et la réussite de ces disciples. Merci pour votre soutien, vos conseils, pour votre esprit de synthèse et votre érudition qui représentent un exemple à suivre. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour votre confiance ininterrompue en mes compétences scientifiques et humaines.*

*Je tiens aussi particulièrement à exprimer mes vifs et sincères remerciements au
Professeur BERREBBAH Houria
de l'université d'Annaba pour sa disponibilité, sa grande patience, et toutes les corrections qu'elle a bien voulu apporter à ce travail
Et pour avoir accepté d'en être l'examineur
Merci du fond du cœur*

*Je remercie très vivement Monsieur **KHEBAB Mohamed El Hadi,** professeur à
l'université d'Annaba,
pour l'intérêt et l'attention qu'il a accordé à ce travail de thèse,
et pour avoir accepté d'être le Président du Jury.*

*Ces mêmes remerciements s'adressent à Monsieur ROUABHI Rachid, professeur à
l'université de Tébessa,
d'avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*J'exprime également toute ma gratitude à Melle GARARA Nedjoud Maitre de
Conférence à l'université de Guelma, pour avoir
accepté de faire partie de ce jury.*

*Merci à tous les professeurs qui m'ont donné l'envie d'apprendre, la curiosité
intellectuelle, et le goût de la recherche.*

*Merci à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de
ce travail de thèse*

*Et enfin je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble de mes collègues et ami(e)s du
laboratoire LTC*

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents à qui je dois tout

A mes sœurs et mon frère que j'adore

A ma grande et belle famille

A mon futur mari

A mes ami(e)s

RESUMES

Résumé :

La Nifédipine est un antagoniste calcique de la famille des Dihydropyridines, principalement utilisée pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Cette molécule peut être utilisée dans un autre registre thérapeutique à titre préventif et protecteur contre le stress oxydatif grâce à son potentiel antioxydant. Cependant, son effet reste controversé et paradoxal en raison de ses capacités prooxydantes puisqu'elle est également à l'origine du déclenchement d'un stress oxydatif.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de la Nifedipine sur le stress oxydatif et ce par le suivi des différents biomarqueurs induits par les ROS. Pour notre approche, nous avons utilisé un organisme alternatif, *Saccharomyces cerevisiae*.

Plusieurs concentrations de Nifedipine ont été choisies (0.01mM, 0.05mM, 0.5mM et 1mM) et différents paramètres physiologiques (croissance et pourcentage de réponse), biochimiques (protéines totales, lipides et glucides totaux), énergétiques (respiration) et les biomarqueurs de stress oxydatif (NCPR, GST, GSH, TBARS, CAT, APX, GPX, SODs, BAPs, ROMs) sont mesurés après 1h, 2h, 3h, 4h et 24h de traitement.

Les résultats obtenus montrent une inhibition de la croissance cellulaire, de la respiration cellulaire ainsi qu'une diminution des taux des lipides et glucides totaux. Nous avons également mis en évidence une diminution du taux du GSH et une stimulation des enzymes de la métabolisation/détoxification comme la GST, CAT, APX, GPX, SODs, en plus d'une augmentation du taux des protéines totales et des TBARS. Ces données indiquent clairement le déclenchement d'un stress oxydatif. Cependant le suivi de l'état Redox cellulaire a mis en évidence une augmentation des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) parallèlement à une stimulation du potentiel antioxydant biologique (BAPs), indiquant le caractère passif de ce stress oxydatif induit par la Nifedipine.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, état Redox, stress oxydatif, Nifedipine

Abstract :

Nifedipine is a Dihydropyridine calcium channel blocker -currently employed like an antihypertensive drug- induces specific pharmacological effects by binding to L-type calcium channels. However it can be used as another therapeutic option due to its inhibitory effects of oxidative stress and ROS increases. Nevertheless, several studies reported that Nifedipine can induce a strong and protracted stress response.

In this present work, we sought to investigate the effect of this Dihydropyridine on oxidative stress, and for this, we have chosen a stress bioindicator organism, *Saccharomyces cerevisiae*, like an alternative model to animal testing. The choose of this model was dictated not only for its organization highly similar to higher eukaryotic cells at both macromolecules and organelles levels, but especially, by the presence of the protein Cch1, the homolog of α_1 /Cav subunits of voltage gate calcium channels in mammals, pharmacologically similar to L-type calcium channels, and thereby Cch1 is sensible to the dihydropyridines actions.

Therefore, a culture of *Saccharomyces cerevisiae* was treated with different concentrations of Nifedipine. In our approach to assess the effects of this molecule, we measured the yeast cell growth, the respiration activity and the rate of lipids, proteins and carbohydrates. In addition to the levels of some stress biomarker (TBARS levels, GSH, GST, NCPR, CAT, APX, GPX, SODs). We also measured the cellular Redox state (BAPs and ROMs).

As a result of this research, Nifedipine have a decrease on cell proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*, this inhibitory effect was dose-dependent and proportional to increasing concentrations of Nifedipine. The same result was found about the respiration activity, the lipids and carbohydrates rates, when the results of proteins rate shown an increase of this parameter. We have also demonstrated an increase of both TBARS levels (lipidic peroxidation) and all antioxidant enzymes measured after exposure to Nifedipine, together with a decrease of non enzymatic antioxidants (GSH levels). Our results indicate clearly an occurrence of oxidative stress, however, the condition of the cellular Redox state characterized by the increase of the levels of reactive oxygen metabolites (ROMs) counterbalanced by a stimulation of biological antioxidant potential (BAPs) and antioxidant defense system, can be defined this stress as "passive oxidative stress". Finally, it emerge that *Saccharomyces cerevisiae* can be used as an optimal "model drug".

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, Redox state, oxidative stress, Nifedipine

الملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير النيفيديبين على الأكسدة ، حيث أن بعض الدراسات أثبتت بأن هذا الدواء -والذي يستخدم عادة لعلاج أمراض القلب- له خصائص مضادة للأكسدة، غير أن دراسات أخرى أشارت إلى أنه مصدر للأكسدة. ولإجراء هذه الدراسة فقد تم استخدام الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* كنموذج بيولوجي. وقد بينت النتائج المتحصل عليها بأن هذا الدواء له تأثير سلبي على النمو الخلوي للخميرة كما أثبتته حساب النسبة المئوية للاستجابة. كما أظهرت النتائج نقص في الايضات الرئيسية المتمثلة في الغلوسيدات والدهنيات على خلاف البروتينيات التي تم تسجيل ارتفاع في معدلها. وقد أظهر رصد الايض التنفسي تثبيط في استهلاك الأوكسجين. أما فيما يخص المؤشرات الحيوية للأكسدة فقد تبين وجود تنشيط انزيمي لكل من (CAT , NCPR, GST, APX, GPX, SODs) مع انخفاض في معدل GSH. كما سجلت نتائج الدراسة أيضا ارتفاع في معدل TBARS مما يدل على وجود أكسدة للدهون. وأخيرا أبرزت دراسة حالة أكسدة/ارجاع الخلوي (état redox) زيادة في كل من ROMs و BAPs . كل هذه النتائج بينت وجود حالة أكسدة ذات طبيعة عابرة للنيفيديبين (*stress oxydatif passif*) .

الكلمات المفتاح: أكسدة، نيفيديبين، خميرة ساكاروميس سيريفيزيا (*Saccharomyces cerevisiae*)، حالة أكسدة/ارجاع

SOMMAIRE

Liste des Figures	13
Liste des tableaux	16
Liste des abréviations	17

Chapitre I. INTRODUCTION GENERALE

Préambule	19
Objectif du travail	22
I. Les canaux calciques et leurs antagonistes	24
1. Le calcium	-
2. Les canaux calciques membranaires	25
2.1. Les canaux calcium activés par un ligand (ROC)	26
2.2. Les canaux de calcium voltage-dépendants (VOC)	-
2.2.1. Les canaux de la famille CaV1 (les canaux de type L)	29
2.2.2. Les canaux de la famille CaV2	31
• Les canaux de type P/Q ou CaV2.1	-
• Les canaux de type N ou CaV2.2	32
• Les canaux de type R ou CaV2.3	-
2.2.3. Les canaux de la famille CaV3 (type T)	-
3. Les Antagonistes calciques	34
3.1. Les dihydropyridines	35
3.2. La Nifedipine	36
3.2.1. Pharmacocinétiques	-
3.2.2. Mécanisme d'action	37
3.2.3. Nifedipine et stress oxydatif	38
II. Les levures	43
1. Généralités sur Les Levures	-
1.1. Caractéristiques structurales	44
1.2. Cycle de croissance	45
1.3. Cycle cellulaire	46
1.4. Métabolisme levurien	48

1.4.1. L'Effet Pasteur	49
1.4.2. L'effet Crabtree	-
2. La levure comme modèle eucaryote	50

Chapitre II. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	54
1.1. Matériel biologique	-
1.2. Matériel chimique	-
2. Méthodes	55
2.1. La culture des Levures	-
2.1.1. Protocole de lavage et mise en culture	-
2.1.2. Le milieu de culture	-
2.2. Cinétique de la croissance cellulaire	56
2.3. Calcul du pourcentage de réponse	-
2.4. Dosage des métabolites	-
2.4.1. Dosage des protéines totales	-
2.4.2. Dosage des lipides totaux	-
2.4.3. Dosage des glucides totaux	57
2.5. Mesure de l'activité respiratoire	58
2.6. Dosages des biomarqueurs de stress oxydant	59
2.6.1. Préparation de l'extrait enzymatique	-
2.6.2. Dosage de l'activité Catalase	-
2.6.3. Mesure de l'activité Peroxydase	60
2.6.4. Dosage de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)	-
2.6.5. Dosage du NADPH Cytochrome P450 réductase (NCPR)	61
2.6.6. Mesure de l'activité Glutathion S-transférase (GST)	62
2.6.7. Dosage du glutathion (GSH)	63
2.6. 8. Dosage de la peroxydation lipidique (Le TBARS test)	-
2.6.9. Mesure de l'état Redox cellulaire	65
• Mesure des métabolites réactifs d'oxygène (ROM)	-
• Mesure du potentiel antioxydant biologique (BAP)	-

3. Analyses statistiques	66
--------------------------------	----

Chapitre III. RESULTATS

Effet de la Nifedipine sur

1. La cinétique de croissance cellulaire	68
2. Le Pourcentage de Réponse	69
3. Le taux des protéines totales	70
4. Le taux des lipides totaux	71
5. Le taux des Glucides Totaux	72
6. Le métabolisme respiratoire (consommation d'O ₂)	73
7. L'activité Catalase	74
8. L'évolution de l'activité des Peroxidases	75
8.1. L'activité de l'ascorbate peroxidase APX)	-
8. 2. L'activité Gaïacol Peroxydase (GPX)	76
9. L'activité de la Superoxide Dismutase	77
10. L'activité de la NADPH Cytochrome P450 Réductase	79
11. L'activité du GST	80
12. Le taux du GSH	81
13. Le taux des TBARS	82
14. L'état Redox cellulaire	83
14.1. Effet sur les radicaux libres (ROMs)	-
14.2. Effet sur le potentiel antioxydant biologique (BAPs)	84

Chapitre IV. DISCUSSION 85

- **Hypothèse** 100

Chapitre V. CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES 103

Chapitre VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 107

Liste des Figures

N° Figure	Titre	Page
[1]	La diaphonie entre la signalisation calcique et la signalisation des ROS	20
[2]	Régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique	25
[3]	Structure du canal calcique	28
[4]	Représentation schématique de la structure des canaux calciques voltage-dépendant de type L	30
[5]	Vue microscopique de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
[6]	Représentation schématique d'une cellule de levure	45
[7]	Représentation schématique du cycle cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
[8]	Métabolisme respiratoire et fermentaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
[9]	Structure chimique de la Nifedipine	55
[10]	Dosage des lipides totaux selon la méthode de Goldsworthy <i>et al.</i> , (1972)	57
[11]	Principales étapes d'extraction et du dosage des glucides totaux.	58
[12]	La réaction entre le TBA et le MDA	64
[13]	La cinétique de croissance de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en présence des concentrations croissantes de Nifédipine et en fonction du temps	68

[14]	Evolution du pourcentage de réponse de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en présence des concentrations croissantes de Nifédipine, après 3h de traitement.	69
[15]	Evolution du taux de protéines totales en fonction du temps et des concentrations Croissantes de Nifédipine.	70
[16]	Evolution du taux des lipides totaux en présence des concentrations croissantes de Nifédipine et en fonction du temps chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	71
[17]	Effet des concentrations croissantes de nifedipine sur le taux des glucides totaux en fonction du temps chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
[18]	Evolution de l'activité respiratoire en présence des différentes concentrations de Nifédipine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
[19]	Evolution de l'activité catalase en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en fonction du temps.	74
[20]	Evolution de l'activité Ascorbate-Peroxydase en présence des concentrations croissantes de Nifédipine et en fonction du temps chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
[21]	Evolution de l'activité Gaïacol-Peroxydases en fonction des concentrations croissantes de Nifédipine et du temps chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
[22]	L'influence des concentrations croissantes de la Nifedipine sur l'activité des différentes SODs (Mn SOD, Cu/Zn SOD et SODt) en fonction du temps chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78

[23]	Evolution de l'activité de la NADPH Cytochrome P450 réductase en fonction du temps et en présence des différentes concentrations de Nifédipine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
[24]	Evolution de l'activité Glutathion S transférase en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80
[25]	Evolution du taux de GSH en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
[26]	Evolution du taux des TBARS en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
[27]	Effet de la Nifedipine sur la production des ROMs	83
[28]	Effet de la Nifedipine sur le BAPs	84
[29]	Schéma illustrant l'action de la Nifedipine sur le déclenchement d'un stress oxydatif passif chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (réalisé par Cherait et Djebbar).	102

Liste des Tableaux

N° Tableau	Titre	Page
01	Classification moléculaire, pharmacologique et localisation tissulaire des canaux calciques dépendants du voltage	33
02	Les différents antagonistes calciques et leurs représentants	35

Liste des abréviations

AMPK	Protéine kinase activé par le système AMP (Adénosine MonoPhosphate)
APX	Ascorbate -peroxydases
ATP	Adénosine triphosphate
BAPs	Potentiel antioxydant Biologique
BSA	Serum Albumin Bovin
CAT	Catalase
CCVD	Canaux calciques voltage dépendant
CDK	Protéine kinase cycline-dépendante
CDNB	1-Choro 2,4-Dinitrobenzène
Cu/Zn SOD	Superoxyde dismutase cytosolique
DO	Densité optique
DHP	Dihydropyridine
DTNB	Acides 5,5'Dithiodis-2-Nitrobenzoïque
EDTA	Ethylène diamine tetra-acétique
GPX	Gaiacol peroxydase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfure
GST	Glutathion-S- transferase
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogene
MDA	Malondialdehyde
Mn SOD	Superoxyde dismutase mitochondrial
NCPR	NADPH Cytochrome P450 Reductase
NO	oxyde nitrique
O₂⁻	Anion superoxyde
ROS	Especies Reactive de l'oxygène
ROMs	Metabolites Réactive de l'oxygène
SODt	Superoxyde dismutase total
TBA	Acide Thiobarbiturique
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TCA	Acide Trichloroacétique
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane, (2-Amino-2-Hydroxyméthyl-1,3-propanediol)
[Ca²⁺]_i	Concentration calcique intracellulaire

Chapitre I

INTRODUCTION GENERALE

Préambule

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), des sous-produits naturels formées lors des activités métaboliques normales, jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire, quand ils sont sous contrôle (**Serviddio et al., 2013 / Winterbourn, 2015**). Cependant à des concentrations élevées, ces ROS sont préjudiciables pour la survie cellulaire (**Valko et al., 2007**). La cellule est dotée d'un certain nombre de mécanismes de défense qui peuvent neutraliser les radicaux libres et prévenir les dommages intracellulaires, en réduisant les effets nocifs des ROS. Mais quand les cellules sont dépassées et le système de détoxification submergé par la surproduction des oxydants, ne pouvant plus se débarrasser de ces ROS, un stress oxydant s'installe (**Kirschvink et al., 2008 / Massart 2011**).

Ce stress oxydatif est définie comme un déséquilibre entre, d'un coté les processus biochimiques de production des dérivés réactifs de l'oxygène, et de l'autre, la capacité des défenses antioxydantes à neutraliser et éliminer ces composés toxiques avant qu'ils occasionnent des lésions (**Browne et al., 2008 / Sayre et al., 2008/ Lushchak, 2014**).

Ce déséquilibre de la balance antioxydants/ oxydants rend la cellule vulnérable aux attaques des ROS et conduit à des altérations des macromolécules biologiques indispensable au fonctionnement cellulaire, ainsi les membranes sont oxydées, les protéines dénaturées, l'ADN endommagée, causant des dommages cellulaires et défaillances fonctionnelles diverses (**Valko et al., 2005 / Stadtman, 2006 / Ferreira et Reid 2008 / Santivarangkna et al., 2008**).

A ce titre, le stress oxydatif, est de plus en plus reconnu comme un facteur causal dans le développement d'un large éventail de maladies, y compris les maladies malignes (cancer), les maladies neurodégénératives où il joue un rôle dans la maladie de Parkinson et dans l'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires à l'instar de l'athérosclérose, les accidents cérébro-vasculaires, le diabète, les maladies hépatiques, en plus de l'insuffisance rénale, l'arthrite rhumatoïde, la cataracte, etc. (**Droge, 2002**).

Le stress oxydatif va perturber les voies normales physiologiques et provoquer la mort cellulaire. Ces perturbations sont médiées largement par le signal calcique (**Amar, 2010**). En effet plusieurs études en mis en avant l'étroite relation entre la signalisation calcique et celle des ROS où le calcium et les oxydants interagissent de façon synergique (figure 1). Dans des conditions normales, ces interactions réciproques entre la signalisation calcique et la signalisation des ROS permettent une régulation homéostatique très fine de chaque système, en plus de la régulation des divers fonctions physiologiques (**Mazars et al., 2010**).

Le peroxyde d'hydrogène, par exemple, augmente le courant entrant de calcium dans les cellules granulaires dentés en accélérant le processus d'ouverture des CCVD. Cette augmentation est inhibée par le Glutathion et par la Nifedipine, un inhibiteur des canaux calcique voltage dépendant de type L, laissant suggérer que le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène module l'entrée des ions Ca^{2+} par la régulation de l'activité des CCVD de type L (**Akaishi et al., 2004 a**). Il en est de même pour les travaux de **Feng et al., (2013)** qui ont aussi conclu que le H_2O_2 module l'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ par le biais des CCVD.

D'autres études ont également montré le pouvoir modulateur des ROS sur l'ouverture des CCVD. Ainsi une exposition prolongé des neurones à un produit de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxy-2,3-nonenal, est à l'origine de la mort cellulaire. Cette toxicité peut être atténuée par le glutathion et les antagonistes calciques (Nimodipine et Nifedipine) (**Akaishi et al., 2004 b / Lu et al., 2002**).

Nous avons pu constater l'étroite relation entre le calcium et les ROS, puisque le stress oxydatif fait intervenir les flux cellulaires de calcium, qui à leur tour, sont à l'origine de la formation de ROS. Partant de cela, il est possible de prévenir et diminuer le stress oxydant grâce à l'utilisation des antagonistes calciques, agents thérapeutiques destinés généralement au traitement de diverses maladies cardio-vasculaires, hypertension compris. Effectivement, plusieurs recherches se sont focalisées sur cet axe, mettant en lumière le potentiel pouvoir antioxydant de ces molécules (**Cominacini et al., 2003/ Berkels et al., 2005/ Schild et al., 2006/ Matsubara et al., 2008**).

La Nifedipine, un inhibiteur calcique de la famille des Dihydropyridines, a déjà été proposée en tant qu'option thérapeutique à titre préventif et protecteur contre le stress oxydant, on peut citer à titre d'exemple, son utilisation pour diminuer la toxicité tubulaire rénale causée par la gentamicine (**Jin Li et al., 2009**), contre les lésions de l'endothélium via l'inhibition des ions superoxydes (**Allanore et al., 2004**), ou encore contre le potentiel cataractogénique du sélénite de sodium (**Farghaly et al., 2014**). Ce rôle protecteur de la Nifedipine est dû à ces capacités antioxydantes et inhibitrices des ROS (**Sung et Choi, 2012**).

Ironiquement, ce même inhibiteur des canaux calciques lents peut être à l'origine du déclenchement et/ou de l'accentuation d'un stress (**Vitcheva et al., 2009/ Morakinyo et al., 2009/ 2010**).

Objectif du travail :

Les effets du stress oxydant sont bien connus et conduisent à des dommages cellulaires et des défaillances fonctionnelles diverses et parfois irréversibles. En effet, Il est admis maintenant que cet état de stress est à l'origine d'une multitude de pathologies chroniques.

Face à ce constat, la recherche scientifique, s'est focalisée sur les études des différentes molécules pouvant potentiellement prévenir les effets néfastes du stress oxydant. Ainsi la Nifedipine, un antagoniste calcique de la famille des Dihydropyridines, ayant des propriétés antioxydantes a été proposée comme une solution thérapeutique à ces maladies stress-résultantes (**Allanore et al., 2005 / Wang et al., 2011/ Saida et al., 2013**). Cependant, cette molécule pourrait avoir un effet controversé et paradoxal puisqu'elle est également à l'origine du déclenchement d'un stress oxydatif entraînant des actions délétères (**Morakinyo et al., 2010**). Quand les travaux de **Cominacini et al., (2003) et Daschil et Humpel, (2014)** ne lui ont trouvés aucune influence notable sur ce stress.

De ce paradoxe de l'effet de la Nifedipine sur le stress oxydant émerge la problématique de notre travail où nous avons cherché à éclaircir le rôle de cette DHP sur la génération/élimination des ROS.

Dès lors, il nous a semblé judicieux de mesurer les différents biomarqueurs du stress oxydatif englobant les divers cibles cellulaires et systèmes de défense. Et pour cela, nous avons opté pour l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle biologique alternatif, mettant au passage en lumière la robustesse de ce matériel expérimental comme outils d'évaluation des toxicités des xénobiotiques.

Le choix de cette espèce, est due, à son organisation cellulaire très similaire à celle des cellules eucaryotes supérieures, mais surtout, à la présence de la protéine Cch1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui est un homologue de la sous-unité α_1 /Cav des canaux calciques voltage-dépendants des mammifères (**Teng et al., 2008**), pharmacologiquement similaires aux canaux calciques de type L, les rendant de ce fait sensibles à l'action des Dihydropyridines (**Walker, 1998 / De Souza Pereira et al., 2001/ 2003**).

La démarche choisie consiste, en premier lieu, à mettre en évidence l'implication des enzymes de la métabolisation du xénobiotique particulièrement celles de la phase I et II, puis de confirmer l'induction des ROS et leur rôle dans la manifestation d'une toxicité potentielle et ce à travers le suivi de l'état Redox cellulaire et de certaines activités enzymatiques ciblées et considérées comme biomarqueurs des ROS.

La première partie de ce travail, comprenant un seul chapitre, fera l'objet d'une introduction bibliographique sur l'état des connaissances actuelles, d'un côté, dans le domaine des échanges ioniques particulièrement ceux concernant les canaux calciques voltages dépendants et leurs antagonistes, et d'un autre côté, sur les levures, en argumentant au passage le choix de ce modèle biologique alternatif pour les études en toxicologie expérimentale.

La seconde partie de ce travail articulée autour de trois chapitres, est consacrée aux différents essais expérimentaux que nous avons effectués, avec une description de toutes les techniques utilisées, en plus d'une exposition et une discussion des résultats obtenus et pour finir une conclusion générale et un ensemble de perspectives viendront clôturer cette thèse.

I. Les canaux calciques et leurs antagonistes

1. Le Calcium

Les ions calcium sont des facteurs de signalisation biologique primordiaux, polyvalents et universels qui régulent de nombreux processus cellulaires (**Hill-Eubanks et al., 2011 ; Verkhatsky et Parpura, 2014**), telles que la fécondation (**Berridge et al, 2000**), la division, la prolifération et la régulation du volume cellulaire (**Munaron et al., 2004_{a et b} / Roderick et Cook., 2008 / Fermini et al., 2008 / Borowiec et al, 2014**), la modulation de l'activité et l'activation de diverses enzymes et protéines kinases (**Landry et Gies, 2009**), l'activation et la prolifération des lymphocytes (**Lewis et Cahalan, 1995/ Feske et al., 2001/ Racioppi et Means, 2008**), la régulation de l'expression de gènes (**Bito, 1998 / Carrasco et al., 2004/ Batut et al., 2005**) et la transcription (**Coulon et Blanchard, 2001/ Alonso et Garcia-Sancho, 2011**). Outre ses rôles clés dans les fonctions nerveuses et dans la mémoire (**Perisse, 2009 / Seoane et al., 2009/ Wang et Mattson, 2014**), ainsi que dans l'exocytose (**Giancippoli et al, 2006 ; Gustavsson et al, 2012**).

Ils jouent aussi un rôle important en tant que médiateur dans la contraction, la conduction et l'excitabilité au niveau des muscles (**Le Chevoir, 2008 / Kovac et al., 2008 / Dissaux, 2010 / Menezes-Rodrigues et al., 2013**), notamment celles des muscles vasculaires et cardiaques, contribuant au maintien normale de la tension artérielle et protégeant, de cette manière, le système cardiovasculaire (**Cappuccio et al., 2000**). Le Ca^{2+} est également un messager ubiquitaire impliqué dans la régulation des fonctions mitochondriales et dans la mort cellulaire (**Brookes et al., 2004 / Shou et al., 2004 ; Bernadi et Rasola, 2007 / Cavalli et al., 2013**), et de bien d'autres processus biologiques.

Pour que toutes ces fonctions dépendante du calcium soient exécutées correctement, une régulation précise est nécessaire et tout échec ou perturbation peut entraîner de nombreux troubles multi-systèmes complexes et faire pencher la balance d'un signal pour la vie à un signal de mort (**Berridge, 1998 / Lorenzon et al., 2000 / Chakroborty et Stutzmann, 2014**).

Le calcium malgré le rôle qu'il joue dans une multitude de fonctions physiologiques, reste spécifique envers chacune d'entre elles. Cela est due au fait que la signalisation calcique est très finement modulée dans le temps, l'espace et en amplitude conférant ainsi une réponse spécifique à chaque entrée calcique (**figure 2**) (**Berridge et al., 1998 / El Boustany, 2009**).

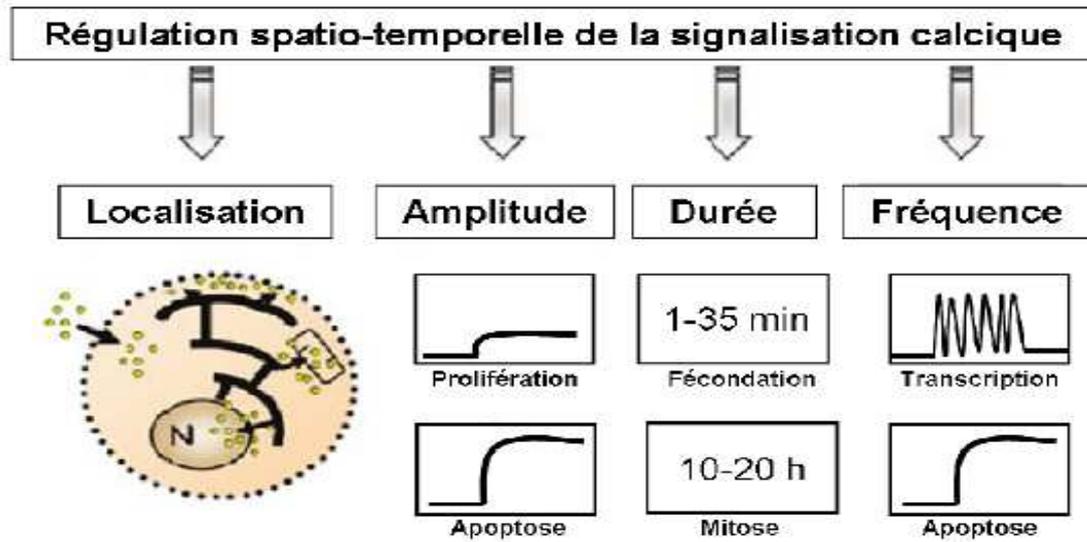


Figure 2. Régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique (Prevarska *et al.*, 2007)

La signalisation calcique est aussi très étroitement liée aux variations de la concentration intracellulaire en calcium et plus précisément au gradient électrochimique résultant du fait que la majeure partie du Ca^{2+} se concentre dans le milieu extracellulaire [la concentration en calcium à l'intérieur d'une cellule à l'état de repos est de l'ordre de 10 à 100 nM, alors que la concentration extracellulaire se situe entre 1 et 2 mM] (Clapham, 1995 / Pion et Brown, 1995/ Simons, 1988/ Landry et Gies, 2009), par conséquent, le bon fonctionnement des différents systèmes impliqués dans l'homéostasie calcique est cruciale, permettant de maintenir cet équilibre entre influx, efflux et stockage des ions Ca^{2+} (Berridge *et al.*, 2003).

Parmi ces systèmes de régulation du calcium, les canaux calciques sont primordiaux dans de nombreux processus physiologiques et font partie des cibles préférentielles de nombreux agents thérapeutiques développés pour le traitement de différentes maladies, tels que les antagonistes du calcium.

2. Les canaux calciques membranaires

Les échanges de calcium au travers de la membrane plasmique sont effectués grâce à différents mécanismes tels que la pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui régule les mouvements calciques en fonction du gradient de concentration sodique, la pompe calcique ATP-dépendante qui permet l'extrusion du calcium intracellulaire et les canaux calciques qui permettent une modulation de l'entrée du calcium dans la cellule sous l'impulsion de différents stimuli physiologiques.

Les canaux calciques sont donc un des mécanismes par lequel la cellule répond à une information donnée, où sous certaines conditions physiologiques, ils ordonnent l'entrée des ions au travers de la membrane et contribuent au processus de signalisation cellulaire et à l'homéostasie calcique. Ces protéines membranaires forment des pores qui assurent le passage rapide et sélectif d'ions Ca^{2+} en fonction du gradient électrochimique créant, au passage, un courant calcique. Ce flux d'ions participe à la dépolarisation membranaire de la cellule. L'activation d'un canal ionique résulte en un changement de conformation de la protéine qui conditionne les transitions entre l'état fermé et l'état ouvert du canal (**Derouiche, 2012**).

Les canaux calciques sont classés en deux grands groupes : les canaux activés par un ligand (extracellulaire ou intracellulaire) et les canaux activés par le voltage (voltage-dépendants) (**Purves et al., 1999 / Jentsch et al., 2004**).

2.1. Les canaux calcium activés par un ligand :

Les canaux calcium activés par un ligand, comme leur nom l'indique, sont des canaux activés après interaction avec différentes molécules (ligand) spécifiques intracellulaires ou extracellulaires (GABA, acétylcholine, glycine, nicotine ...), stimulant de cette façon l'entrée du calcium dans la cellule, sans modification du potentiel membranaire (**Struyker et al., 1990 / Pivetti et al., 2003**).

Ainsi, la liaison de certaines hormones et neurotransmetteurs comme la noradrénaline ou l'angiotensine II à leurs récepteurs spécifiques, entraîne une modification de conformation du canal et donc l'entrée du calcium dans la cellule (**Thuillez, 1998**).

Ces canaux calciques jouent un rôle important dans la contraction musculaire, dans le contrôle de la transmission synaptique, la plasticité et l'interaction des cellules gliales neurones (**Pankratov et Lalo, 2013**).

2.2. Les canaux de calcium voltage-dépendants :

Les canaux calciques voltage-dépendants CCVD, sensibles aux variations du potentiel membranaire, représentent une des voies majeures d'entrée du calcium dans la cellule.

Cette famille traduit les dépolarisations membranaires en un influx calcique, induisant par la suite la régulation de fonctions physiologiques très variées au sein de la cellule. Leur activité est essentielle pour coupler les signaux électriques de la surface cellulaire aux événements physiologiques, notamment la transmission synaptique et le couplage excitation-contraction (**Tadmouri, 2007**).

Ce sont des complexes multipéptidiques constitués d'une sous-unité principale α_1/Ca_v qui forme le pore ionique sélectif du calcium et sensible au voltage (**Dulhunty, 2006 / Harisseh, 2012**), dont la structure est composée de 4 domaines hydrophobes transmembranaires (DI à IV) comportant chacun 6 hélices (segments S1-S6) (**Rousset et al., 2005 / Rossi et Dirksen 2006/ Lacolley, 2007**). La sous-unité α_1 représente la cible principale des agents pharmacologiques et des toxines (**Catterall, 2005**).

Plusieurs sous-unités annexes sont associées à α_1 , la sous-unité β cytosolique, la sous-unité γ transmembranaire, et la sous-unité δ transmembranaire associée par un pont disulfure à une sous-unité α_2 extracellulaire (figure 3) (**Schwartz, 1992**). Elles sont impliquées dans l'assemblage, le ciblage et l'ancrage des canaux à la membrane et sont responsables de la modulation des paramètres biophysiques des CCVD (**Opatowski et al., 2004 / Richards et al., 2004 / Fablet, 2011**).

Chacune de ces sous-unités provient de diverses familles multigéniques. Les gènes sont épissés de manières différentes, donnant une grande hétérogénéité de protéines (une multitude d'isoformes). Cette hétérogénéité apporterait une spécialisation fonctionnelle et/ou tissulaire (**Dunlap et al., 1995 / Cens et al., 2005 / Doering et Zamponi, 2006**). Ainsi 10 gènes codent pour la sous-unité α_1/Ca_v et 16 gènes pour les autres sous-unités régulatrices (**Ertel et al., 2000 / Lacolley, 2007**).

La régulation de l'ouverture des canaux calciques est principalement dépendante du potentiel membranaire et de la nature des sous-unités associées à la sous-unité α_1 (**Catterall, 2000 / Landry et Gies, 2009**).

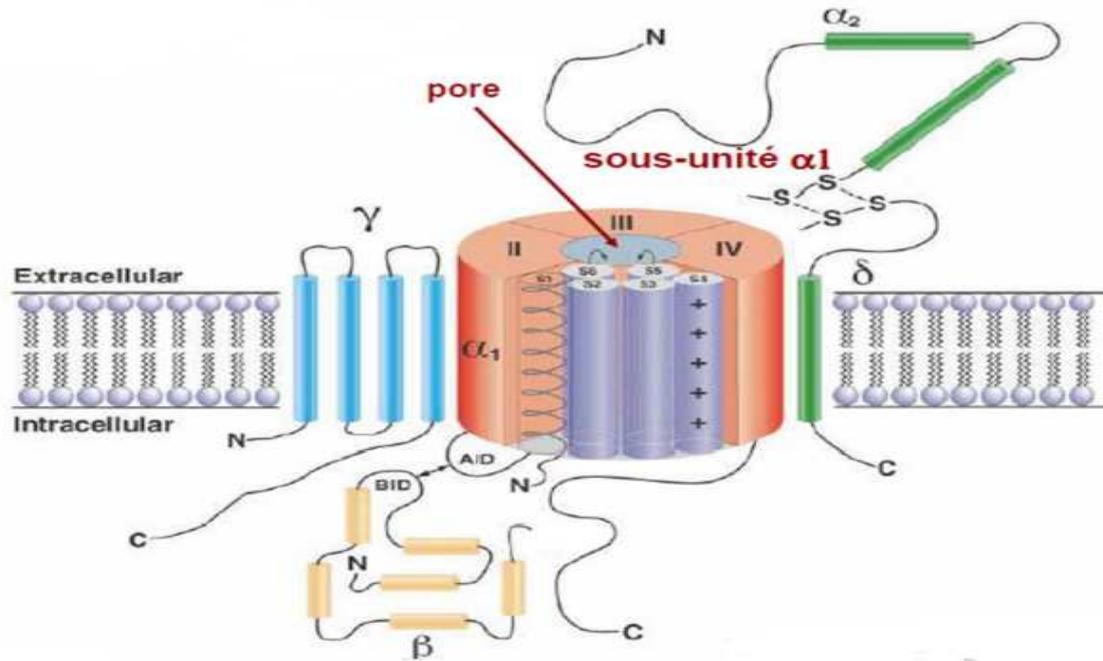


Figure 3. Structure du canal calcique (Randall et Benham, 1999 / Yue, 2004).

Les canaux calciques CCVD sont classés selon leurs propriétés biophysiques, biochimiques, électrophysiologiques, pharmacologiques, génétiques et selon leurs conductances (voire tableau 01) (Spedding et Paoletti, 1992 / Weiss et De Waard, 2006 / Lory *et al.*, 2006).

Sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques, 5 types de canaux calciques subdivisés en 2 classes selon leur seuil d'activation ont été identifiés et caractérisés :

- Les canaux calciques à haut seuil d'activation (High Voltage-Activated), s'activant pour des potentiels fortement dépolarisants ($> -30\text{mV}$) avec une lente inactivation, regroupe la famille Ca_v1 qui contient les canaux de type L et la famille Ca_v2 qui englobe les canaux de type N, P/Q et R.
- Les canaux calciques à bas seuil d'activation (Low Voltage-Activated), qui s'activent pour des potentiels faiblement dépolarisant proche de celui du repos : $> -70\text{mV}$ et s'inactivent rapidement. Cette famille Ca_v3 ne compte qu'un seul type de canal, le type T. (Llinas & Yarom, 1981 / Perez-Reyez *et al.*, 1995/ Ertel *et al.*, 2000).

La nomenclature des canaux calciques rend compte de la diversité des sous-unités, avec des localisations tissulaires privilégiées et des inhibiteurs sélectifs d'une classe par rapport à l'autre.

Les canaux calcium voltage-dépendants ne sont pas seulement intermédiaires de l'entrée des ions Ca^{2+} dans les cellules, ils jouent aussi un rôle prépondérant dans de nombreux processus dépendants du calcium comme la contraction musculaire, la libération d'hormone ou de neurotransmetteur, la plasticité synaptique, l'expression génique, l'exocytose, la division cellulaire, etc. (**Randall et al., 1999**).

2.2.1. Les canaux de la famille Ca_v1 (les canaux de type L)

Cette nomination est en allusion à leur cinétique d'ouverture et de fermeture (activation et inactivation) lente « *long lasting / Low inactivation* ». Ils sont aussi appelés récepteurs aux Dihydropyridines (DHP_r pour Dihydropyridine receptor). Ce sont les canaux calciques les mieux caractérisés et les plus étudiés aussi bien sur le plan structural, fonctionnel, que pharmacologique. Ils sont activés par une forte dépolarisation (seuil d'activation aux alentours de -20mV), ont une forte conductance (**Dunlap et al., 1995 / Guia et al., 2001 / Landry et Gies, 2009**) et sont peu affectés par un potentiel maintenu (**McDonald et al., 1994 / Georgeon-Chartier, 2012**).

On les retrouve dans pratiquement toutes les cellules excitables, mais plus particulièrement dans le tissu musculaire (aussi bien lisse que strié, squelettique et myocardique) (**Benitah et al., 2010 / Fearnley et al., 2011**) et au niveau du système nerveux central et périphérique (**Mc Rory et al., 2004 / Wang et Poo, 2005 / Calin-Jageman et Lee, 2008 / Tuckwell, 2012**). On les retrouve également sur des cellules non excitables comme les fibroblastes, les ostéoblastes et les cellules endocrines telles que les β -pancréatiques où ils jouent un rôle important dans l'exocytose de l'insuline (**Taylor et al., 2005 / Adisakwattana et al., 2011 / Kappel et al., 2013**). Ils assurent, subséquentement, certains aspects des fonctions des systèmes nerveux centrale et cardiaque, la contractilité du muscle lisse, la régulation neuroendocrine et plusieurs autres processus (**Striessnig et Koschak, 2008 / Rosenberg et Spitzer, 2011 / Hofmann et al., 2014**).

Ils sont les cibles privilégiés de nombreux médicaments largement utilisés pour le traitement de différentes maladies cardiovasculaires mais aussi pour leurs implications dans d'autres troubles incluant les pathologies neuronales à l'instar du vertige et l'Alzheimer (**Chakroborty et Stutzmann, 2014 / Gómez-Sánchez et al., 2014 / Wang et Mattson, 2014**). Ils sont très sensibles à l'action des antagonistes calciques tels que les Dihydropyridines (Nifedipine) -ce qui a aidé à identifier et purifier ces canaux-, les Benzothiazepines (Diltiazem) et les Phénylalkylamines (Verapamil) (**Huber et al., 2000 / Stanford, 2014**). Ces inhibiteurs vont s'attacher à trois sites couplés allostériquement de la sous-unité α_1 . Leur ouverture peut aussi être modifiée par des neuromédiateurs tels que la noradrénaline et la dopamine (**Struyker-Boudier et al., 1992**).

Les études en biologie moléculaire ont permis de caractériser les déterminants structuraux gouvernant les propriétés pharmacologiques et biophysiques. Ainsi le quatrième segment S4 de chaque domaine très riche en acides aminés chargés positivement représente le capteur de voltage responsable de l'activation du canal. Alors que la boucle extracellulaire entre S5 et S6 détermine la sélectivité ionique du canal (figure 4) (Jeziorskia et Greenberg, 2006 / Caterall et Fue, 2008). De plus, la boucle S5-S6 et le segment S6 du troisième domaine répété ont été identifiés comme étant des sites de fixation des tétrodoxines et des Dihydropyridines (Catterall et Striessnig, 1992). Les autres sous-unités participent à la régulation de la fonctionnalité du canal (Flucher *et al.*, 2005 / Jamet, 2012).

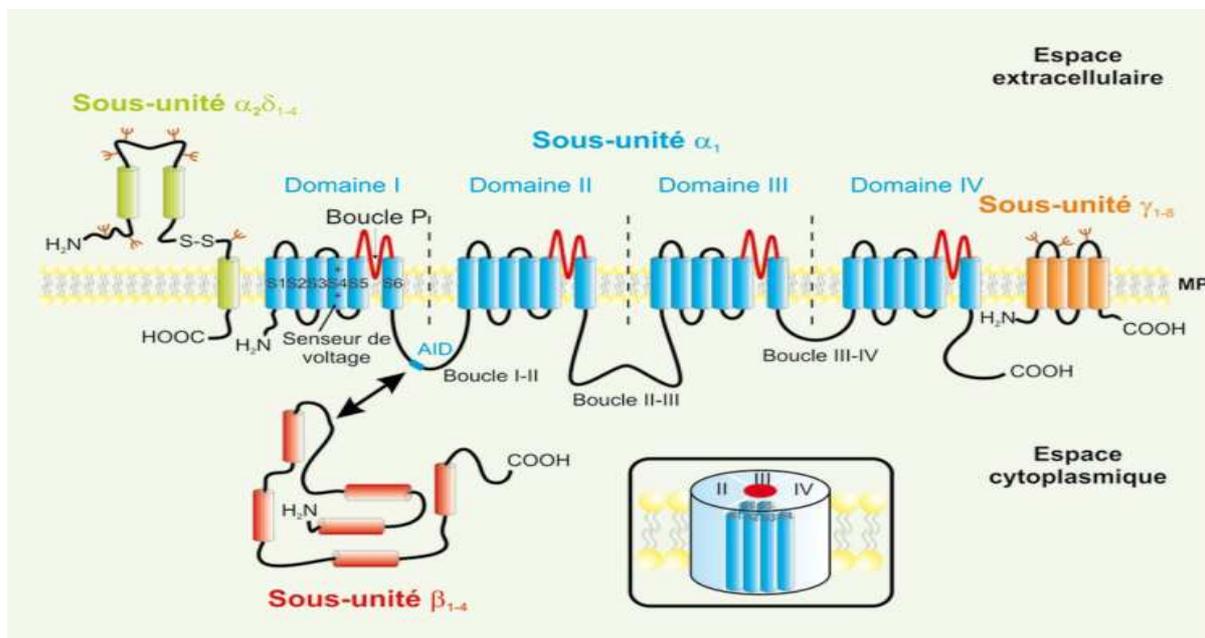


Figure 4. Représentation schématique de la structure des canaux calciques voltage-dépendant de type L (Tanade *et al.*, 1987).

Il existe 4 isoformes, codées par des gènes différents (les isoformes 1S, C, D et F codées respectivement par les gènes CACNA1S, C, D et F) (Rousset *et al.*, 2005), avec des localisations tissulaires préférentielles (Gribkoff et Kaczmarek, 2009). Les canaux d'une même famille montrent une homologie de séquence de l'ordre de 80% à 90% (Lacinova, 2005).

Ca_v1.1 (α1S) : Présent dans les muscles squelettiques (S), détecteurs de potentiel mis en jeu lors de l'activation nicotinique et participant à l'activation du récepteur de la ryanodine, un canal du réticulum (dont le Ca²⁺ est le principal modulateur (**Zucchi et Ronca-Testoni, 1997**). Il est nécessaire pour la contraction, l'homéostasie calcique ainsi que pour la régulation de l'expression génique.

Ca_v1.2 (α1C) : Exprimé dans le muscle cardiaque (C), les muscles lisses vasculaires, les cellules endocrines, les neurones et la plupart des tissus, Il est la cible majeure des inhibiteurs calciques utilisés en thérapeutique. Il a comme fonction la contraction, la sécrétion hormonale et la régulation de l'expression génique.

Ca_v1.3 (α1D) : Présent au niveau des neurones et des cellules endocrines il permet la sécrétion hormonale et la régulation des gènes.

Ca_v1.4 (α1F) : S'exprimant spécifiquement sur la rétine ainsi que l'oreille, il génère un courant aux propriétés atypiques assurant le relargage de neurotransmetteurs (**Catterall, 2000 / Djata Cabral, 2008 / Landry et Gie, 2009**).

2.2.2. Les canaux de la famille Ca_v2

- **Les canaux de type P/Q (Ca_v2.1)**

Les courants de type P/Q sont issus du même gène codant pour le canal Ca_v2.1, mais la régulation par épissage alternatif de ce gène est à l'origine de différents isoformes générant ces deux courants, P pour Purkinje, les cellules où ils ont été identifiés, et Q par ordre alphabétique (après P) (**Bourinet et al., 2001/ Gribkoff et Kaczmarek, 2009**). Ils sont sensibles à des toxines mupeptidiques issues du venin d'araignées et d'escargot (**Adams et al., 1993 / Yan et al., 2002**).

On retrouve les courants de type P/Q dans tout le système nerveux, ce sont d'ailleurs la population de canaux calciques la plus représentée dans le cerveau. Ils participent à l'induction de la libération de neurotransmetteurs (**Catterall, 2011**).

- **Les canaux de type N (Ca_v2.2)**

Les canaux de type N ne sont ni de type T, ni de type L (*Neither Transient, Nor Long Lasting*). Ils sont spécifiquement bloqués par une toxine peptidique isolée à partir d'un mollusque marin *Conus geographicus* : l' ω -conotoxine GVIA et par le cadmium (McDonough, 2004).

Dans les cellules neuronales, les courants calciques de type N sont impliqués dans la libération des neurotransmetteurs et dans la sécrétion d'hormones dans les cellules endocrines (Takahashi et Momiyama, 1993 / Artalejo *et al.*, 1994).

- **Les canaux calciques de type R ou Ca_v2.3 (α 1E)**

Les canaux de types R pour « *Resistant* ou *Residual* », sont mis en évidence dans les cellules granulaires du cervelet correspondent aux courants calciques résiduels enregistrés après blocage des courants de type T, N, L et P/Q par leurs antagonistes respectifs. Ils sont bloqués par les ions Ni²⁺, Cd²⁺ et par la ω -Agatoxine IIIA une toxine extraite de l'araignée *Agelenopsis aperta*. De même que la toxine SNX-482 issu du venin d'une tarentule *Hysteroocrates gigas* (Wang *et al.*, 1999 / Tottene *et al.*, 2000 / Bourinet *et al.*, 2001).

2.2.1. Les canaux de la famille Ca_v3 (les canaux de type T)

Les CCVD de type T possèdent des courants entrant transitoires « *Transient* ou *Tiny* », une cinétique d'inactivation rapide et une faible conductance du canal unitaire (Dunlap *et al.*, 1995 / Nargeot, 2000). Il existe trois sous-types du canal T, à savoir, Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 (Monteil *et al.*, 2000 / Perez-Reyes, 2003 / Bourinet *et al.*, 2005).

Ils sont bloqués par un ensemble de molécules exposé dans le **tableau (01)** qui résume l'ensemble des données sur les CCVD rapportées précédemment.

On les retrouve dans différents types cellulaires, incluant les neurones (Nikonenko *et al.*, 2005 / Liao *et al.*, 2011), les cellules musculaires (Ono et Iijima, 2010) et les cellules sécrétrices (β pancréatiques, corticosurrénales) (Ashcroft *et al.*, 1990 / Sala et Matteson, 1990).

Certains travaux ont mis en évidence l'implication des canaux T dans les mécanismes de nociception (Todorovic *et al.*, 2004 / Dogrul *et al.*, 2003 / Bourinet *et al.*, 2005 / François, 2013) ainsi que dans le stade précoce du traitement de l'information au niveau des neurones thalamocorticaux (Deleuze *et al.*, 2012).

Tableau 01. Classification moléculaire, pharmacologique et localisation tissulaire des canaux calciques dépendants du voltage (**Weiss et De Waard, 2006/ Striessnig et al., 2014**).

	Sous-Unité Cav	Courant	Pharmacologie	Localisation
Haut Seuil D'activation (HSA)	($\alpha 1$)			
	Cav1.1 ($\alpha 1S$)	Type L	Dihydropiridines (par exemple, Nifedipine) Phénylalkylamines Benzothiazépines	Muscle squelettique
	Cav1.2 ($\alpha 1C$)			Neurones, cœur, muscles lisses vasculaire/cardiaque, cellules endocrines
	Cav1.3 ($\alpha 1D$)			Neurones, cœur, cellules endocrines, cellules sensorielles
	Cav1.4 ($\alpha 1F$)			Rétine, oreille, cellules immunitaires
	Cav2.1 ($\alpha 1A$)	Type P/Q	ω -Agatoxine IVA ω -Agatoxine IIIA ω -Conotoxine MVIIC	Neurones, cellules endocrines (cellules pancréatiques β)
	Cav2.2 ($\alpha 1B$)	Type N	ω -Agatoxine IIIA ω -Conotoxine GVIA ω -Conotoxine MVIIA	Neurones, cellules endocrines
	Cav2.3 ($\alpha 1E$)	Type R	Nickel, Cadmium ω -Agatoxine IIIA SNX-482	Neurones, cellules endocrines, muscle lisse vasculaire/cardiaque,
Bas Seuil D'activation (BSA)	Cav3.1 ($\alpha 1G$)	Type T	Benzamidazoles (par exemple, mibéradil) Amiloride, Anandamide Ethosuximide Kurtoxine Nickel	Neurones, cœur, muscles lisses, cellules endocrines, spermatozoïdes
	Cav3.2 ($\alpha 1H$)			Neurones, cœur, foie, rein, muscles lisses vasculaire/cardiaque, cellules endocrines
	Cav3.3 ($\alpha 1I$)			Neurones, spermatozoïdes

1.3. Les Antagonistes calciques

Initialement définie par Fleckenstein, en 1964, les antagonistes du calcium représentent un groupe chimiquement, pharmacologiquement et thérapeutiquement hétérogène d'agents thérapeutiques qui ont pour cible principale les CCVD et plus précisément les canaux calciques de type L (**McDonough, 2004**). On utilise aussi les termes anticalciques, inhibiteurs calciques, inhibiteurs des canaux calciques lents ou calcium-bloqueurs.

Les antagonistes calciques représentent l'une des principales classes pharmacologiques largement utilisées dans le traitement des troubles cardiovasculaires (l'hypertension artérielle, l'insuffisance coronaire, l'angine de poitrine, l'agor stable et vasospastique, la tachycardie supraventriculaire, etc.). De par leur mécanisme d'action, ils influencent le couplage excitation-contraction des cellules musculaires cardiaques et vasculaires (**Fleckenstein, 1977 / Laurent *et al.*, 2002**). Des études associent le rythme artériel anormal dans le cas d'une hypertension à une augmentation d'expression des canaux calciques dépendants du voltage de type L au niveau vasculaire. (**Sonkusare *et al.*, 2006**).

On distingue trois classes d'inhibiteurs calciques (tableau 02). Les classes I et III, en l'occurrence, les Phenylalkylamines et Benzothiazépines, sont représentés respectivement par une seule substance, le Verapamil et le Diltiazem. Alors que la classe II, celle des Dihydropyridines, est très largement représentée, et comporte le plus grand nombre de médicaments commercialisés, avec comme chef de file la Nifédipine. Les nouvelles formes galéniques à libération prolongée mieux adaptées au traitement de l'hypertension artérielle sont venues enrichir l'arsenal thérapeutique des antagonistes calciques. Le Mibérafil est aussi un antagoniste calcique mais son action reste spécifique pour les canaux de type T (**Laurent *et al.*, 2001**).

Tableau 02. Les différents antagonistes calciques et leurs représentants

inhibiteurs calciques	
Classe	Représentants
Classe I :Phénylalkilamine	Le Verapamil
Classe II :Dihydropyridines	La Nifédipine, L' Amlodipine, L'Azelnidipine, La Nicardipine, La Nimodipine, La Barnidipine, La Félodipine, L'Isradipine, La Lacidipine, La Lercanidipine, La Manidipine, La Nisoldipine, La Nitrendipine
Classe III :Benzothiazépines	Le Diltiazem

1.3.1. Les Dihydropyridines

Les Dihydropyridines sont des antihypertenseurs, avec un puissant effet vasodilatateur (**Yamamoto et al., 2015**). Ces antagonistes calciques sont dotés d'une grande sélectivité vasculaire due à l'épissage alternatif de la sous unité Ca_v . Ils inhibent de façon dose-dépendante l'entrée des ions calcium via les canaux calciques de type L et plus précisément ceux des $Ca_v1.1$ et $Ca_v 1.2$. Néanmoins cette action reste réversible en présence de fortes concentrations de Ca^{2+} extracellulaires. Cette grande sélectivité des DHP permet d'éviter certaines complications cardiaques tels que la conduction auriculo-ventriculaire et fonction sinusale, elle évite aussi la réduction de la contractilité et limite le risque lors de l'association aux bêtabloquants ou lors d'altération de la fonction ventriculaire (**Talbert et al., 2009**). La Nifedipine est la moins sélective des DHP.

Les DHP inhibent aussi, à des concentrations un peu élevées, les canaux voltage-dépendant sodiques Na^+ et potassiques K^+ (**Gotoh et al., 1991 / Avdonin et al., 1997 / Teramoto et Brading, 1998**). La Nifedipine est capable cependant de diminuer le courant calcique d'environ 80 à 90% avant de modifier le courant sodique.

Comme on a pu le voir, les ions calcium sont impliqués dans la contraction des fibres myocardiques et des fibres lisses des vaisseaux et dans l'activité normale du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire. Les inhibiteurs calciques jouent ainsi un rôle protecteur à la fois, au niveau du myocarde aussi bien dans la cas d'une ischémie myocardique, en assurant une augmentation des apports en oxygène du myocarde et en diminuant sa consommation par le cœur, grâce à une diminution des résistances périphériques et de la pression artérielle, ce qui en découle une réduction

du travail du cœur. Mais également dans le cas d'une hypertension artérielle, en diminuant l'hypertrophie du ventricule gauche facteur de morbidité et mortalité cardiovasculaires. Ils ont aussi un effet protecteur rénal, en augmentant le débit plasmatique de cet organe et abaissant sa résistance vasculaire. (Talbert *et al.*, 2009).

Outre leur rôle dans le traitement des maladies cardiovasculaires, les DHP sont aussi utilisées comme agents neuroprotecteurs (Yagami *et al.*, 2004 / Anekonda et Quinn, 2011/ Tenti *et al.*, 2013).

1.3.2. La Nifedipine

Introduite en médecine clinique en 1975, la Nifedipine est devenue un outil indispensable pour le traitement des maladies cardiovasculaires tel que l'angine de poitrine, l'arythmie cardiaque, et l'hypertension (De Souza Parreira *et al.*, 2003 / Poole-wilson *et al.*, 2006 / Matsui *et al.*, 2010 / Qing-Ri Caoa *et al.*, 2010 / Tetsuro Ago *et al.*, 2010), bien que de nombreuses autres indications y aient été rajoutées tels la maladie de Raynaud (Kiowski *et al.*, 1990). Elle peut aussi être utilisée en tant qu'option thérapeutique en cas de menaces d'accouchement prématuré avec comme effet une diminution des contractions utérines grâce à son effet tocolytique (Bekkari *et al.*, 2005 / Yamasato *et al.*, 2015/ Padovani *et al.*, 2015), ou encore pour le traitement des œdèmes pulmonaires et cérébraux causés par l'altitude (Bartsch *et al.*, 1991 / Deshwal *et al.*, 2012/ Zafren, 2014), en plus de son utilisation dans le traitement des troubles neuronaux (Sinnegger-Brauns *et al.*, 2009). Elle représente, également, une solution contre les nausées grâce à son large spectre antiémétiques (Darmani *et al.*, 2014).

3.2.1. Pharmacocinétiques

La Nifédipine est absorbée rapidement et complètement le long du tractus gastro-intestinal malgré sa faible solubilité dans l'eau (<10 mg/l), sa demi-vie est courte de l'ordre de quelques heures (2 à 7 h selon sa forme) (Abrahamsson *et al.*, 1998).

Une fois absorbée la Nifédipine est métabolisée par le système enzymatique du cytochrome P450 et principalement par l'isoenzyme CYP3A4 (Silvers *et al.*, 1992 / Frackiewicz *et al.*, 2002/ Anzenbacher and Zanger, 2012), connu également sous le nom de Nifedipine oxydase et qui est responsable de la biotransformation d'environ 60% des médicaments commercialisés.

Elle est également métabolisée par les isoenzymes CYP1A2 et CYP2A6. Cette DHP est de la sorte transformée, pour une grande partie, en métabolites inactifs hautement solubles, lesquels forment de

60 à 80 % de la dose éliminée dans l'urine. Le reste de la dose est éliminé dans les fèces sous forme métabolisée, très probablement à cause de l'élimination biliaire. Le principal métabolite est le dérivé de l'acide hydroxycarboxylique, l'acide 2,6- diméthyl-4- (2- nitrophényl) -5- méthoxycarbonyl- pyridine-3 -carboxylique et l'autre est la lactone correspondante à savoir l'acide 2-hydroxyméthyl- pyridinecarboxylique. Des traces de Nifédipine inchangée peuvent être décelées dans l'urine. **(Raemsch et Sommer, 1983 / Chung et al., 1987).**

Cependant, des études sur les interactions médicamenteuses avec les antagonistes calciques ont montrés que la Nifedipine et la Nicardipine avaient une capacité inhibitrice de l'activité du cytochrome P450 et surtout du CYP 3A, CYP2C9 et CYP2D6 dans les cellules hépatocytes humaines et les microsomes de foie **(Ma et al., 2000 / Pichard et al., 1990)** et chez les animaux **(Maenpaa et al., 1989 / Murray et Butler, 1996)**. Paradoxalement d'autres travaux ont mis en lumière une capacité stimulante de ces deux antagonistes calciques sur l'activité enzymatique des familles CYP3A et du CYP 2B par différentes voies **(Drocourt et al., 2001 / Willson et Kliever, 2002 / Konno et al., 2004).**

3.2.2. Mécanisme d'action

Les Dihydropyridines sont caractérisées par leur mode d'interaction état-dépendant du canal calcique de type L. Ces agents thérapeutiques peuvent présenter une affinité préférentielle à un état donné ou/et l'accès à leur site de fixations est conditionné par cette état du canal **(Xia et al., 2004 / Mc Donough et Bean, 2006 / 2010)**. Cette Transitions entre ces états est déterminée par des changements chimiques et électriques du potentiel et par la cinétique d'ouverture et de fermeture du canal. Les médicaments interagissent préférentiellement avec l'état ouvert ou inactif du canal et affichent donc une affinité apparente pour l'état le plus disponible et prédominant sous certaines conditions physiologiques ou pathologiques. En plus la structure des médicaments ainsi que ces propriétés physicochimiques (hydrophobes ou hydrophiles, chargé ou non) peuvent conditionner la fixation de ces molécules à leur récepteur.

La Nifédipine, comme tout antagoniste du calcium appartenant à la famille des DHP, inhibe sélectivement, et à très faibles concentrations, l'entrée des ions calcium au niveau des CCVD de type L où elle se lie directement au canal à l'état inactif et stabilise cette conformation **(Kalant et al., 1998 / 2007/ Souza et al., 2003)**. L'inhibition de l'entrée des ions Ca^{2+} entraînent le blocage des processus contractiles des cellules musculaires lisses, provoquant la vasodilatation des artères coronaires et systémiques, une augmentation de l'apport d'oxygène au tissu myocardique, une

réduction de la résistance périphérique totale, ce qui se traduit par une diminution de la pression artérielle globale (**Saida et van Breemen, 1983 / Zanchetti, 1987**). Cette action s'exerce essentiellement sur le muscle lisse vasculaire et à moindre degré au niveau du muscle cardiaque. Cette sélectivité vasculaire s'explique par le fait que les canaux inactifs sont plus fréquents dans les cellules musculaires lisses vasculaires, étant donné que la dépolarisation du muscle lisse artériel est plus longue que celle du cardiaque (**Triggle et al., 2006 / Gribkoff et Kaczmarek, 2009**).

3.2.3. Nifedipine et stress oxydatif

Depuis sa mise sur le marché la Nifedipine a fait l'objet d'une multitude de recherches, certaines d'entre elles ont mis en lumière son potentiel antioxydant (**Berkels et al., 2001 / Mak et al., 2002 / Yamagishi et al., 2006 / Rojas-Rivera et al., 2009**).

Ainsi, la Nifedipine diminue les marqueurs de stress oxydatif dans le plasma et améliore les dommages de l'endothélium causés par le stress oxydant chez les patients atteints de sclérose systémique (**Allanore et al., 2004b**). Cet antagoniste calcique inhibe la production de l'anion superoxyde O_2^{\bullet} par les monocytes sains *in vitro*, une propriété associée à l'inhibition de l'activité de la protéine kinase C (PKC) (**Allanore et al., 2004a ; Allanore et al., 2005**) et à la diminution de l'activité de la NADPH oxydase responsable de la production des O_2^{\bullet} (**Iwai et al., 2011**), atténuant de la sorte le stress oxydatif. Elle diminue également les dommages oxydatifs des membranes cellulaires causés par la peroxydation lipidique (**Sobal et al., 2001 / Ray et al., 2012**) et protège contre la néphrotoxicité due à un stress oxydatif rénal induit par la cyclosporine (**Chander et Chopra, 2005**).

Les ROS jouent un rôle critique dans la pathogenèse du dysfonctionnement endothélial qui peut se développer en problèmes cardiovasculaires (**Schachinger et al., 2000**) et dans un certain nombre de maladies cardio-vasculaires, y compris l'athérosclérose, l'hypertension, mais aussi dans le diabète sucré et l'insuffisance cardiaque (**Cai et Harrison, 2000**).

La Nifedipine améliore les fonctions endothéliales (**Yamamoto et al., 2010**) et préserve l'intégrité de l'endothélium chez les patients souffrant d'hypertension, par l'amélioration du nombre et de l'activité des cellules progénitrices endothéliales, ainsi que les fonctions liées à l'angiogenèse (néovascularisation) et empêche la progression de l'athérosclérose chez les patients souffrant ou pas d'hypertension et/ou d'une maladie de l'artère coronaire (**Henry, 1990 / Pitt, 1997 / Verhaar et al., 1999 / Encore Investigators, 2003**). Toutes ces actions sont liées à la libération endothéliale de

L'oxyde nitrique (NO) (il exerce des effets bifonctionnels sur la survie des cellules où il sert à la signalisation cellulaires endothéliales et neuronales et favorise la cytoprotection, restant néanmoins cytotoxique à forte dose) et à une diminution des ROS dans et autour des parois vasculaires (**Brovkovich et al., 2001**). En effet, après exposition des cellules endothéliales à 500µM H₂O₂, une augmentation significative des ROS et une diminution de la viabilité des cultures sont observées, le traitement par la Nifedipine inhibe le stress oxydant et contribue à protéger ces cellules de l'apoptose induite par ces ROS (**Sugiura et al., 2008**).

Le mécanisme sous-jacent par lequel les antagonistes du calcium normalisent le dysfonctionnement endothélial est mal connu, parce que ces cellules n'ont pas de récepteurs pour les antagonistes du calcium, malgré leur possible propriété antioxydante (**Fukuo et al., 2003**).

L'augmentation de l'anion superoxyde peut jouer un rôle critique dans le dysfonctionnement endothéliale et cardiovasculaire, comme c'est le cas dans l'hypertension qui est associée à l'inhibition de la signalisation NO par cet anion, formant un métabolite hautement toxique, le peroxy-nitrite (**Tschudi et al., 1996/ Vergnani et al., 2000**). La Nifedipine améliore la fonction de l'oxyde nitrique en augmentant sa libération endothéliale suite à une augmentation de l'activité enzymatique de l'oxyde nitrique synthase (**Zou et al., 2002 / Forstermann et Munzel, 2006**). Elle régule aussi indirectement l'expression et l'activité de la superoxide dismutase (SOD) dans les cellules endothéliales via la stimulation de la libération du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (**Fukuo et al., 2002 / Miura et al., 2005**). C'est par le biais de l'activation du récepteur B2 de la bradykinine que cette DHP stimule la libération du VEGF des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) adjacentes, régulant ainsi l'expression et l'activité des SODs des cellules endothéliales et améliorant, par conséquent, la production de NO (**Fukai et al., 2000 / Fukuo et al., 2003 / Passacuale et al., 2008**).

La Nifedipine protège également contre la progression de l'athérosclérose, en inhibant les lipoprotéines de basse densité oxydées (ox-LDL) responsable de l'accumulation de corps gras (l'athérome) au niveau de l'intima des artères (**Zhang et al., 2015**).

La Nifédipine est connue pour être photosensible, subissant une photolyse par des mécanismes intra-moléculaires, après exposition à l'ultra-violet et la lumière visible, formant principalement des analogues nitro et nitroso-pyridine (**Dinarvand et al., 2006**). Quelques produits secondaires mineurs sont également formés par interactions inter-moléculaires entre les produits de dégradation primaire et leurs intermédiaires (**Hayase et al., 1994 / Handa et Singha, 2014**). Récemment, les travaux de **Imanishi et al., (2014)** sur l'un de ces produits de photodégradation, le

nitronifedipine (NO-NIF), ont montré que ce dernier, qui sera convertis en un radical NO-NIF, acquiert un fort potentiel antioxydant, réduisant par exemple la cytotoxicité d'hydroperoxyde du cumène et protégeant de cette manière l'intégrité des membranes cellulaires endothéliales du stress oxydant. Cependant, sa capacité pour bloquer les canaux calciques est très faible par rapport à celle de la Nifédipine, ce qui nous laisse suggérer que le potentiel antioxydant de la Nifédipine n'est pas dû qu'à ses propriétés d'antagoniste calcique, mais peut aussi être lié à sa structure.

Il est bien connu que le diabète accélère l'athérosclérose et l'hypertension suite à un dysfonctionnement endothéliale vasculaire, ce qui conduit à l'augmentation du risque de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire. (**Cai et Harrison 2000 / Lerman et Zeiher, 2005 / Kahn et al., 2006 / Van Gaal et al., 2006**)

Des études ont rapporté que la Nifédipine protège les cellules β pancréatiques, dans le cas de diabète, contre le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique (RE), et l'apoptose (**Wang et al., 2011 / Syeda et al., 2013**) [un stress du RE intense et prolongé induit un programme de mort cellulaire par apoptose initiée dans le RE par différents mécanismes (**Fougeray et al., 2011 / Fougeray, 2012**)].

Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline et une hyperglycémie. Il est établi qu'une exposition chronique des cellules β pancréatiques à des concentrations élevées de glucose conduit à un dysfonctionnement métabolique de ces cellules et leur mort (**Federici et al., 2001 / Poitout et Robertson, 2008 / Campos, 2012**). Plusieurs événements de signalisation intracellulaire ont été identifiés comme causes de ce dérèglement métabolique (**Pirlo et al., 2002 / Laybutt et al., 2007**). Ceux-ci comprennent le stress du réticulum endoplasmiques et le stress oxydatif (**Zhang et al., 2010 / Thomas et al., 2011 / Mooradian et Haas, 2011 / Tang et al., 2012**). Ces deux types de stress provoquent une apoptose des cellules β pancréatiques (**Maedler et al., 2001 / Leonardi et al., 2003 / Kim et al., 2005 / Fei et al., 2008**), suite à un dysfonctionnement mitochondrial et la libération de cytochrome C, entraînant l'activation des caspases et CHOP (**Jonas et al., 2009**).

Le Ca^{2+} est un régulateur clé non seulement dans la survie cellulaire, mais aussi dans la libération d'insuline. Le glucose pourrait activer les canaux potassiques ATP-dépendants (**Seino et al., 2011**) ce qui conduit à la dépolarisation membranaire et donc à l'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L, stimulant, de cette manière, la libération du Ca^{2+} emmagasiné dans le réticulum endoplasmique et déclenchant ainsi la libération d'insuline. L'hyperglycémie va provoquer une libération accrue de Ca^{2+} . Cette augmentation de la concentration calcique cytosolique déclenche différent signaux apoptotique, tels que la caspase 3, menant à la mort

cellulaire (**Wang et al., 1999 / Xu et al., 2005 / Marchetti et al., 2007**). Des études sur les cellules des îlots de Langerhans de rat type « insulinoma cell RINmSF » montrent que la production de ROS joue un rôle dans le développement du dysfonctionnement de ces cellules chez le diabétique. Le stress oxydatif entraîne une libération de la sécrétion d'insuline par dépolarisation et entrée subséquente de calcium à travers des canaux calciques voltage dépendants (**Wahl et al., 1998**). La Nifedipine protège les cellules β pancréatiques en inhibant la libération de Ca^{2+} , de même que la libération de la sécrétion glucose-dépendante de l'insuline, protégeant de ce fait la viabilité cellulaire (**Orecna et al., 2010 / Wang et al., 2011 / Xu et al., 2012**). L'effet anti-apoptotique de la Nifedipine a été confirmé par les travaux de **Sasaki et al., (2007)** et **Arora et al., (2013)**.

Paradoxalement, la Nifedipine et d'autres antagonistes du calcium sont à l'origine d'une hyperglycémie caractérisée par une résistance à l'insuline avec altération de la tolérance au glucose (**Horl et al., 1987 / Iversen et al., 1990 / Foot et Leighton, 1994 / Al Qahtani et al., 2001**).

Cette DHP accentue également la toxicité causée par d'autres molécules telles que l'anthracycline et les D- amphétamines (**Santostasi et al., 1991/ Vitcheva et al., 2009**) et déclenche une réponse au stress forte et prolongée (**Morakinyo et al., 2009/ 2010**).

A doses thérapeutiques les antagonistes calciques dont la Nifedipine, diminuent le nombre de spermatozoïdes, leur motilité et le poids de l'épididyme, (**Benoff et al., 1994 / Hershlag et al., 1995 / Waghmare et al., 2011**). Le blocage des canaux calciques chez les spermatozoïdes par la Nifedipine réduit l'influx des ions calcium, qui constituent un facteur de signalisation important dans la mobilité des spermatozoïdes, la capacitation, la réaction acrosomique et la fertilisation (**Ahamd et al., 1995 / Ho et Suarez, 2001 / Feng et al., 2007**). La Nifedipine perturbe aussi l'équilibre entre la production et l'élimination des ROS, déclenchant un stress oxydatif. Ces ROS provoquent une peroxydation des lipides et donc une dénaturation de la membrane ainsi qu'une réduction de l'activité des enzymes membranaires et des canaux ioniques, perturbant conséquemment la fertilité (**Morakinyo et al., 2010/ Waghmare et al., 2011**).

D'un autre côté, la Nifédipine est à l'origine d'une hépatotoxicité imputable à une stéatose macrovasculaire (**Russmann et Lauterburg, 2009**), provoquée par une accumulation de triglycérides dans la cellule hépatique sous forme d'une grosse vacuole déplaçant le noyau à la périphérie de la cellule, suite à une stimulation de la lipogenèse, elle-même causée par l'activation du facteur de transcription pregnane X receptor (PXR), un récepteur nucléaire dont la fonction principale est l'expression des gènes impliqués dans les phénomènes de détoxification cellulaire

(**Ekins et Erickson, 2000**) et dans le processus de lipogenèse hépatique (**Moreau et al., 2009 / Fromenty, 2010 / Bergriche et al, 2011**).

Récemment les travaux de (**Turkes et al., 2014**) ont mis en évidence l'effet inhibiteur de la Nifedipine et d'autres Dihydropyridines sur l'activité du paraoxonase-1 (PON-1) une enzyme calcium-dépendante qui hydrolyse les esters à l'instar des organophosphorés et lactone. Au cours des dernières années, cette enzyme a pris une grande importance dans la recherche scientifique en raison de ses effets antioxydants (**Aviram et Rosenblat, 2004 / Alici et al., 2008 / Gupta et al., 2009**). Cette enzyme PON-1 protège les LDL, HDL et les macrophages du stress oxydative (**Fuhrman et al., 2010**) en neutralisant les radicaux libres de l'oxygène, y compris le peroxyde d'hydrogène (**Ates et al., 2009**) et inhibant la peroxydation des lipides par l'hydrolyse des lipides peroxydés à l'instar de l'hydroperoxydes de cholestéryl linoléate ce qui indique un effet protecteur des membranes cellulaires (**Aviram et al., 2000/ Rosenblat et al., 2006**). Elle est également impliquée dans la réaction inflammatoire et la dégradation des signaux de quorum sensing bactériens, qui coordonnent le début de l'infection (**Camps et al., 2011**).

Trois gènes codant des paraoxonases ont été identifiées, les PON-1, PON-2 et PON-3 (**Harel et al., 2004 ; Jaouad et al., 2006**), chacune des PON est dotée d'un fort potentiel antioxydant (**Quillen et al., 2012**). Cependant, leurs substrats physiologiques et fonctions biologiques restent à éclaircir. PON-1 est de loin la plus étudiée des trois, alors que la littérature est beaucoup moins abondante en ce qui a trait à PON-2 et PON-3, en raison de l'identification beaucoup plus récente des deux dernières, qui n'a eu lieu qu'en 1996 (**Primo-Parmo et al., 1996**) comparé à celle des PON-1 identifiées pour la première fois en 1953 (**Aldridge, 1953 a et b**).

Plusieurs études ont noté une diminution de l'activité des PON lors de différentes maladies telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'hypercholestérolémie, le cancer de l'estomac et du pancréas, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'insuffisance rénale aiguë, mais aussi dans le tabagisme, le vieillissement, l'obésité, la ménopause, etc. (**Akcay et al., 2003 a et b / Zhang et al., 2010 / Précourt, 2011/ Turkes et al., 2014**).

La Nifedipine de par sa structure peut interagir avec le site actif de PON-1 ce qui pourrait expliquer son effet inhibiteur sur ce dernier, il est aussi probable, qu'étant un antagoniste calcique, elle influence l'activité de ces enzymes calcium-dépendantes. Néanmoins le mécanisme inhibiteur de la Nifedipine sur les paraoxonases nécessite de plus amples recherches.

II. LES LEVURES

Utilisée depuis des millénaires par l'Homme, la levure est l'une des espèces les plus importantes aussi bien en industrie agro-alimentaire qu'en pharmaco-chimique où elle participe à la fabrication de nombreux produits : brasserie, boulangerie, cidrerie, vinification, fromagerie pour la première, (Van Maris *et al*, 2006 / Vargas *et al.*, 2010 / Kocharin, 2013 / Aceituno, 2013) ; production des protéines, vitamines et criblage des médicaments pour la seconde (Porro *et al.*, 2005 / Bacha, 2008 / Gervasio, 2008). Elle participe aussi à la valorisation des déchets agricoles et industriels. (Nehme, 2008)

Outre son intérêt industriel, la levure est un excellent modèle expérimentale occupant une place de choix au sein de la communauté scientifique pour la recherche fondamentale et appliquée en biologie moléculaire et génétique, en biochimie et en toxicologie.

Cette partie de ce chapitre sera consacré à ce modèle eucaryote très prisé.

1. Généralités sur Les Levures (*Saccharomyces cerevisiae*)

L'origine du terme levure provient du mot latin « levare » qui veut dire « lever » (Oteng et Gyang, 1984) mais n'est pas forcément synonyme de fermentation qui n'existe que chez certaines espèces à l'instar de la plus connue, la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae* (figure 5). Le nom de cette dernière fait référence au fait que c'est un champignon « myces » qui se nourrit du sucre saccharose « saccharo » et y est utilisé dans la fabrication de la bière et du vin (*cerevisiae* pour cervoise nom qu'on donnait autrefois à la bière).

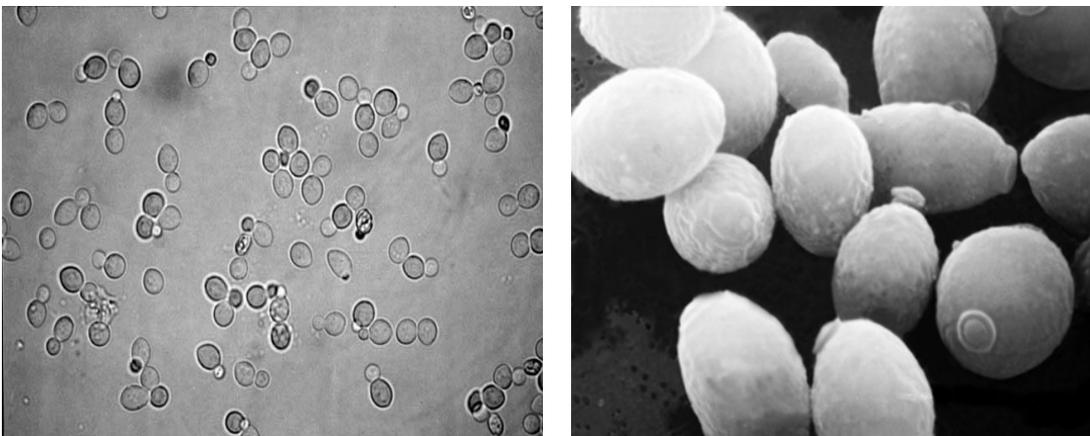


Figure 5. Vue microscopique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

On désigne sous le nom de levures les champignons eucaryotes immobiles, microscopiques et unicellulaires ou qui représentent, au cours de leur développement, une phase unicellulaire (**Leyral et Vierling, 2007 / Guiraud et Galzy, 1998**). Elles furent reconnues comme des Champignons par De Bary en 1866 lorsqu'il détecta des ascospores chez les levures de bière. Elles sont très répandues, on peut les trouver dans différents milieux sucrés (fruits, nectar de fleurs...) mais aussi en sel (salaisons), à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants (dans le tube digestif des animaux et des insectes), elles peuvent persister libres dans les sols, les eaux et l'atmosphère (**Scriban, 1993 / Bacha, 2008**). Cette large abondance dans l'environnement est due à une production rapide, par bourgeonnement ou par fusion (**Kreger-van Rij, 1984**), et à une grande capacité d'adaptation métabolique à des sources nutritives très variées due en majeure partie à une large gamme d'enzymes extra et intracellulaires.

Les levures possèdent une grande tolérance envers un large spectre de types environnementaux pouvant survivre à des conditions assez extrêmes selon les espèces. Ainsi elles tolèrent des températures allant de 0° à 55°C, là où leur température optimale de croissance se situe entre 25° – 30° C. Elles préfèrent les milieux acides mais s'adaptent aussi à tous les pH excepter les extrêmes pouvant croître à des pH de l'ordre de 2.8 à 8 (**Leyral et Vierling, 2007**). Elles ont une tolérance presque complète vis à vis de la dessiccation (déshydratation des levures) et peuvent résister à une pression osmotique de l'ordre de 3M, en plus d'une forte tolérance alcoolique, atteignant les 20% (**Michel et al., 1990 / Jackson, 1994 / Panon, 1997 / Van Maris et al., 2006**).

Il existe environ 80 genres de levures avec approximativement 600 espèces connues. (**Raven et al., 2003**) appartenant à trois classes de Champignons, *les Ascomycètes*, *les Basidiomycètes* et *les Deutéromycètes*.

2. Caractéristiques structurales

Les levures ont des formes variées, caractéristiques du genre mais la forme peut se modifier assez largement selon les étapes du cycle biologique et en fonction des conditions du milieu (**Bocquet, 1993**).

La cellule de levure est typiquement eucaryote, caractérisée par une paroi cellulaire rigide entourant une membrane plasmique, un noyau limité par une membrane nucléaire, un cytoplasme contenant divers organites dont les mitochondries et une grande vacuole (figure 6) (**Thuriaux, 2004**).

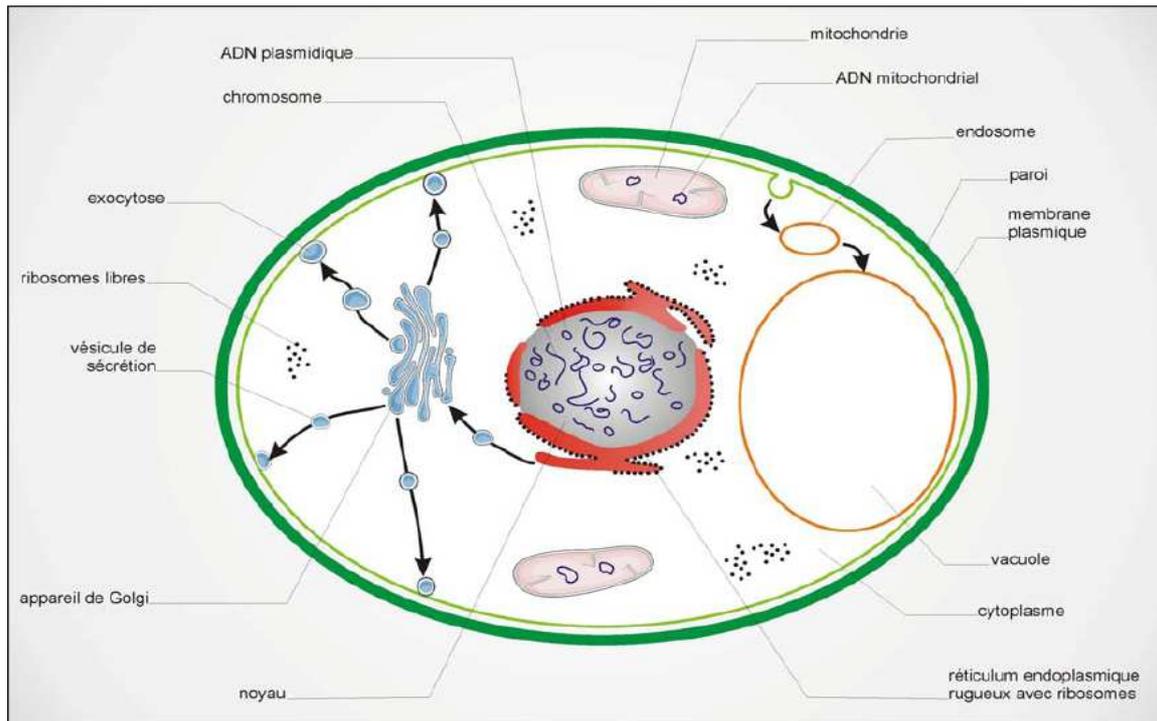


Figure 6. Représentation schématique d'une cellule de levure (Guiffant, 2008).

3. Cycle de croissance

La croissance d'un microorganisme correspond à l'augmentation des constituants cellulaires et peut se traduire par une augmentation de la taille de ses individus, de leur nombre ou des deux à la fois. La croissance des levures est relativement lente (120 minutes) par rapport aux bactéries (20 minutes) (Rose et Harrison, 1987).

La courbe de croissance est constituée généralement de 4 phases distinctes, 3 phases principales précédées par une phase de latence.

La phase de latence peut être définie comme une période d'adaptation caractérisée par l'absence d'augmentation immédiate de masse/ nombre cellulaire, mais au cours de laquelle la cellule synthétise certaines de ses enzymes et autres molécules (Wright *et al.*, 1995 / Jawich, 2006). Cette phase est nécessaire pour diverses raisons (cellules âgées, endommagées, dépourvues d'ATP, de ribosomes ou de cofacteurs essentiels, besoins de synthétiser de nouvelles enzymes pour l'utilisation des nutriments...) permettant au final aux cellules de se réorganiser, répliquer leur ADN et donc d'entamer leur processus de croissance. La durée de cette phase varie selon plusieurs facteurs tels que la nature du milieu et des micro-organismes. Cette phase peut être longue si

l'inoculum de la culture est âgée ou refroidie, ou alors si le milieu est nouveau et de composition différente, comme elle peut être courte voire absente, si une culture jeune en pleine phase exponentielle est transférée dans un milieu familier de même composition.

La phase exponentielle se caractérise par un développement et une division cellulaires à intervalles de temps réguliers avec une vitesse de croissance maximale et constante, suite à des conditions génétiques et de culture favorables. La population est quasi uniforme en termes de propriétés chimiques et physiologiques. C'est au cours de cette phase logarithmique que sont menées sur les cultures les différentes études et recherches scientifiques.

La croissance de la population finit par s'arrêter et la courbe de croissance devient horizontale. Pendant cette phase stationnaire le nombre total des cellules cultivées viables reste constant, ceci peut être dû à un équilibre entre division et mort cellulaire, ou tout simplement au fait que la population a cessé de se diviser tout en restant métaboliquement active. Cette phase résulte du manque voire de l'épuisement des éléments nutritifs et de l'accumulation de déchets toxiques.

Ces changements nuisibles de l'environnement conduisent à la diminution du nombre de cellules viables et donc à la mort de la population. Cette phase de mortalité appelée aussi phase de déclin est, comme la phase exponentielle, logarithmique, c'est-à-dire une proportion constante de cellules meurt chaque heure (**Jackson, 1994 / Prescott *et al.*, 2003 / Djekoun 2012**).

La croissance des levures comme tout autre micro-organisme est considérablement influencée non seulement par les variations de concentration en nutriments mais aussi par la présence de composé inhibiteurs, les mécanismes génétiques et plusieurs facteurs environnementaux physiques et chimiques comme la disponibilité en eau, la température, la concentration en oxygène, le pH, la pression, les radiations, etc. (**Voe *et al.*, 2005 / Fullerton *et al.*, 2006 / Aldiguiet *et al.*, 2006 / Valverde *et al.*, 2008 / 2010**).

4. Cycle cellulaire

La reproduction des levures est complexe, reflétant ainsi l'hétérogénéité de leur mode de vie. Elle peut être sexuée (sporulation), par laquelle les cellules haploïdes de sexe opposé se conjuguent pour former des cellules diploïdes tandis que les cellules diploïdes sporulent pour former des cellules haploïdes. Comme elle peut être asexuée (bourgeonnement) et par laquelle une cellule donne naissance à une autre cellule essentiellement identique.

Le cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* comprend ces 2 modes reproductifs illustrés dans la figure 7 (Nester *et al.*, 1998 / Bourgeois et Larpent, 1996 / Murray *et al.*, 2008). C'est au début de la phase G1 et selon les conditions environnementales externes que les cellules favorisent un mode par rapport à l'autre. En présence d'un milieu favorable assez riche en nutriments, les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* se reproduisent par bourgeonnement (Herskowitz, 1988). Lorsque les conditions du milieu sont défavorables et en présence de phéromones, les levures se conduisent comme des bactéries et favorisent la reproduction par sporulation, en attendant que les conditions redeviennent favorables (retour à une reproduction par bourgeonnement).

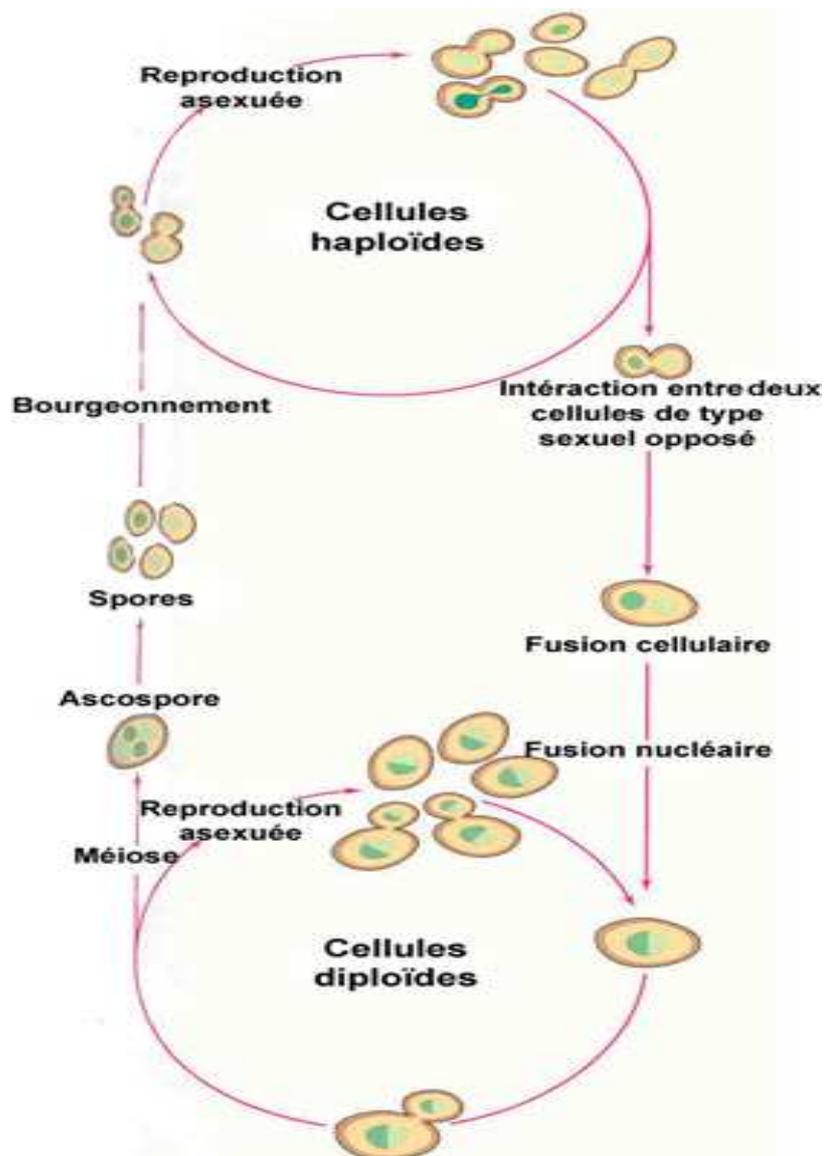


Figure 7. Représentation schématique du cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (Madigan *et al.*, 2000).

5. Métabolisme levurien :

Le métabolisme du glucose chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* comprend 2 types de catabolisme énergétique, la voie respiratoire et la voie fermentaire (figure 8). Ces deux voies peuvent se déclencher selon plusieurs facteurs génétiques, environnementaux et nutritifs. Mais c'est la concentration du substrat (glucose) et l'aération (l'oxygène) qui déterminent principalement l'orientation du métabolisme et jouant un rôle important dans les mécanismes de régulation et d'activation des voies métaboliques chez *Saccharomyces cerevisiae* (Faure, 2005). Ainsi en présence d'oxygène et de source de carbone, c'est les phosphorylations oxydatives, satisfont les besoins de l'organisme en ATP, qui sont privilégiées (effet Pasteur). Mais en hypoxie c'est la glycolyse qui est stimulée entraînant une consommation accrue en glucose pour fournir l'ATP nécessaire (Voet *et al.*, 2005). Cependant, dépassant un certain seuil de concentration de glucose, même en présence d'oxygène, le métabolisme levurien bascule vers le catabolisme respiro-fermentaire (effet Crabtree).

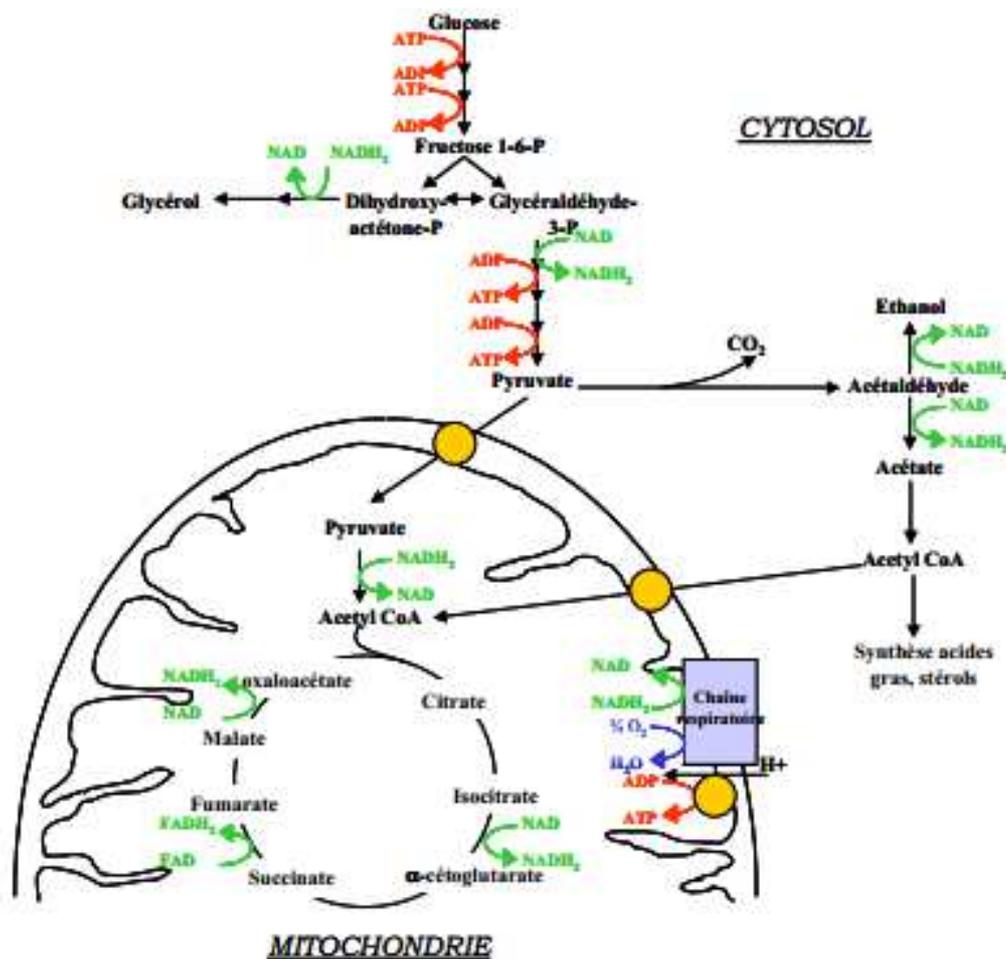


Figure 8. Métabolisme respiratoire et fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Gervasio, 2008).

5.1. L'Effet Pasteur

Il a été découvert en 1861 par Louis Pasteur qui a constaté une diminution de la consommation de substrat et de la production d'alcool accompagnée d'une augmentation de la quantité de biomasse formée en aérobiose (**Voet et al., 2005**)

Parmi les hypothèses émises pour expliquer l'inhibition de la fermentation par la respiration, on peut retenir celle de la compétition des enzymes catalysant soit la respiration ou la fermentation du pyruvate, où la constante d'affinité est un paramètre décisif pour l'orientation du flux métabolique vers l'une de ces voies. Le principal mécanisme de la diminution du taux de glycolyse, est dû à la présence d'oxygène et à l'augmentation de la production d'ATP qui agissent en tant qu'inhibiteur allostérique sur cette voie métabolique (**Krebs, 1972**). Il faut noter aussi le rôle joué par le transport du glucose dans la capacité métabolique, dont l'inactivation progressive provoque une diminution de la fermentation avec une certaine influence des niveaux des hexokinases, phosphofructokinases, aldolase et enolase (**Lagunas et al., 1982 / Petit et al., 2000 / Rossell et al., 2002 / Albers et al., 2007**).

Un exemple de ce mécanisme se situe au niveau des enzymes situées au carrefour entre le métabolisme oxydatif et fermentaire. L'affinité de l'acétaldéhyde déshydrogénase ($6\mu\text{M}$) est 100 fois plus faible que celle de l'alcool déshydrogénase (0.61mM), l'acétaldéhyde, une fois formé par le pyruvate, est majoritairement oxydé en acétate. Le métabolisme de la levure est alors respiratoire et la formation de biomasse devient optimale (**Lagunas et al., 1986 / Postma et al., 1989 / Djekoun, 2012**).

5.2. Effet Crabtree

Découvert en 1929, l'effet Crabtree a été décrit comme un processus fermentaire avec inhibition de la respiration en présence d'oxygène quand la concentration en glucose atteint un certain seuil. Ainsi la levure passe d'un métabolisme purement oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif (**Crabtree, 1929 / Diaz-Ruiz 2010**).

Les événements régulateurs que pourraient expliquer comment la respiration est réprimée immédiatement par l'addition de fortes concentrations de glucose (l'effet Crabtree) restent encore inconnus. Il peut être la conséquence de différents processus qui agissent à court et à long termes. Ces derniers, en particulier, impliquent la répression des gènes qui codent pour les protéines de la chaîne respiratoire. Il y a aussi l'hypothèse de la « capacité respiratoire limitée » (**Kâppelli, 1986**) où

la levure sera au maximum de ses capacités oxydatives (le substrat ne pourra pas être complètement oxydé) et se trouve obligée d'accumuler le pyruvate pour une dégradation ultérieure par les voies fermentaires. Cette limitation impliquant les voies métaboliques responsables du catabolisme respiratoire du pyruvate peut être située au niveau du nœud du pyruvate, du transport de métabolites intra ou extracellulaires ou au niveau de la chaîne respiratoire. Cependant Cette hypothèse est remise en cause par plusieurs études. Ainsi, **Van Urk *et al.*, (1989)** ont étudié la capacité respiratoire des mitochondries isolées de levures Crabtree positives et Crabtree négatives, en l'occurrence *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis*. Ils ne constatent aucune différence au niveau des capacités respiratoires des 2 souches et concluent que l'effet Crabtree chez *Saccharomyces cerevisiae* n'est pas dû à un goulot d'étranglement au niveau de la chaîne respiratoire.

Dernièrement, il a été rapporté que l'inhibition du flux respiratoire est concomitante avec l'accumulation cytoplasmique des hexoses phosphates provenant de la glycolyse. Le glucose 6-phosphate (G6P) et le fructose 6-phosphate (F6P) stimulent cette respiration alors que le fructose 1,6-biphosphate (F16bP) l'inhibe en agissant au niveau des complexes III et IV de la chaîne respiratoire. De plus, ce dernier composé inhibe la stimulation induite par le G6P. Lors de la transition vers le métabolisme fermentaire, il existe une accumulation des hexoses phosphates dans le cytoplasme avec majoritairement du F16bP. Ce métabolite pourrait donc jouer un rôle déterminant dans la régulation de la répression du métabolisme oxydatif induite par glucose. (**Diderich *et al.*, 2002 / Rui et Hahn, 2007/ Diaz *et al.*, 2010**).

6. La levure comme modèle eucaryote

La recherche scientifique a toujours eu comme but la compréhension du mode de fonctionnement de la cellule, et afin d'arriver à cette connaissance des processus biologique, le choix du modèle expérimental est primordial, nécessitant la prise en compte de plusieurs facteurs (rentabilité, faisabilité, éthique...). Parmi ces organismes modèles, la levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place de choix. Ces levures offrent l'intérêt d'être des microorganismes à développement rapide, utilisés de longue date dans l'industrie agroalimentaire comme agents de fermentation, dont la culture est maîtrisée. Le génome simple [16 chromosomes, 13 millions de paires de bases et 6 275 gènes (base de donnée <http://yeastgenome.org/>)] et très étudié, fut le premier d'un eucaryote à être intégralement séquencé en 1996 (**Goffeau *et al.*, 1996**), et par lequel l'analyse génétique a atteint au cours des cinquante dernières années une puissance inégalée par rapport aux autres grands

modèles biologiques (Oswald, 2006 / Dolinski et Botstein, 2006 / Wu *et al.*, 2010), offrant de ce fait, d'énormes possibilités pour des tests de cytotoxicité et génotoxicité (Ballatori et Villalobos, 2002 / Gomes *et al.*, 2005). En plus en tant qu'eucaryotes leur organisation cellulaire est proche de celle des organismes supérieurs où on note une incroyable similarités avec les cellules de mammifères au niveau macromoléculaire et des organites (Schägger, 2002 / Fang et Beattie, 2003 / Hiraga *et al.*, 2005 / Mustacchi *et al.*, 2006 / Henry *et al.*, 2012), ajoutons à cela une conservation élevée de l'évolution des voies de stress. Dès lors, *Saccharomyces cerevisiae* peut servir de modèle approprié pour la caractérisation des réponses au stress chez des organismes plus complexes. C'est un modèle simplifié des cellules qui composent l'être humain. On estime que l'Homme partage 23 % de ses gènes avec les levures. De plus environ 45% de protéines de levure partage au moins une partie de leur séquence amino-acide primaire avec une protéine humaine (Hughes, 2002).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est donc un modèle eucaryote optimal pour étudier les effets toxiques et les réponses biologiques lors de l'exposition aux perturbations exogènes et endogènes (Birch *et al.*, 2000/ Estruch, 2000).

D'importants avantages découlent de l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle eucaryote, on cite par exemple sa non-pathogénicité évitant ainsi tous risques pour les manipulateurs (Watson *et al.*, 1987). Elle a un système simple et facile d'accès permettant d'obvier à tout problèmes d'éthiques et de sécurité découlant de l'utilisation des cellules eucaryotes plus complexes, limitant de ce fait l'utilisation des animaux et assurant le développement et la mise au point de tests rapides, efficaces, et peu coûteux. Par conséquent, elle représente une alternative appropriée et rentable à l'expérimentation animale.

En même temps, la réponse obtenue est plus facile à déchiffrer et, une fois extrapolée à l'Homme, elle pourrait produire une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la toxicité (Braconi *et al.*, 2006/ 2011).

Il n'est donc pas surprenant l'utilisation de cette espèce très largement répondeuse, aussi bien dans l'industrie que dans la recherche scientifique, comme modèle pour la compréhension des mécanismes et caractérisation du stress oxydatif et du système de détoxification (Rodriguez *et al.*, 2004 / Peiter *et al.*, 2005 / Guiffant, 2008 / Roussel, 2009 / Kanwal *et al.*, 2011)

A titre d'exemple, les cellules de levure ont contribué ces dernières années à la clarification des rôles des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les maladies comme la sclérose latérale

amyotrophique ou l'ataxie de Friedreich (**Costa et Moradas-Ferreira, 2001**), ou encore dans la compréhension des mécanismes de toxicité des différents xénobiotiques (**Jawich, 2006 / Adamis et al., 2007 / Djekoun, 2012**).

Elles ont servi à l'étude plus approfondie du fonctionnement et dysfonctionnement mitochondriale (**Rintala et al., 2009 / Raab et al., 2010 / Gutiérrez-Aguilar et al., 2010 / Zampol et al., 2010 / Fréchin, 2010 / Meunier et al., 2013**) et du programme apoptotique (**Priault et al., 2003 / Trancikova et al., 2004 / Kissova et al., 2006 / Guérin et al., 2008**). *Saccharomyces cerevisiae* a également servi à l'identification et la caractérisation de nombreux gènes humains, animaux et appartenant à d'autres microorganismes, ainsi que différents systèmes enzymatiques appartenant à la superfamille des Cytochromes P450s (CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2D6, 2E1 et 3A4), la NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase et du cytochrome oxydase (**Imaoka et al., 1996 / Murray et Correia, 2001 / Barros et Tzagoloff, 2002 / Hanioka et al., 2010**)

Les études sur l'évaluation des médicaments dépendent encore largement de l'utilisation des animaux, mais ces dernières années plusieurs publications ont porté sur le développement et la pertinence des méthodes alternatives pour leur évaluation, qui ne dépendent pas de l'utilisation des animaux, mais explorent l'utilisation de solutions de rechange rapides et rentables (**Ribeiro et al., 2000 / Sepúlveda et al., 2013**). Ainsi *Saccharomyces cerevisiae* a déjà joué un rôle important dans le criblage de nouveaux médicaments (**Simon et Yen, 2003 / Smith et al., 2010 / Qaddouri et al., 2011 / Ho et al., 2011**). Ces cellules de levures ont également été proposées comme outil de compréhension des mécanismes d'action des agents thérapeutiques, de leur cible cellulaire, et par surcroît, comme modèle pour l'évaluation de la toxicité médicamenteuse (**Sturgeon et al., 2006 / Stepanov et al., 2008 / van Leeuwen et al., 2010 / Matuo et al., 2012**), on peut citer comme exemple leurs utilisation pour l'évaluation de la cytotoxicité et la génotoxicité des médicaments anticancéreux (**Buschini et al., 2003 / Lee et al., 2005 / Menacho-Márquez et Murguía, 2007 / Guiffant, 2008**), ou encore de l'Ebselen (utilisé comme nouveau agent anti-inflammatoire) et son potentiel rôle dans l'induction des ROS (**Kumar Azad et al., 2014**).

Chapitre II

MATERIEL ET METHODES

Notre étude expérimentale a été effectuée au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire du Département de Biologie à l'Université Badji Mokhtar d'Annaba-Algérie.

1. Matériel

1. 1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans notre travail est un champignon eucaryote unicellulaire, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

La Classification systématique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans le monde des vivants est décrite comme suit (Larpent, 1992) :

Domaine : **Eucaryotes**

Règne : **Fungi**

Embranchement : **Mycètes**

Division : *Ascomycota*

Sous-division : *Saccharomycotina*,

Classe : *Saccharomycetes*

Ordre : *Saccharomycetales*

Famille : *Saccharomycetaceae*

Genre : *Saccharomyces*

Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*

1.2. Matériel Chimique

Le matériel chimique utilisé est un inhibiteur calcique de la famille des dihydropyridines : **la Nifédipine (figure 8)**, chimiquement connu sous le nom d'Ester 2,6-diméthyl- 4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate ($C_{17}H_{18}N_2O_6$) (Tulasamma et Venkateswarlu, 2012).

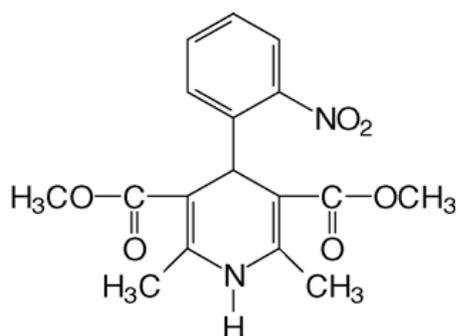


Figure 9. Structure chimique de la Nifedipine (Hecq *et al.*, 2005).

Quatre concentrations ont été choisies pour notre traitement : **0,01mM, 0,05mM, 0,5mM** et **1mM**. Nous avons utilisé comme solvant de l'acétone pour une concentration finale de l'ordre de 1% d'où la présence d'un témoin acétone.

Afin d'éviter toute dénaturation/ photodégradation de la molécule, nous avons pris les précautions nécessaires, étant donné que la Nifédipine est photosensible et instable à l'ultra-violet et la lumière visible.

2. Méthodes

2.1. Culture des Levures

Avant nos essais expérimentaux, nous avons procédé à un lavage des levures afin d'éliminer toute trace de substrat dans le milieu (Pol, 1994).

2.1.1. Protocole de lavage et mise en culture

- Préparer une suspension de levure puis rajouter de l'eau physiologique (Solution NaCl à 9g/l), passer au vortex/ agitateur magnétique.
- Centrifuger la suspension (3000 tours / 5 min) et éliminer le surnageant.
- Recommencer deux fois les étapes précédemment décrites et mettre ensuite les levures en suspension dans le milieu désiré.

2.1.2. Le milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est un milieu sélectif pour la respiration composé de 10 g d'extrait de levure, 0.25g de glucose, 25 ml glycérol et 940 ml de tampon phosphate pH = 6.2.

2.2. Cinétique de croissance cellulaire

La cinétique de croissance des levures s'effectue par la mesure de la densité optique DO à la longueur d'onde $\lambda = 660\text{nm}$ en fonction du temps (Pol, 1994), aussi bien pour les témoins que pour les traitées et chaque aliquote est observé au microscope photonique (Leica DL.1000) au grossissement x40 et x 100.

2.3. Calcul du pourcentage de réponse :

Le pourcentage de réponse est un paramètre d'évaluation des effets des différentes concentrations de Nifedipine sur les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le pourcentage de réponse a été obtenu selon la méthode de Wong *et al.*, (1999) grâce à la formule suivante : $100 * (\text{Nt} - \text{Npc}) / \text{Nt}$ où

Nt : représente la DO du témoin,

Npc : représente les cellules traitées par la Nifedipine « p » à la concentration « c ».

Les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance, tandis que les valeurs positives traduisent une inhibition de la prolifération.

2.4. Dosage des métabolites

2.4.1. Dosage des protéines totales :

Les protéines totales sont dosées selon la méthode de Bradford, (1976), grâce à un spectrophotomètre (JENWAY 6300) et dont la lecture s'effectue à une longueur d'onde de 595nm, en utilisant l'Albumine Sérum bovine (BSA) comme standard.

2.4.2. Dosage des lipides

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972) selon le protocole suivant :

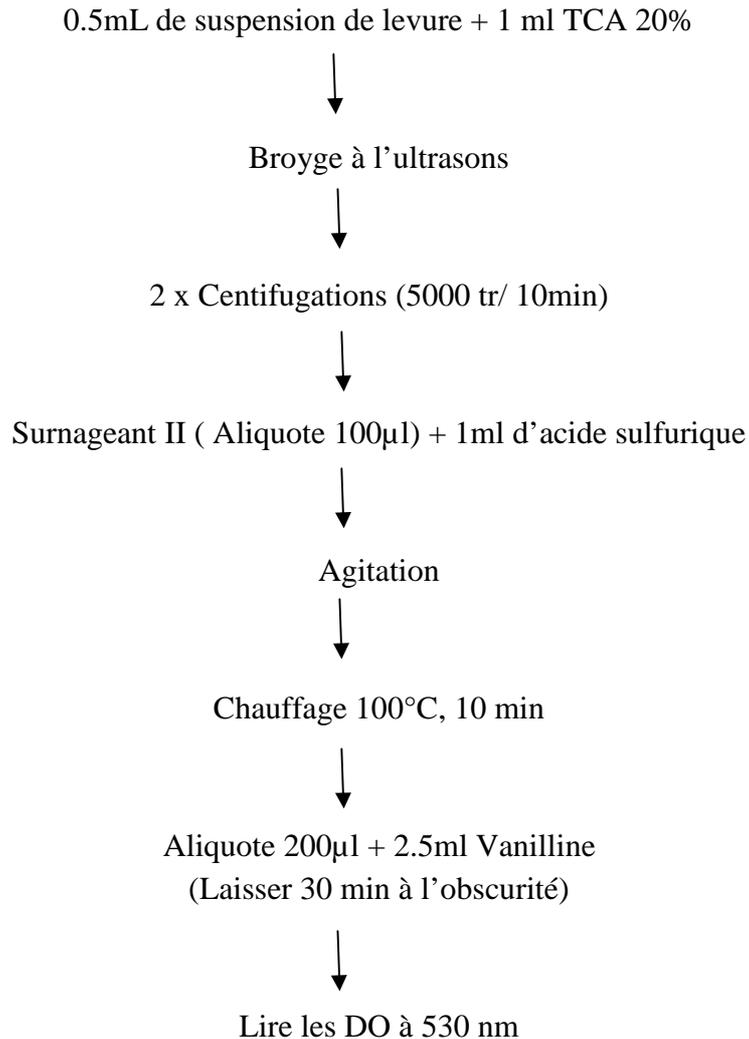


Figure 10. Dosage des lipides selon la méthode de **Goldsworthy *et al.*, (1972)**

2.4.3. Dosage des glucides totaux :

Le dosage des glucides pour les différents traitements ainsi que pour les témoins est réalisé d'après le procédé de Duchateau et Florkin (1959) selon le schéma suivant :

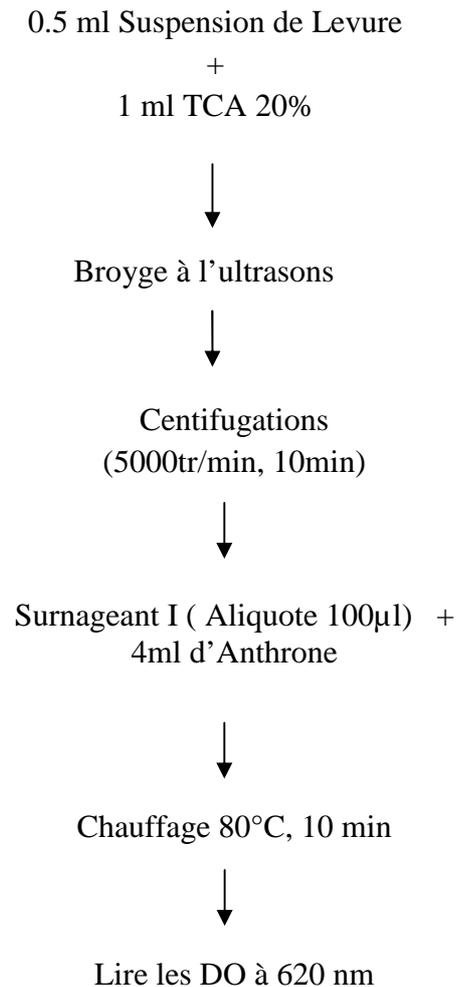


Figure 11. Principales étapes d'extraction et du dosage des glucides totaux.

2.5. Mesure de l'activité respiratoire

La consommation cellulaire d'oxygène liée à l'oxydation des substrats respiratoires est mesurée avec un oxygraphe à l'aide d'une électrode à oxygène de Clarck (HANSATECH) couplée à un micro-ordinateur (Boulaassel, 2014).

2.6. Dosages des biomarqueurs du stress oxydant

2.6.1. Préparation de l'extrait enzymatique

Les dosages enzymatiques (relatifs au suivi de biomarqueurs de stress oxydant) nécessitent une homogénéisation et un fractionnement subcellulaire des échantillons. De ce fait, une culture de levure est arrêtée en phase exponentielle par centrifugation (1500 g x 10 min).

S'ensuit, une homogénéisation par broyage à l'ultrason des cellules dans un bac de glace pour éviter toute dénaturation. L'homogénat est ensuite centrifugé à 10 000 g x 30 min x 4 °C en vue de l'obtention de la fraction "S9", qui contient les enzymes microsomales et cytosoliques et qui sera congelée pour de futures utilisations. L'ensemble de ces procédures se déroulent dans un tampon phosphate 100 mM à pH 7,5.

2.6.2. Dosage de l'activité Catalase :

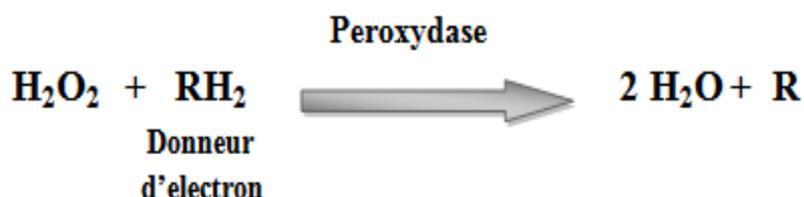
La Catalase est une enzyme de détoxification présente dans toutes les cellules aérobies, impliquée dans la défense contre les concentrations élevées de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou elle le catalyse en eau et oxygène gazeux par dismutation selon la réaction suivante :



L'activité catalase est mesurée selon la méthode de **Regoli et Principato, (1995)** par suivi de la quantité d'H₂O₂ décomposée, directement proportionnelle à la concentration en enzyme. C'est une réaction du premier ordre. Le milieu réactionnel contient 50 mM de tampon phosphate (pH 7.5), ainsi que 50 mM H₂O₂ et 0,02 ml d'extrait enzymatique (fraction S9) à la température d'incubation de 25°C. La lecture est effectuée à une longueur d'onde de l'ordre de 240 nm.

2.6.3. Mesure de l'activité Peroxydase

Les peroxydases à l'instar de la catalase sont des enzymes de détoxications qui catalysent le peroxyde d'hydrogène en faible concentration en molécule d'eau et en oxygène, mais en présence d'un substrat déterminé.



Pour suivre l'activité Peroxydase, nous avons préparé un mélange contenant 50 mmol/l de tampon phosphate (pH 7,5), 20 mmol/l d'un substrat déterminé comme donneur d'électron, le Guaiacol ou l'Ascorbate, pour respectivement le dosage du Guaiacol-peroxydase (GPX) et de l'Ascorbate peroxydase (APX) et 0,1 ml d'extrait enzymatique. La réaction est initiée par l'addition de 40 mmol/l de H₂O₂ et le changement d'absorbance est suivi par spectromètre UV/ Vis (JENWAY 3605) à 470 nm pour la GPX et 290 nm pour l'APX.

2.6.4. Dosage de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

Le superoxyde dismutase est une métalloprotéine de détoxication impliquée dans le mécanisme de défense contre les radicaux libres. Cette enzyme est ainsi responsable de la dismutation de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) en dioxygène (O₂) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

La méthode spectrophotométrique de détection de l'activité de la SOD est indirecte en raison de l'instabilité de l'anion superoxyde. Le dosage permet une mesure de l'activité de la SOD en utilisant l'auto-oxydation du β-mercaptoéthanol en présence d'EDTA/MnCl₂ comme générateur des anions superoxyde (O₂^{•-}) dans le milieu réactionnel. Ces anions vont provoquer l'oxydation du NADH. La SOD entre en compétition pour l'utilisation du O₂^{•-}, ceci tend à diminuer la quantité de O₂^{•-} dans le milieu provoquant ainsi l'inhibition de l'oxydation du NADH. On estime alors que 50 % d'inhibition correspond à une unité d'enzyme.

Pour la réalisation du dosage nous avons utilisé la méthode **Servais (2004)** et **Barillet (2007)** que nous avons adaptées à notre travail. Ainsi nous prélevons 0,1ml de l'extrait enzymatique auquel nous ajoutons 1,3 ml d'une solution dont la composition est la suivante : 0.8 ml d'une solution de NADH (7,5 mM), 0.5ml d'un mélange volume à volume d'EDTA (200 mM) et de $MnCl_2$ (100 mM) préalablement préparé et 16ml de Tampon phosphate à pH= 7,4. La réaction est déclenchée par l'ajout rapide de 0,1ml de β -mercaptoéthanol (10 mM). L'absorbance est mesurée après 0 et 20 min d'incubation à température ambiante à 340 nm pendant 5 min (SOD totale).

L'activité de la Mn SOD (SOD mitochondriale) seule est mesurée en inhibant la Cu/Zn SOD (SOD cytosolique) en présence de KCN à 2mM. L'activité de la Cu/Zn SOD est déduite directement des deux mesures précédentes. L'activité des différentes SODs sont exprimées en Unité/mg de protéines.

2.6.5. Dosage du NADPH Cytochrome P450 réductase (NCPR)

La NADPH cytochrome P450 réductase appelé aussi NADPH-Cytochrome c réductase est une flavoprotéine située dans le réticulum endoplasmique lisse. Elle catalyse le transfert des électrons du NADPH à au moins trois types d'accepteurs, à savoir les accepteurs anaérobiques (Cytochrome C, le 2,6-dichloro-indophénol et ménadione), l'oxygène moléculaire, mais surtout vers divers oxygénases dont le cytochrome P450 (CYP450), responsable de la métabolisation des xénobiotiques (**Shen et Kasper, 1993/ Guengerich, 2003/ Masters et Marohnic, 2006**).

Le dosage de l'activité enzymatique spécifique a été réalisé à l'aide du Cytochrome c Reductase (NADPH) Assay Kit- sigma. C'est un dosage colorimétrique qui mesure la réduction du cytochrome c par la NCPR en présence du NADPH. L'absorbance est mesurée à 550 nm. Mais pour cela, nous avons tout d'abord procédé à la récupération de la fraction post mitochondrial qui contient les microsomes du réticulum endoplasmique.

- **Isolement des microsomes du réticulum endoplasmique bruts (fraction post mitochondrial)**

Nous avons, dans un premier temps, procédé à l'obtention des sphéroplastes selon la méthode de **Rey, (2009)**. Ainsi, la culture de *Saccharomyces cerevisiae* est arrêtée en phase exponentielle de croissance par centrifugation à 1500g x 15min x 20°C.

Le culot cellulaire subit ensuite un lavage à l'eau et une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions, puis il est traité pendant 30 minutes à 30°C par un milieu réducteur, afin de fragiliser la paroi cellulaire, contenant 100 mM Tris-HCl, 10 mM dithiothréitol, pH 9,4 à raison de 0,5 g de cellules/ml de milieu.

Après centrifugation (10 min x 1500 g x 20°C), les cellules sont lavées dans 1,2 M sorbitol puis centrifugées dans les mêmes conditions. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un milieu contenant 1,2 M sorbitol, 20 mM KH₂PO₄, pH 7,3 à raison de 0,3 g de cellules/ ml de milieu.

Les cellules vont subir ensuite une lyse à l'aide de la Lyticase (sigma) qui va digérer à 37°C les parois cellulaires des levures à raison d'une concentration de 625 unités de Lyticase par gramme de cellules humides. La cinétique de digestion est suivie en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm d'une prise d'essai de 20 µl diluée dans 2 ml d'eau distillée et pendant 2 minutes. Lorsque la valeur de la DO atteint 20 % de la valeur initiale, la lyse est arrêtée par centrifugation (1500 g, 15 min, 20°C). Les sphéroplastés obtenus après digestion de la paroi cellulaire sont lavés deux fois dans un milieu sorbitol 1,2 M et centrifugés (1500 g, 10 minutes, 20°C), afin de supprimer le maximum de phosphate et de Lyticase.

Les sphéroplastés sont resuspendus dans un autre milieu contenant 0,6 M mannitol, 10 mM Tris-HCl, 1 mM acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), 0,1 % (p/v) BSA, 1 mM fluorure de phényl méthanesulfonyle (PMSF) et rompus mécaniquement par dix aller-retours de piston dans un homogénéisateur de Dounce.

Une centrifugation à basse vitesse s'ensuit (1000 g x 10 min x 4°C), le surnageant récupéré subira une autre centrifugation (12000 g x 15 min x 4°C). Le surnageant obtenue (fraction post mitochondrial contenant les microsomes) servira pour le dosage de la NCPR où 20 µl de l'inhibiteur de la Cytochrome c Oxydase sont ajoutés afin d'éviter toute interférence de l'activité de cette dernière avec la NCPR.

2.6.6. Mesure de l'activité Glutathion S-transférase (GST)

La mesure de l'activité glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et al., (1974)**. Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH) :



Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé à 14000 tr x 30 mn x 4°C et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage consiste à faire réagir 0,2 ml de l'extrait enzymatique avec 1,2 ml du mélange CDNB. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm grâce à un spectrophotomètre UV/Visible (JENWAY 6305) contre un blanc contenant 0,2 ml d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant.

2.6.7. Dosage du glutathion total (GSH)

Le glutathion, un tripeptide de thiol intracellulaire composé de l'acide glutamique, la cystéine et la glycine, est un acteur clé des mécanismes de protection cellulaires contre les dommages des radicaux libres en agissant comme un antioxydant.

Il assure aussi le maintien des autres antioxydants exogènes tels que les vitamines E et C (**Power et Lennon, 1999 / Packer et al., 1997/ Deponte, 2013**).

La diminution du glutathion est un signe de stress oxydant et le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est considéré comme un marqueur du stress oxydant (**Garait, 2006/ Circu et Aw, 2010**).

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de **Weckberker et Cory, (1988)**, dont le principe repose sur l'oxydation du GSH par l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) pour former un dérivé jaunâtre, l'acide 2-nitro 5-mercaptopurique (TNB), mesurable à une longueur d'onde de 412 nm (**Rahman et al., 2007**).

2.6.8. Suivi de la peroxydation lipidique (TBARS test)

Le MDA est un produit secondaire de la peroxydation lipidique ou plus précisément de l'action des espèces oxygénées réactives (ROS) sur les acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. Il peut également être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés, le désoxyribose ou le saccharose lorsqu'ils sont exposés à l'action des radicaux hydroxyles, en présence de métaux par exemple (**Janero, 1990**). Ce sous produit de la

peroxydation et marqueur du stress oxydatif peut toucher et endommager les macromolécules comme les protéines, les lipoprotéines et l'ADN.

La détermination des TBARS (substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique), considérée comme un marqueur de la peroxydation lipidique, est basée sur la réaction d'un réactif TBA avec le malondialdéhyde (MDA) (**figure 12**). Ce test, donnant des résultats globaux, permet une première approche de la lipoperoxydation.

Le procédé, d'après la méthode de **Draper et Hadley, (1990)**, implique un chauffage dans un bain d'eau bouillante des échantillons biologiques auxquels on ajoute du TCA (20%) pendant 15 min. Après refroidissement sur glace, la solution est centrifugée à 10000 g x 10 min et le surnageant récupéré est additionné au réactif TBA avant de subir un autre chauffage-refroidissement, suivi d'une centrifugation dans les mêmes conditions précédemment décrites. L'extractibilité du composé TBA-MDA est réalisée à l'aide d'un solvant organique le butanol. Le surnageant contenant notre composé sera récupéré et son absorbance déterminée à 532 nm. La concentration de la peroxydation lipidique est exprimée en µg de MDA par mg de protéines.

Le résultat du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique est donc la somme non seulement du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, mais aussi des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du malondialdéhyde, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud. (**Lefèvre et al., 1998**).

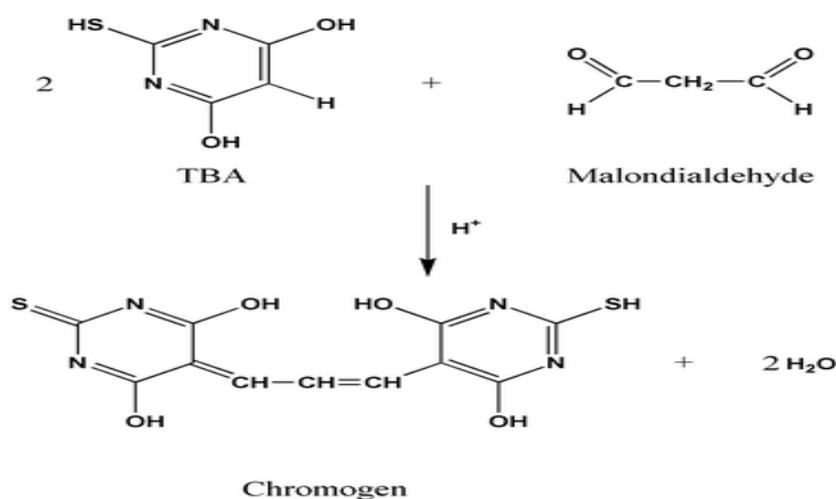


Figure 12. La réaction entre le TBA et le MDA

2.6.9. Mesure de l'état Redox cellulaire

L'état redox de l'environnement cellulaire est un facteur métabolique essentiel pour diverses fonctions cellulaires, comme le repliement, la conformation et la dégradation des protéines, la signalisation cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose, etc. (**Schafer et Buettner, 2001 / 2003**).

La mesure de cet état comporte deux tests : celui des composés prooxydants (d-ROM test) qui nous permet de mesurer le stress oxydant, et celui des composés antioxydants (BAP test) pour la mesure des réponses antioxydantes biologiques. Il est réalisé spectrophotométriquement à l'aide de (FRAS Evolve System (H&D srl-Parma Italy) diagnostic kit (**Pasquini et al., 2008**), que nous avons adapté à nos conditions de travail.

Ainsi la mesure de l'état Redox cellulaire (ROMs et BAPs) nécessite au préalable, un arrêt de la culture, en phase exponentielle, par centrifugation à 1500g x 15min x 20°C afin d'éliminer le milieu de culture. S'ensuit, une homogénéisation par broyage à l'ultrason des cellules dans un bac de glace pour éviter toute dénaturation. Cette procédure se déroule dans un tampon phosphate 100 mM à pH 7,2. L'homogénat obtenu nous servira pour la réalisation des deux tests.

- **Mesure des métabolites réactifs d'oxygène (ROMs)**

Le principe de ce test est basé sur la réaction des ROMs (ROS) avec un tampon chromogène spécifique N,N-diéthylparaphényldiamine (DEPPD) donnant ainsi une coloration rouge qui sera mesurée par spectrophotométrie à une absorbance de l'ordre de 505 nm. Le résultat sera directement proportionnel à la concentration des ROMs selon la loi de Lambert-Beer (une relation empirique reliant l'absorption de la lumière aux propriétés des milieux qu'elle traverse).

- **Dosage du potentiel antioxydant biologique (BAPs)**

Le potentiel antioxydant biologique de nos échantillons est proportionnel à la capacité de réduction de l'ion ferrique Fe^{3+} en ion ferreux Fe^{2+} en suivant par spectrophotométrie (505 nm) l'intensité de la décoloration par les antioxydants cellulaires de la mixture $FeCl_3$ avec un substrat chromogénique spécifique le thiocyanate $[SCN]^-$ qui donne une coloration rouge sang en présence d'ions Fe^{3+} par la formation de complexes $[Fe(NCS)(H_2O)_5]^{2+}$.

3. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données est effectuée en utilisant le test t de Student et le test d'analyse de la variance à deux critères (ANOVA) (**Dagnelie, 2006**).

Ces tests sont réalisés grâce à un logiciel d'analyse de traitement statistique des données : Minitab 13. Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm s$).

Les différences sont considérées comme significatives lorsque $*p \leq 0,05$; hautement significatives lorsque $** p \leq 0,01$; et très hautement significatives lorsque $*** p \leq 0,001$.

Chapitre III
RESULTATS

1. Effet de la Nifedipine sur la croissance cellulaire :

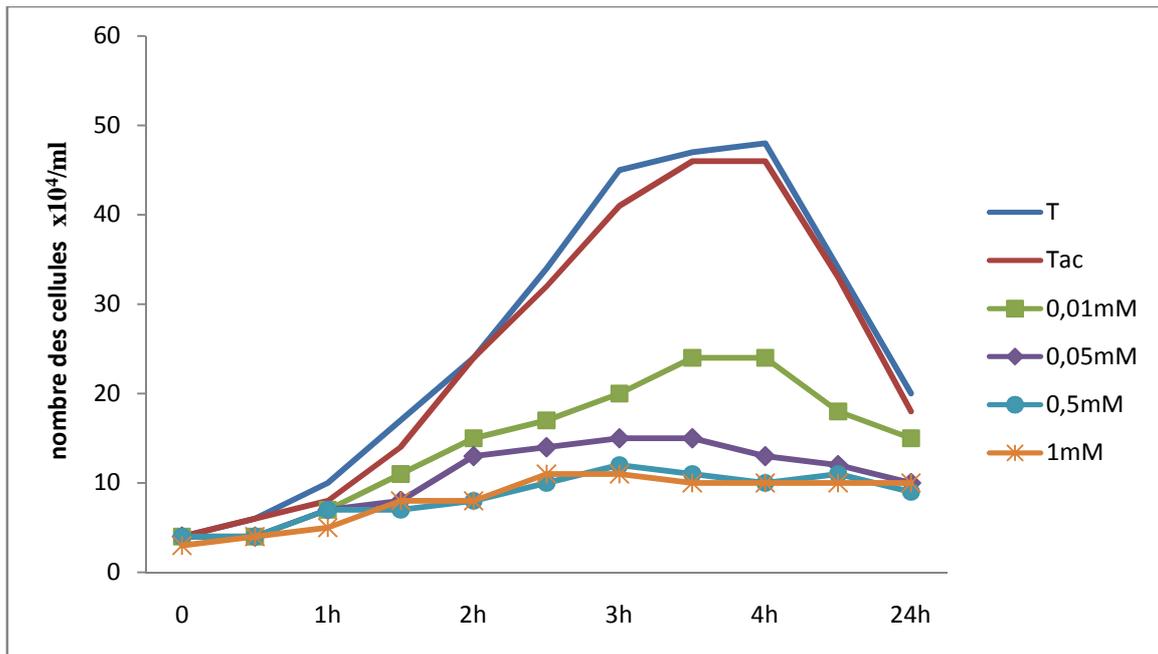


Figure 13. La cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en présence des concentrations croissantes de Nifédipine et en fonction du temps.

La figure (13) illustre l'effet des concentrations croissantes de Nifedipine sur la cinétique de croissance des levures témoins et traitées. Nous remarquons que chez les cellules témoins la croissance est normale. Chez les cellules traitées, en revanche, nous constatons une inhibition significative (* $p < 0.05$) de la croissance cellulaire et ce pour toutes les concentrations de Nifedipine testées. Cette inhibition est respectivement de l'ordre de 50%, 72%, 78% et 79% chez les cellules traitées par les concentrations croissantes de Nifedipine après 4h de traitement.

2. Effet de la Nifedipine sur l'évolution du Pourcentage de Réponse :

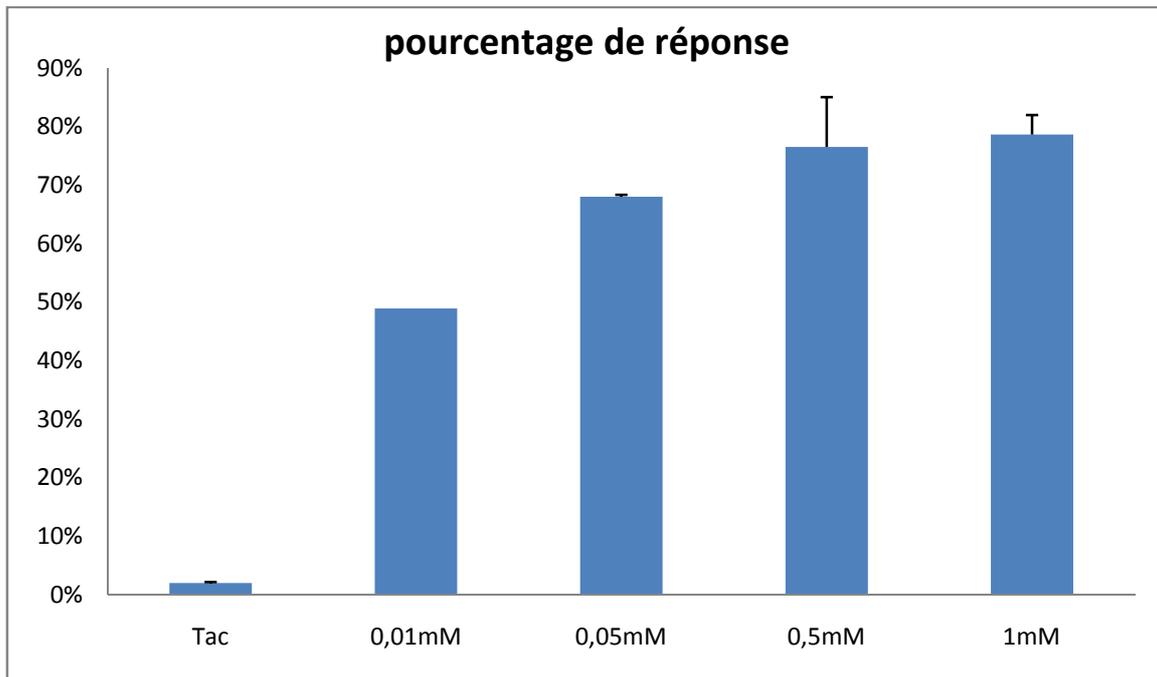


Figure 14. Evolution du pourcentage de réponse chez *Saccharomyces cerevisiae* en présence des concentrations croissantes de Nifédipine après 3h de traitement.

La figure (14) représente l'évolution du pourcentage de réponse chez *Saccharomyces cerevisiae* traitées par les concentrations croissantes de Nifedipine après 3h de traitement. Ce pourcentage est respectivement de l'ordre de 49%, 68%, 77% et 79% pour les concentrations croissantes de Nifedipine, ces valeurs positives confirment l'inhibition de la croissance chez les cellules traitées. Concernant le témoin acétone, le pourcentage de réponse est presque nul (de l'ordre de 2%) mettant ainsi en évidence une croissance normale des levures.

3. Effet de la Nifedipine sur l'évolution du taux des protéines totales :

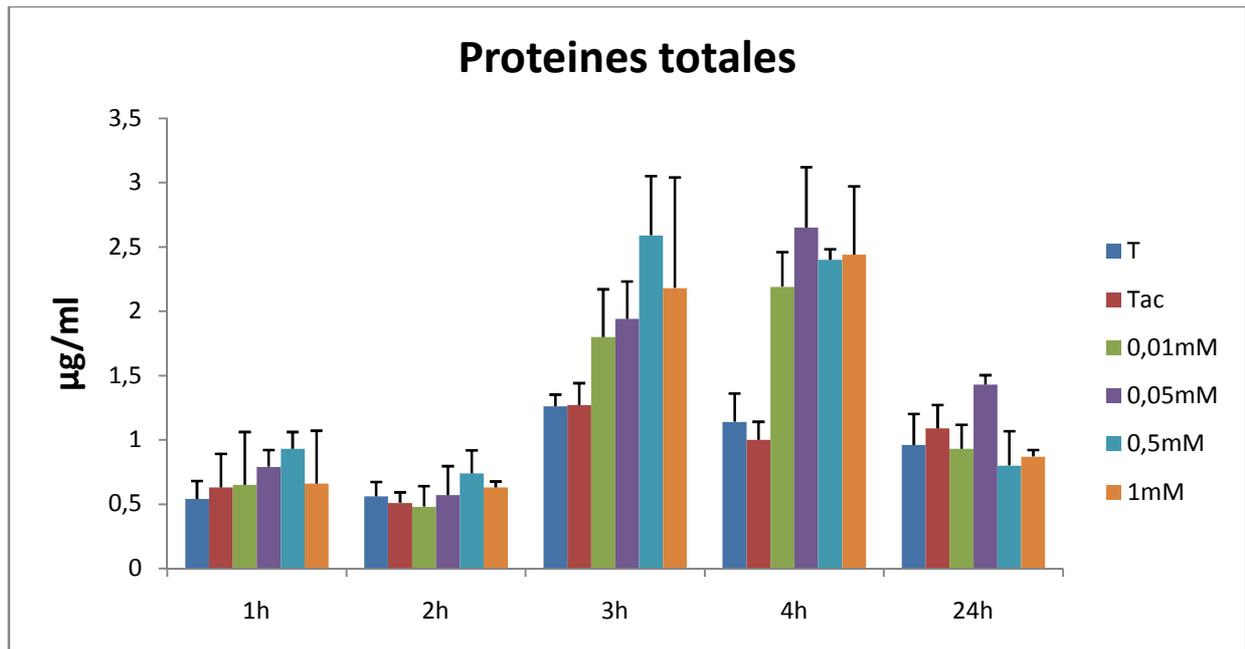


Figure 15. Evolution du taux de protéines totales en fonction du temps et des concentrations Croissantes de Nifédipine chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (15) illustre les effets des différentes concentrations de la Nifedipine sur le taux des protéines totales chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ce paramètre est indispensable dans l'étude des mécanismes enzymatiques.

On observe ainsi une augmentation significative ($*p \leq 0.05$) du taux des protéines chez les traitées par rapport aux cellules témoins. Cette augmentation est maximale après 3h et 4h de traitement.

4. Effet de la Nifedipine sur l'évolution du taux des lipides totaux :

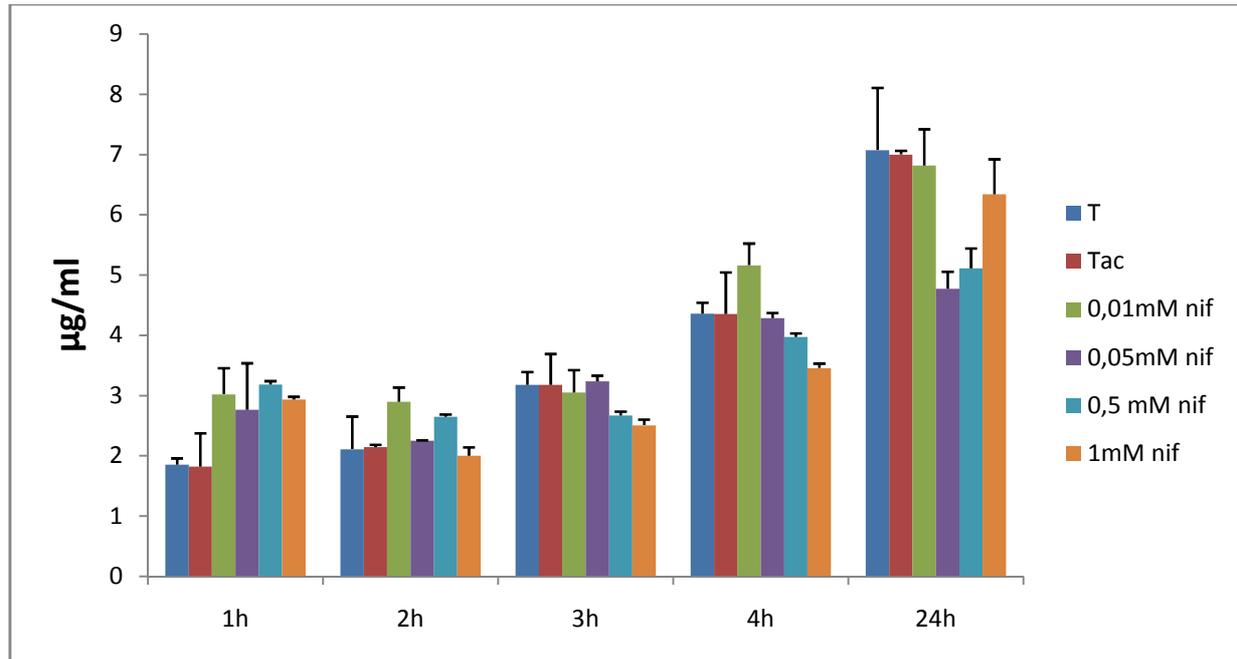


Figure 16. Evolution du taux des lipides totaux en présence des concentrations croissantes de Nifédipine et en fonction du temps chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (16) montre l'évolution du taux des lipides totaux chez *Saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps et des concentrations croissantes de l'antagoniste calcique. Nous constatons dans un premier temps une augmentation du taux des lipides totaux au court de la 1ère et 2ème heure de traitement en comparaison aux témoins, mais à partir de la 3ème heure nous remarquons une diminution très hautement significative ($***P \leq 0.000$) du taux des lipides totaux. En effet, après 24 heures de traitement, par exemple, ce taux passe d'une moyenne de 7,07 µg/ml chez le témoin à 4,77 µg/ml chez les traités avec une concentration de 0,05mM de Nifedipine.

5. Effet de la Nifedipine sur l'évolution du taux de Glucides Totaux

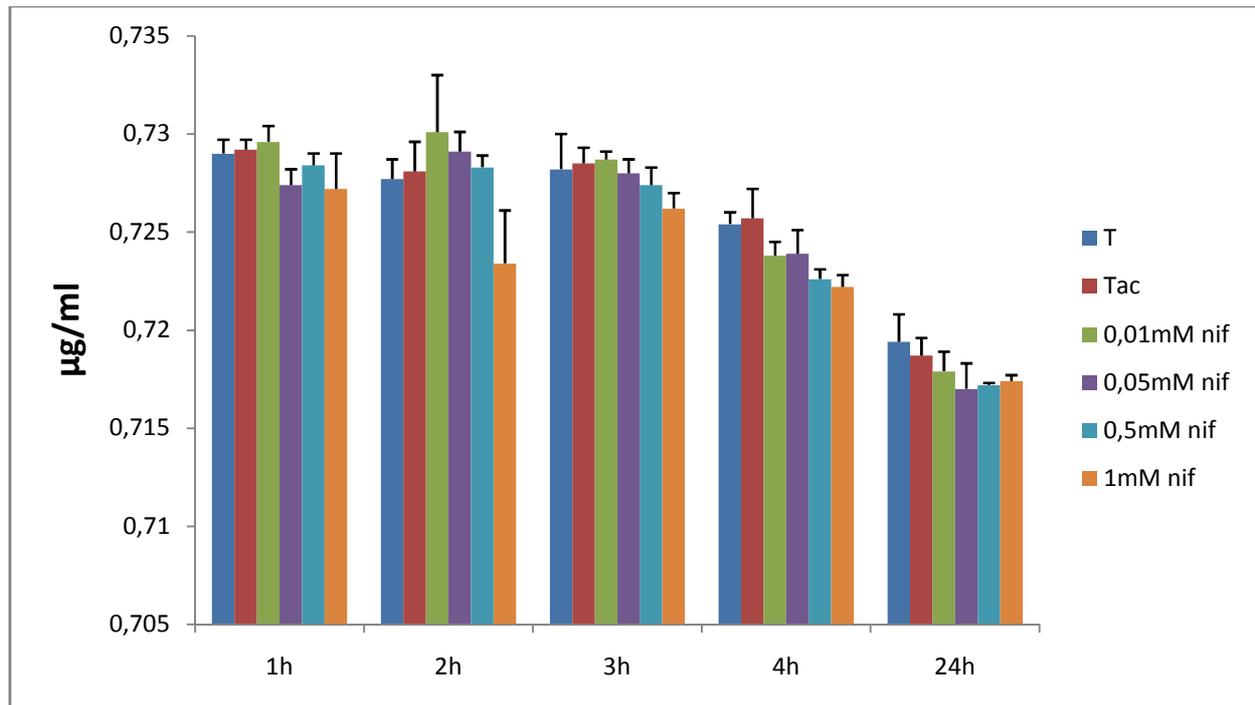


Figure 17. Effet des concentrations croissantes de Nifedipine sur le taux des glucides totaux en fonction du temps chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (17) montre une diminution des taux des glucides en fonction du temps et des différentes concentrations de Nifedipine chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette diminution, plus distincte à partir de la 3^{ème} heure de traitement, est hautement significative pour le facteur temps ($***P = 0,001$) mais non significatif pour le facteur concentration ($P=0,409$) et l'interaction (concentration temps) ($p=0,472$), après analyse statistique, et ce pour l'ensemble des heures de traitement.

6. Effet de la Nifedipine sur le métabolisme respiratoire (consommation d'O₂)

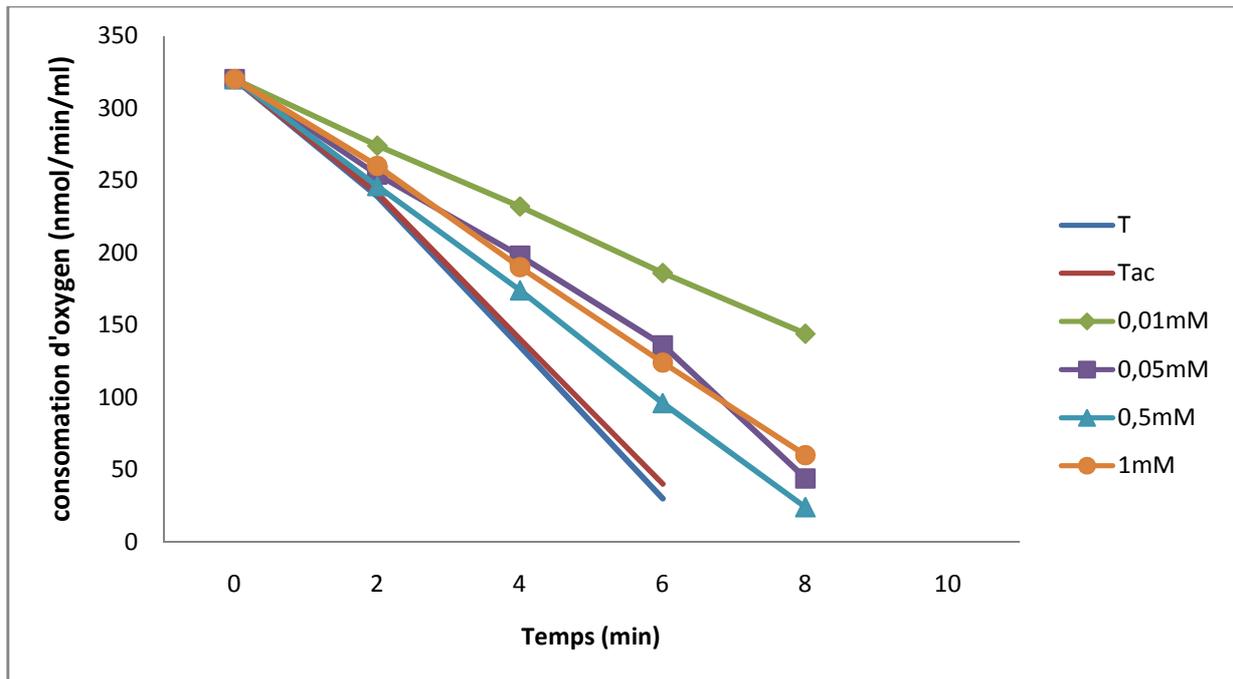


Figure 18. Evolution de l'activité respiratoire en présence des différentes concentrations de Nifédipine chez *Saccharomyces cerevisiae* après 3h de traitement (* $P \leq 0.05$).

Les résultats présentés dans la figure (18) mettent en évidence l'évolution de la consommation d'oxygène chez *Saccharomyces cerevisiae* en présence des concentrations croissantes du xénobiotique, après 3h de traitement.

Nos résultats illustrent une augmentation de la consommation d'O₂ chez les levures témoins qui passe de 320nmol/min/ml d'O₂ à 35nmol/min/ml d'O₂. Cependant, chez les levures traitées, nous constatons un ralentissement (inhibition) du métabolisme respiratoire. En effet, la consommation d'oxygène passe de 320nmol/min/ml d'O₂ à seulement 186nmol/min/ml d'O₂ pour les cellules traitées avec la concentration 0,01mM de Nifédipine.

7. Effet de la Nifedipine sur l'évolution de l'activité Catalase :

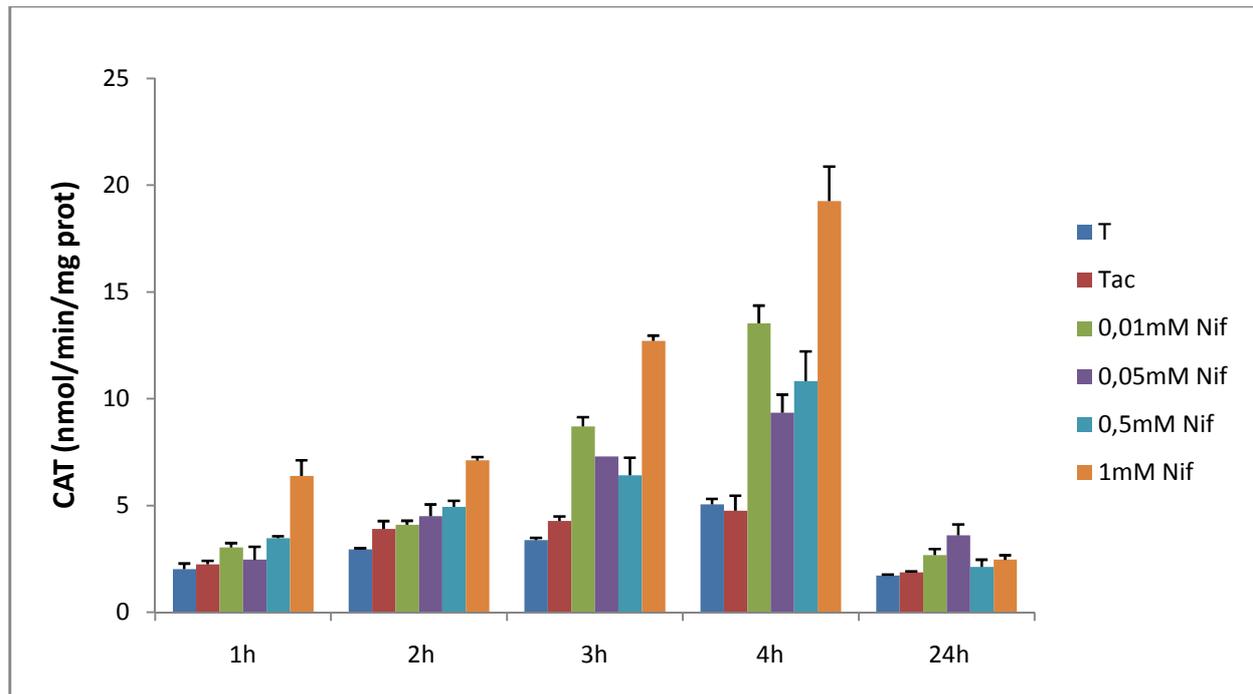


Figure 19. Evolution de l'activité catalase en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez *Saccharomyces cerevisiae* et en fonction du temps.

La figure (19) est représentative de l'évolution de l'activité catalase pour les cellules de levures témoins et traitées par les concentrations croissantes de Nifedipine en fonction du temps. Nous notons une stimulation très hautement significative ($***p \leq 0.000$) de l'activité enzymatique qui passe de $5,06 \pm 0,25$ nmol/min/mg prot chez le témoin à $19,26 \pm 1,61$ nmol/min/mg prot pour la concentration la plus élevée du xénobiotique après 4h de traitement.

8. Effet de la Nifedipine sur l'évolution de l'activité de Peroxidase

8.1. L'activité de l'ascorbate peroxidase (APX) :

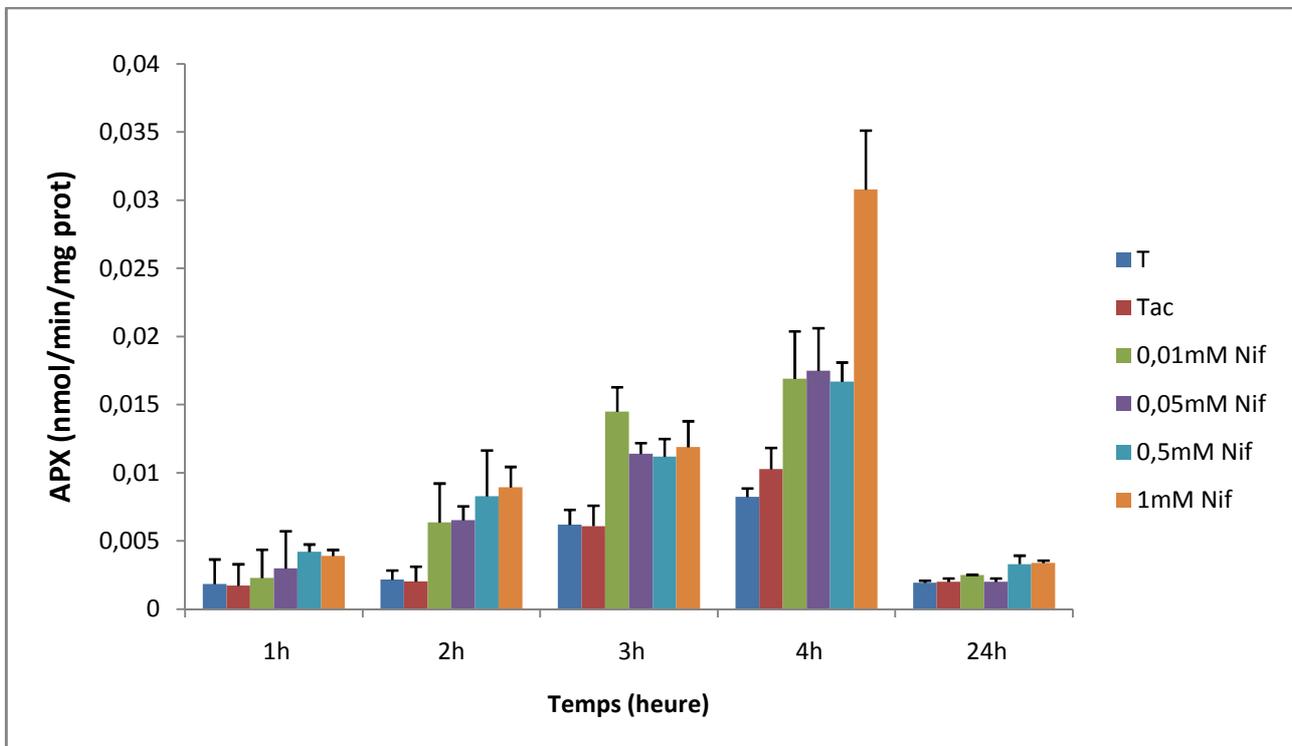


Figure 20. Evolution de l'activité Ascorbate-Peroxydase en présence des concentrations croissantes de Nifédipine, en fonction du temps chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (20) met en évidence l'évolution de l'activité APX en présence des concentrations croissantes de Nifédipine, en fonction du temps chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi nous constatons une stimulation très hautement significative (***) de l'activité APX. Mais après 24h de traitement une diminution de cette dernière est enregistrée.

8. 2. L'Activité Gaïacol Peroxydase (GPX) :

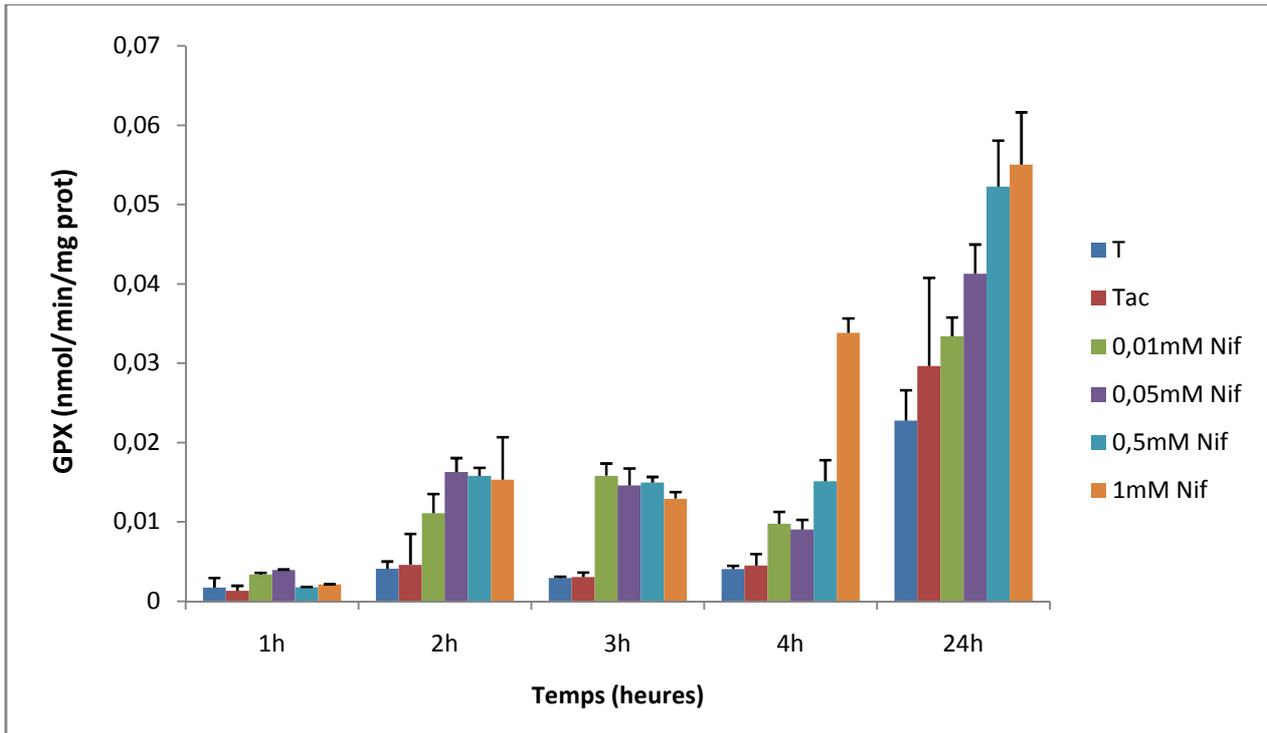


Figure 21. Evolution de l'activité Gaïacol-Peroxydases en fonction des concentrations croissantes de Nifédipine et du temps chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (21) est représentative de l'évaluation de l'activité GPX en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifedipine. Dès 2h de traitement, nous observons une stimulation hautement significative ($***p \leq 0,001$) de l'activité enzymatique GPX pour toutes les concentrations testées par rapport aux témoins. Effectivement, après 24h de traitement, l'activité GPX est de l'ordre de $0,055 \pm 0,0065$ nmol/min/mg prot alors que chez le témoin elle ne dépasse pas les $0,0227 \pm 0,0038$ nmol/min/mg prot.

9. Effet de la Nifedipine sur l'évolution de l'activité de la Superoxyde Dismutase

La Figure (22) ci-dessous, est représentative de l'évolution, en fonction du temps, des activités des Mn SOD, Cu/Zn SOD et la SODt sur les cellules témoins et traitées par la Nifedipine.

Nous constatons une stimulation très hautement significative (***) ($p=0,000$) des différentes SODs exprimée par l'augmentation de l'activité de la SODt (figure 26 a). Cependant cette stimulation se stabilise après 24h de traitement chez la MnSOD (figure 26 b) au même niveau que les témoins. Alors que l'activité Cu/Zn SOD (figure 26 c) n'augmente qu'à partir de la deuxième heure de traitement.

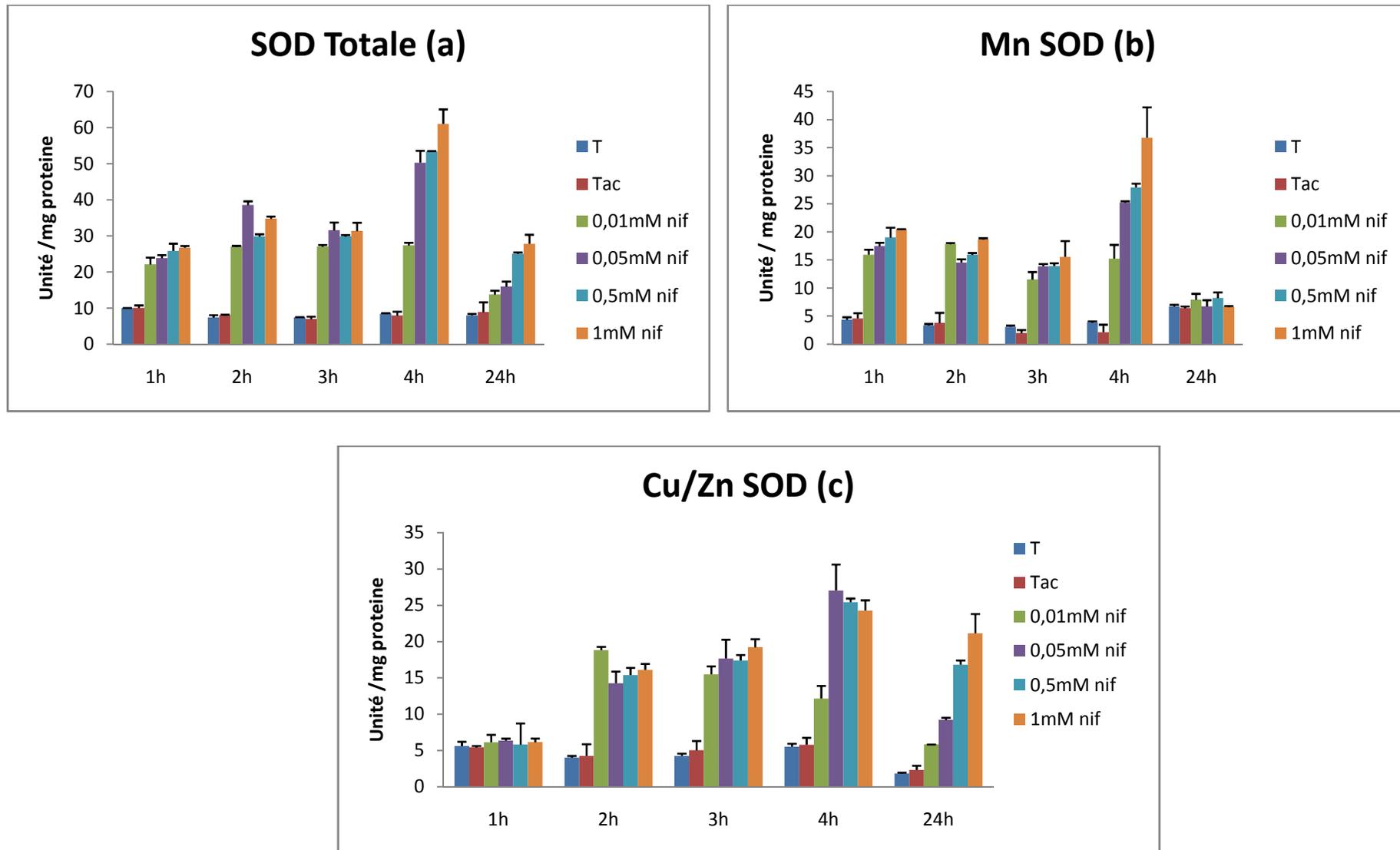


Figure 22 (a,b,c). L'influence des concentrations croissantes de la Nifedipine sur l'activité des différentes SODs (Mn SOD, Cu/Zn SOD et SODt) en fonction du temps chez *Saccharomyces cerevisiae*.

10. Evolution de l'activité de la NADPH Cytochrome P450 Réductase

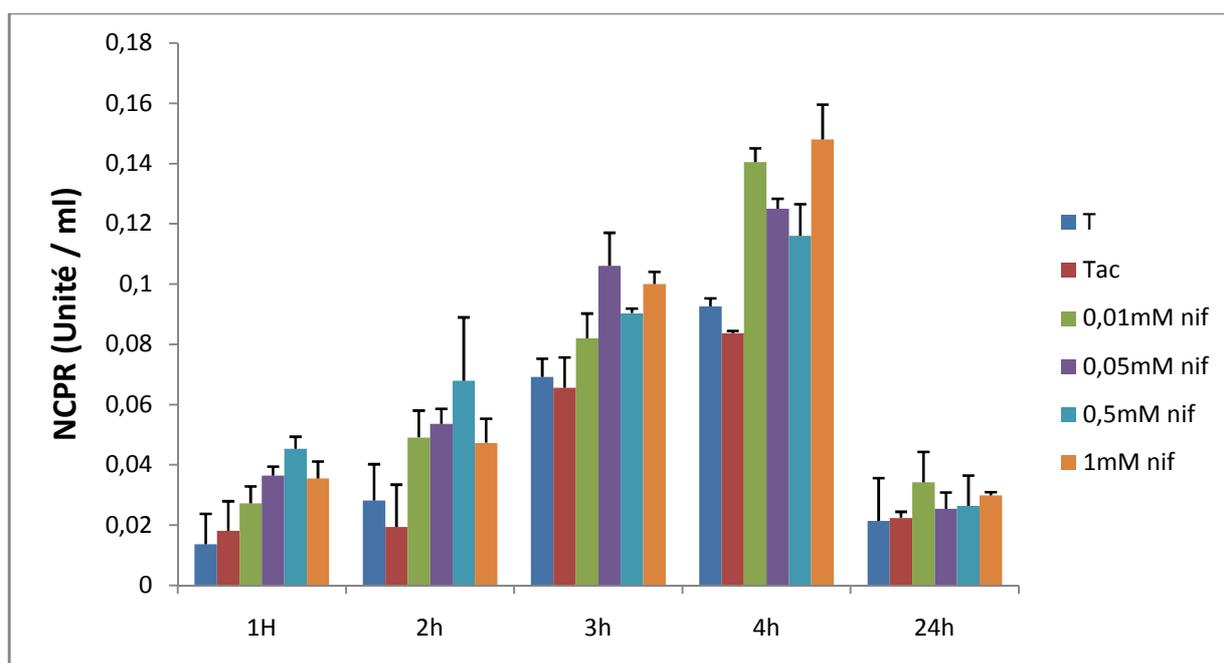


Figure 23. Evolution de l'activité de la NADPH Cytochrome P450 réductase en fonction du temps et en présence des différentes concentrations de Nifédipine chez *Saccharomyces cerevisiae*

La figure (23) représente l'effet des concentrations croissantes de l'antagoniste calcique en fonction du temps sur l'activité NCPR. Ainsi nous constatons une augmentation très hautement significative de cette activité pour le facteur temps ($***P = 0,000$), significative pour le facteur concentration ($*P=0,033$) et non significative pour l'interaction (concentration temps) ($p=0,474$).

Nous constatons également que l'activité NCPR atteint son apogée après 4h de traitement pour la plus forte concentration de Nifedipine ($0,148 \pm 0,0115$ U/ml alors qu'elle n'était que $0,0837 \pm 0,00069$ pour le témoin). Cependant après 24h de traitement, nous remarquons une diminution de l'activité NCPR.

11. Effet de la Nifedipine sur l'évolution de l'Activité du GST

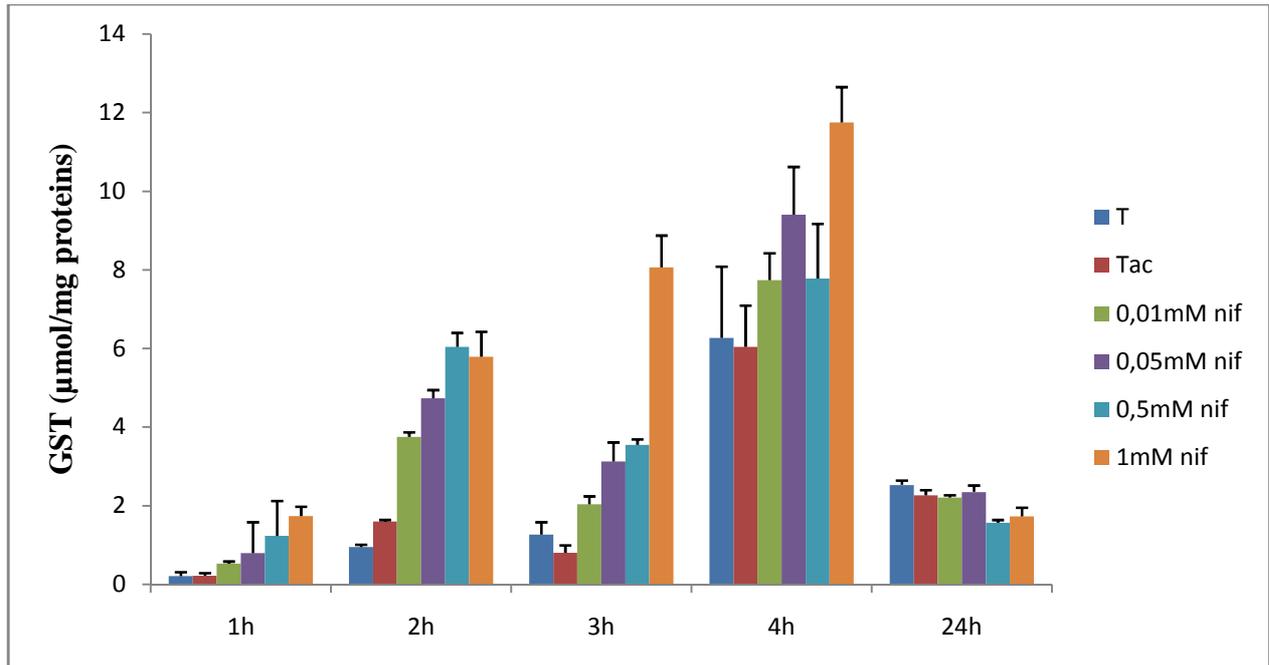


Figure 24. Evolution de l'activité Glutathion S transférase en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (24), qui représente l'évolution en fonction du temps de l'activité GST chez les levures témoins et traitées par la Nifedipine, indique clairement une stimulation très hautement significative ($***p \leq 0.000$) de l'activité GST. Cette augmentation est à son maximum après 4h de traitement, passant de $6,27 \pm 1,81$ µmol/mg protéine chez le témoin à $11,75 \pm 0,89$ µmol/mg protéine chez les traitées par la concentration la plus élevée de Nifedipine. Celle-ci diminue nettement, tout en restant équivalente à celle des témoins, après 24h de traitement.

12. Effet de la Nifedipine sur l'évolution du taux GSH

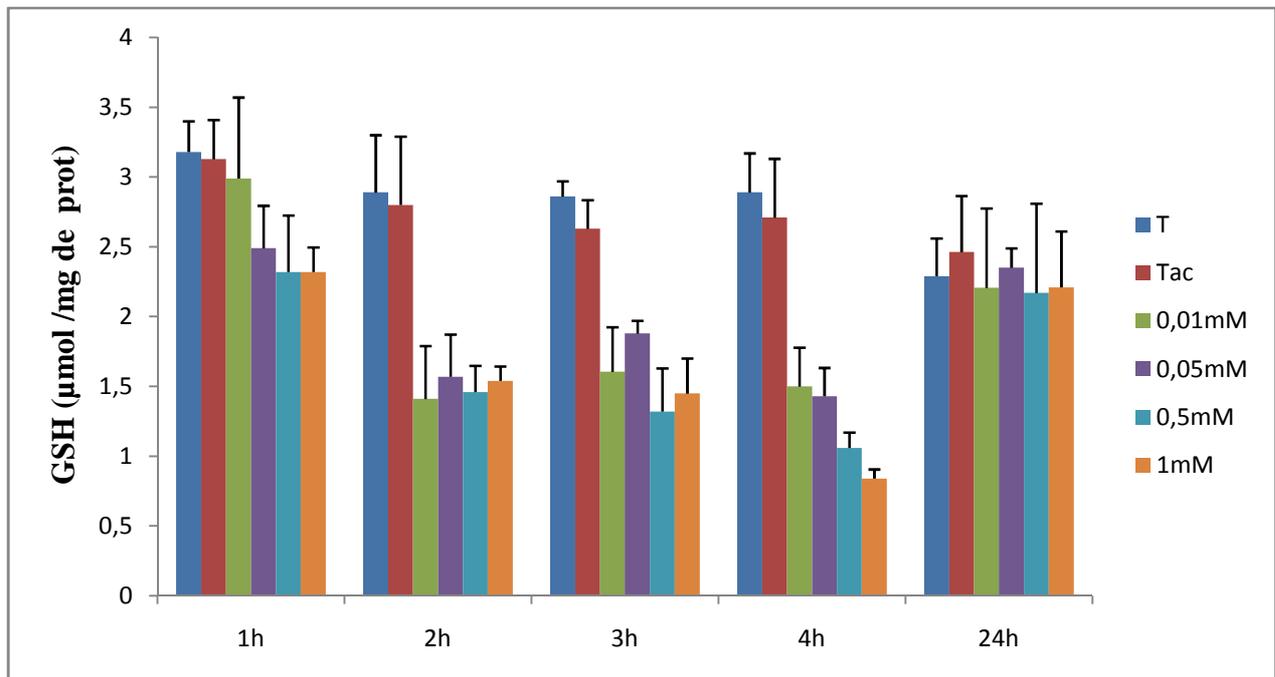


Figure 25. Evolution du taux de GSH en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (25) qui illustre l'évolution du taux de GSH en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, met en évidence une diminution significative ($*p \leq 0,05$) du taux de GSH en présence des différentes concentrations de Nifedipine. Cette diminution est plus prononcée après 4h de traitement où le taux passe de $2,89 \pm 0,28 \mu\text{mol/mg}$ de protéine chez le témoin à $0,84 \pm 0,06 \mu\text{mol/mg}$ de protéine chez les cellules traitées par une concentration de 1mM Nifedipine. Cependant le taux de GSH tend à se stabiliser après 24h de traitement.

13. Effet de la Nifedipine sur l'évolution du taux des TBARS :

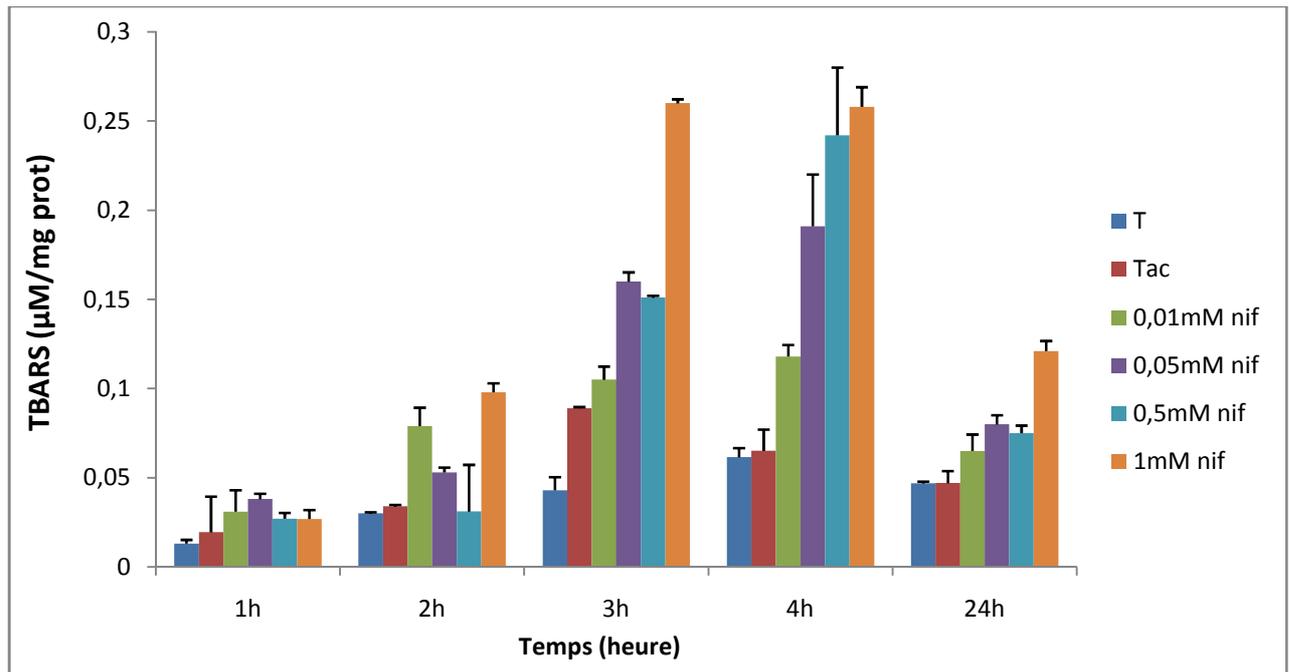


Figure 26. Evolution du taux des TBARS en fonction du temps et en présence des concentrations croissantes de Nifédipine chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (26) illustre les effets de la Nifedipine à différentes concentrations sur le taux des TBARS en fonction du temps chez *Saccharomyces cerevisiae*. Nos résultats montrent qu'en présence de concentrations croissantes du xénobiotique, le taux des TBARS tend à augmenter de manière hautement significative (** $P \leq 0,007$) et ce pour tous les temps de traitement. En effet, après 4 h de traitement cette augmentation qui n'était que de $0,0615 \pm 0,0191$ µM/mg protéine chez le témoin, atteint les $0,258 \pm 0,011$ µM/mg protéine chez les levures traitées par la plus forte concentration de l'antagoniste calcique.

14. Influence de la Nifedipine sur l'état Redox cellulaire

14.1. Effet sur les radicaux libres (ROMs)

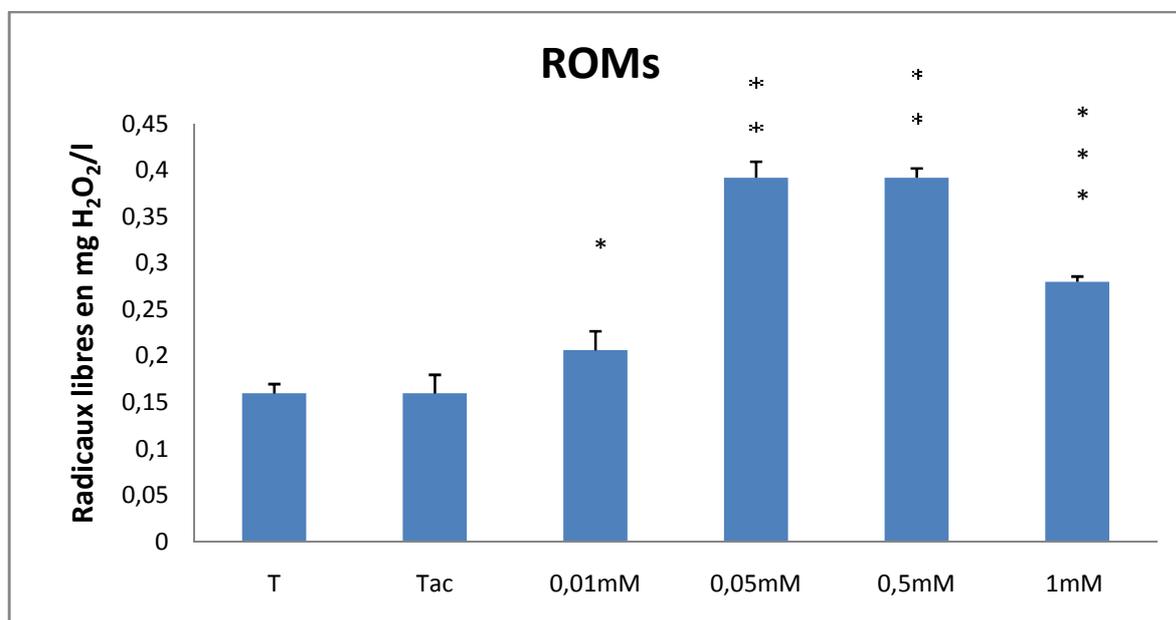


Figure 27. Effet de la Nifedipine sur la production des ROMs après 3h de traitement chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (27) illustre l'effet de la Nifedipine sur la production des ROMs après 3h de traitement chez *Saccharomyces cerevisiae*. Nous constatons clairement une augmentation significative à très hautement significative ($0,042 > P < 0,001$) des ROMs en présence des différentes concentrations de Nifedipine.

14.2. Effet sur le potentiel antioxydant biologique (BAPs)

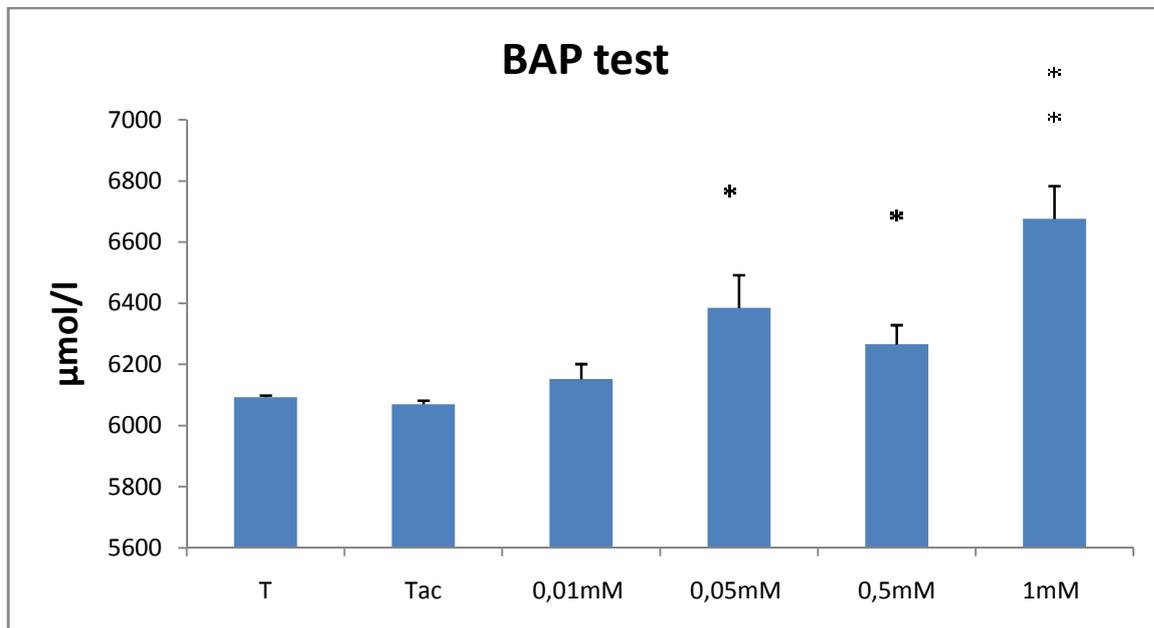


Figure 28. Effet de la Nifedipine sur le BAPs après 3h de traitement chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La figure (28) illustre l'effet de la Nifedipine sur l'augmentation du BAPs après 3h de traitement par la Nifedipine chez les levures *Saccharomyces cerevisiae*. Nous remarquons une augmentation significative à hautement significative ($0.856 > P < 0.009$) des capacités réductrices des cellules traitées avec la Nifedipine, grâce aux différentes molécules antioxydantes cellulaires. Cette stimulation du potentiel antioxydant biologique atteint son maximum à la plus forte concentration de la DHP où le taux qui est de l'ordre de 6093 µmol/l chez le témoin et de 6070 chez le témoin acétone, augmente jusqu'à atteindre 6676 µmol/l chez les traitées avec cette concentration.

Chapitre IV
DISCUSSION

Chez tous les organismes vivants, il existe un équilibre fragile entre la production des espèces réactives de l'oxygène et leur élimination. Les cellules possèdent un ensemble, très complexe et très coordonné de systèmes de défense contre les ROS, à la fois enzymatiques incluant les oxygénases de la phase I de détoxification (le système des cytochromes P450), les enzymes antioxydantes (catalase, SOD, Peroxydases...), mais également non enzymatiques tels que le glutathion et l'acide ascorbique, qui agissent dans le but de protéger les constituants cellulaires et de maintenir un état redox stable.

La surproduction de ROS peut entraîner un débordement des défenses antioxydantes se traduisant par ce qu'on appelle le stress oxydatif, qui est, donc, un état caractérisé par un déséquilibre entre la production des prooxydants et la capacité antioxydante de l'organisme (systèmes antioxydants enzymatique et non enzymatique) en faveur des premiers (**Delattre et al., 2005 / Barouki, 2006 / Jenkins et al., 2007**). Ce débalancement est observé physiologiquement dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, etc. (**Beaudeau et Duran, 2011**). La perte de l'homéostasie dans la défense antioxydante peut entraîner de nombreux dommages, les radicaux libres pouvant réagir avec les macromolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN, provoquant leur dégradation. Par conséquent, l'évaluation du stress oxydatif peut être effectuée par le suivi de ses biomarqueurs spécifiques tels les produits d'oxydation des biomolécules (TBARS), les macromolécules cellulaires (lipides, protéines et glucides) et les principaux systèmes de défense cellulaires enzymatiques et non enzymatiques, en plus de la cinétique de croissance et le métabolisme respiratoire. Ces paramètres nous permettent d'apprécier de façon fiable la réponse des cellules vis-à-vis de concentrations croissantes de Nifedipine et d'expliquer les mécanismes d'action de cette molécule aux concentrations thérapeutiques et/ou toxiques.

Dans ce travail nous avons évalué l'effet de la Nifedipine, sur le stress oxydant. Cette antagoniste calcique est connu pour avoir à la fois un effet antioxydant (**Allanore et al., 2005 / Sugiura et al., 2008 / Sung et Choi, 2012**) mais aussi pro-oxydant (**Sirmagul et al., 2006 / Waghmare et al., 2011 / Morakinyo et al., 2011**). Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectif la mise en évidence du rôle potentiel joué par la Nifedipine sur la production de ROS chez des microorganismes choisis comme modèles biologiques alternatifs : la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour une première appréciation de l'effet d'un xénobiotique, le suivi de la cinétique de croissance est un excellent bioindicateur d'une éventuelle toxicité. En effet toute perturbation de la croissance (inhibition ou stimulation) reflète l'état du métabolisme cellulaire. Plusieurs travaux ont mis l'accent sur le rôle de la croissance cellulaire dans l'appréciation et le screening de divers xénobiotiques. Ainsi, **Azzouz et al., (2011)**, **Bouaricha et al., (2012)**, ou encore **Saib et al., (2014)**, ont démontré un lien direct entre l'effet d'un xénobiotique sur les activités métaboliques d'un modèle cellulaire alternatif *Paramecium sp* et sa cinétique de croissance. En effet le premier paramètre affecté semble être la croissance cellulaire. Nous l'avons confirmé dans ce travail, **puisque nous avons mis en évidence une inhibition dose-dépendante de la prolifération des cellules traitées par la Nifedipine**. Des résultats similaires ont été observés avec les antagonistes calciques sur des culture non-myocytes de rats nouveau-nés (**Wang et al, 1997**), des cellules aortiques (**Herembert et al., 1995**), et des muscles vasculaires lisses (CMVL). Cet effet biologique de la Nifedipine peut être une option thérapeutique contre l'épaississement des vaisseaux sanguin chez les sujets hypertendus comme le suggèrent **Hirata et al., (2000)**, **Wu et al., (2009)**, ou encore **Clunn et al., (2010)**. Cependant **Hotchkiss et al., (2014)** ont trouvé que cet effet inhibiteur de la Nifedipine sur la prolifération des cellules souches cardiaques est à l'origine de l'inefficacité des thérapies à base de cellules utilisée pour la réparation du myocarde.

Cette action antiproliférative des antagonistes calciques peut être expliquée par le fait que ces derniers soient à l'origine d'une réduction de la synthèse de l'ADN et d'une altération du cycle cellulaire au niveau de la transition de la phase G1 vers la phase S (**Sung et Choi, 2012**). En effet, le cycle de division cellulaire est constitué de plusieurs étapes hautement régulées et synchronisées, où les protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK) jouent un rôle prépondérant dans le déclenchement, le déroulement et le couplage des différentes phases de ce cycle (**Meijer, 2003 / Morgan et David, 2007 / Satyanarayana1 et Kaldis, 2009**).

La Nifedipine active le gène P21^(Waf1/Cip1), un inhibiteur de la CDK qui joue un rôle crucial dans l'arrêt de la croissance cellulaire en réponse aux différents stimuli de stress lorsque les cellules sont exposées à des agents pouvant endommager l'ADN (**Coqueret, 2003 / Rodriguez et Meuth, 2006**). L'expression de ces gènes est étroitement contrôlée par la protéine de suppression tumorale p53 (**Gartel et Radhakrishnan, 2005**).

Cette protéine fonctionne comme un régulateur du cycle cellulaire en s'associant aux complexes cycline-CDK1 (phase M), cycline-CDK2 (transition G1/S, phase S et G2) et cycline-CDK4 et cycline-CDK 6 (phase G1) inhibant leur activité kinase, ce qui provoque un arrêt de la progression du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S (**Gartel et Radhakrishnan, 2005**). La surexpression de la protéine P21^{Waf1/Cip1} est dépendante de l'activation simultanée du facteur de transcription C/EBP- α (responsable de l'activation de l'expression du gène P21^{Waf1/Cip1}) et du récepteur glucocorticoïde (CR) (**Rudiger et al, 2002 / Ziesche et al, 2004**).

De plus, il est maintenant admis que la Nifedipine active également l'AMPK, une protéine kinase activée par le système AMP qui fonctionne comme un suppresseur de la prolifération cellulaire aussi bien chez les cellules normales que tumorales (**Shackelford et Shaw, 2009 / Kim et Choi, 2010**). Cette sérine-thréonine kinase ubiquitaire puisqu'on la retrouve aussi bien **chez l'Homme que chez les levures** agit comme un senseur métabolique chez les cellules eucaryotes, assurant l'homéostasie énergétique cellulaire en contrôlant l'activité de certaines enzymes et l'expression de certains gènes impliqués majoritairement dans le métabolisme énergétique (**Foretz et al., 2005/ Hardie et al., 2012**).

L'activité de l'AMPK est modulée de façon allostérique par l'AMP (stimulation) et l'ATP (inhibition) de manière compétitive. Ainsi lorsque la balance énergétique stable (caractérisée par un rapport des concentrations [ATP/ADP] égale à un ratio de 10/1), est perturbée par un facteur environnemental, un stress énergétique s'installe circonscrit par une chute de la production d'ATP ce qui va provoquer une modification automatique des rapports ATP/ADP et ATP/AMP via l'adénylate kinase en faveur du dernier. C'est l'augmentation du rapport AMP/ATP qui détermine l'activation de l'AMPK en réponse aux épisodes du stress énergétique. Une fois activé, l'AMPK stimule les voies cataboliques impliquées dans la synthèse d'ATP (oxydation des acides gras, glycolyse) et inhibe celles anaboliques consommatrices d'ATP (synthèse des protéines, des acides gras) permettant l'ajustement précis des besoins et disponibilités énergétiques cellulaires (**Foretz et al., 2006/ Hardie, 2011**).

Cependant, l'activation de cette kinase requiert une phosphorylation du résidu Thréonine (Thr¹⁷²) localisée dans la boucle d'activation du domaine catalytique de la sous unité α , par le biais de deux protéines, la protéine kinase CaMKK β (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein

kinase kinase β) dont le mécanisme d'activation est dépendant exclusivement de l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} (Hurley *et al.*, 2005 / Hawley *et al.*, 2005 / woods *et al.*, 2005), en plus de la protéine kinase suppresseur de tumeur LKB1 qui est constamment active dans les cellules (Woods *et al.*, 2003 / Shaw *et al.*, 2004). La phosphorylation et l'activation de l'AMPK par la LKB1 nécessite donc une augmentation de l'AMP qui va se fixer au complexe AMPK modifiant sa structure (changements de conformation de la sous-unité catalytique α) permettant l'accessibilité au site actif Thr¹⁷² et donc sa phosphorylation par LKB1 (Hawley *et al.*, 1995 / Neumann *et al.*, 2007). La liaison AMP-AMPK protège également l'AMPK d'une éventuelle déphosphorylation par les phosphatases. **Et c'est par l'activation de cette voie LKB1-AMPK que la Nifedipine inhibe la prolifération cellulaire (Sung et Choi, 2012).**

Le pourcentage de réponse que nous avons calculé ne fait que confirmer cette inhibition de la croissance cellulaire après traitement par la Nifedipine, puisque toutes ses valeurs sont positives.

Cet effet sur la cinétique de croissance nous a incité à nous intéresser au métabolisme cellulaire en général et aux mécanismes de défense antiradicalaires et antioxydants des levures. En effet, toute variation du métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*, rend compte d'une éventuelle toxicité sachant que les ROS et les entités radicalaires ont pour cible cellulaire les macromolécules telles les protéines, les lipides, ou encore les glucides et les acides nucléiques. La perturbation du taux de ces macromolécules est considéré comme un biomarqueur précoce permettant la mise en évidence d'un état de stress chez les organismes vivants (Mohammadkhani et Heidari, 2008 / Djekoun, 2012).

Ainsi nous avons constaté que l'addition de Nifedipine au milieu induisait une stimulation du taux des protéines totales. Ces résultats sont en accord avec ceux de Benbouzid (2012) et Boulaassel (2014) qui ont respectivement mis en évidence une stimulation du taux de protéines totales chez *Paramecium sp* en présence d'agents thérapeutiques de synthèse et des AINS. Cette augmentation du taux de protéines totales est due à l'induction du pool d'enzymes impliquées dans la métabolisation/détoxification telles que les Monoxygénases, GST, Catalase, SOD, mais également des protéines impliquées dans la défense cellulaire contre le stress telles que les CKI, les inhibiteurs de la CDK, l'AMPK et certains facteurs de transcriptions telles que YAP1 entre autres.

Nous avons également mis en évidence une diminution du taux des sucres totaux en présence de Nifedipine, ce qui est en accord avec les travaux de Djekoun *et al.*, (2010) qui ont étudié l'effet d'un traitement combiné de (Cd²⁺ / Ca²⁺ / Zn²⁺) sur *Saccharomyces cerevisiae*. Cette diminution du taux des sucres totaux peut être expliquée par l'activation de l'AMPK qui va stimuler les voies cataboliques et inhiber les voies anaboliques (Foretz *et al.*, 2006), mais aussi par leur hydrolyse afin de produire certaines molécules clés dans la défense antioxydantes cellulaires telles que la NADPH et qui seront utilisés dans diverses réactions réductrices comme celle impliquant le système CYP450.

Concernant le taux des lipides totaux, nous avons mis en évidence une diminution de ces macromolécules. Ce résultat est en accord avec les travaux de Benbouzid (2012) et Amamra *et al.*, (2015)_(a). Cette diminution des taux des lipides totaux résulte probablement de leur peroxydation par les ROS et dont la conséquence directe est l'augmentation du taux de TBARS que nous avons également confirmé dans notre travail. En effet selon Chen *et al.*, (2005) l'accumulation des produits de la peroxydation lipidique constitue le marqueur biochimique le plus commun du stress oxydatif. Nos résultats concernant l'augmentation du taux des TBARS, sont en accord avec ceux de Morakinyo *et al.*, (2010/ 2011) et Waghmare *et al.*, (2011) qui ont testé la Nifedipine sur les spermatozoïdes de rats, ainsi que ceux de Sirmagul *et al.*, (2006) sur des hépatocytes de rats de type « septic shock model ». Cependant, les travaux de Sobal *et al.*, (2001) et Ray *et al.*, (2012) ont montré que le traitement de rats avec la Nifédipine, semble plutôt avoir un effet antioxydant, qui serait à l'origine de la diminution des dommages oxydatifs au niveau des membranes cellulaires suite à la peroxydation lipidique.

Cet effet contradictoire de la Nifedipine nous a enhardi à investiguer vers le métabolisme vital pour la cellule et qui fait appel aux différentes macromolécules cellulaires que nous avons citées précédemment, en l'occurrence, le métabolisme respiratoire.

En effet, la respiration cellulaire, par mesure de l'oxygène dissous dans le milieu, est un excellent indicateur du fonctionnement du système respiratoire mitochondrial et un bon outil d'évaluation de la cytotoxicité (Haubenstricker *et al.*, 1990). Ainsi un des mécanismes majeurs de la toxicité médicamenteuse est l'altération des fonctions mitochondriales. Plusieurs travaux ont mis en évidence une perturbation de la consommation d'O₂ induite par des xénobiotiques chez des cellules en culture telles que la paramécie ou encore

Saccharomyces cerevisiae (Boulassel *et al.*, 2013/ Sbartai, 2009/ Djekoun, 2012/ Amamra *et al.*, 2015_(b)). Ces auteurs ont conclu que cette perturbation de la fonction respiratoire pourrait être liée à la fois à un effet toxique direct sur la mitochondrie mais également à l'induction des enzymes de la métabolisation particulièrement ceux de la phase I comme le système monooxygénase à CYP450 ou alors ceux de la détoxification telles que les catalases et les peroxydases. Nos résultats sont en accord avec ces travaux puisque **dans notre travail, nous avons mis en évidence une inhibition de la consommation d'oxygène chez les cellules traitées avec la Nifédipine.**

En raison de l'étroite relation entre la structure d'une molécule et son activité, il est possible que cet effet inhibiteur soit du aux propriétés antagonistes calciques de la Nifédipine (Hugtenburg *et al.*, 1990). En effet l'ion Ca^{2+} joue un rôle clé dans la régulation des fonctions mitochondriales, agissant à divers niveaux de cette organite (Brookes *et al.*, 2004), mais aussi dans la transmission des signaux transmitochondriaux (Sedova *et al.*, 2006). Outre la modulation de la bêta oxydation des acides gras, le calcium module l'activité de différentes enzymes importantes pour le fonctionnement mitochondrial, stimulant par exemple le cycle de Krebs en régulant le cycle de l'acide citrique via l'activation d'enzymes indispensables à son fonctionnement telles que la pyruvate déshydrogénase, la NAD⁺-isocitrate deshydrogénase et la 2-cétoglutarate déshydrogénase, conduisant à une augmentation de la concentration en NADH qui sera utilisé par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP, modulant de ce fait les ratios du potentiel redox du NAD⁺/NADH et ADP/ATP (Denton et McCormack, 1985 /1990 /1993 / Pepe, 2000/ Traaseth *et al.*, 2004). Les augmentations de calcium mitochondrial régulent aussi des composants directs du système de phosphorylation oxydative tels que l'ATP synthase (Territo *et al.*, 2000), l'Adenosine Nucleotide Translocase (ANT), une protéine mitochondriale qui facilite l'échange de l'ADP et de l'ATP à travers la membrane mitochondriale interne (Moreno-Sanchez *et al.*, 1995 / Chevrollier *et al.*, 2011), en plus des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale tel que le complexe III (Murphy *et al.*, 1990). Les ions Ca^{2+} stimulent également l'activation de plusieurs kinases et déshydrogénases et régulent le fonctionnement de différents transporteurs de la membrane interne mitochondriale (Satrustegui *et al.*, 2007 / Desquiret, 2008). Tous ces phénomènes vont induire une augmentation de la fréquence respiratoire, l'extrusion des protons H^+ , et la production d'ATP (Patergnani *et al.*, 2011).

Les xénobiotiques peuvent avoir un effet toxique sur les mitochondries en interférant avec les différentes fonctions mitochondriales. Ainsi, **Thompson *et al.*, (1996)**, ont mis en évidence un effet inhibiteur de la Dihydropyridine sur la synthèse de l'ATP, quand à **Shanish *et al.*, (2010)**, ils ont trouvé que la Nifedipine inhibait l'activité du complexe I mitochondrial confirmant ainsi nos résultats sur l'impact de cette molécule sur la respiration cellulaire. De plus, la Nifedipine induit une perte de la capacité de la mitochondrie à stocker le calcium (**Brink, 2008**). **Giorgi et al (2008)** suggèrent que toute augmentation prolongée de la concentration en Ca^{2+} mitochondrial conduit à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP), un événement critique entraînant la mort cellulaire par apoptose. Plusieurs travaux mettent en avant l'effet paradoxal de la Nifedipine. Cette molécule est dotée à la fois d'un effet inhibiteur (**Rabkin et Kong, 2000 / Schmidt-Mende *et al.*, 2006 / Sayeda *et al.*, 2013/ Avanzato *et al.*, 2014**) et stimulateur (**DeBlois *et al.*, 1997 / Stead *et al.*, 2000**) sur la mort cellulaire programmée. Quand **Daschil et Humpel, (2014)** ne lui ont trouvés aucune influence sur l'activité caspase-3.

Le processus de métabolisation des xénobiotiques est particulièrement performant comme système de détoxification impliquant une activation des systèmes enzymatiques de fonctionnalisation (NADPH cytochrome P450 réductase, cytochrome P450, etc.) et de conjugaison (glutathion-S-transférases, le composé endogène GSH) (**Bouraoui, 2009**). De ce fait, nous nous sommes intéressés à ces réponses biochimiques en tant que biomarqueurs de toxicité.

Les cytochromes P450 (CYP450) et la NADPH-cytochrome P450 réductase (NCPR) sont les principaux acteurs du métabolisme des composés endogènes et différents xénobiotiques, médicaments inclus (**Guengerich, 2008/ Zanger et Schwab, 2013 /Rasmussen et Zamaratskaia, 2014**).

Dans notre travail nous avons mis en évidence une stimulation de l'activité NCPR en présence de Nifédipine. Ces résultats sont en accords avec ceux de **Dimova *et al.*, (1994), Koleva et Dimova, (2000 et 2001)** qui ont mis en évidence une augmentation de l'activité de cette flavoprotéine chez les rats et des myocytes en culture traités par la Nifedipine. **Kastelova *et al.*, (2000), Drocourt *et al.*, (2001)** ont mis en lumière l'implication de la Nifedipine dans la stimulation de l'activité et l'expression des CYP450 via le récepteur nucléaire pregnane X receptor (PXR), dont la fonction principale est l'expression des gènes

impliqués dans les phénomènes de détoxification cellulaire (**Ekins et Erickson, 2000 / Fromenty, 2010**).

L'induction de ce partenaire redox de la CYP450 (NCPR) par la Nifedipine est due au rôle central joué par ce complexe dans les activités enzymatiques de la phase I de la biotransformation, dont la fonction primaire est de catalyser le métabolisme oxydatif des xénobiotiques en assurant le transport d'électrons vers tous les CYP450 eucaryotes (**Zanger et al., 2008**).

La NCPR est une protéine multidomaines, formée de deux domaines catalytiques comprenant les cofacteurs flavines adénine dinucléotide (FAD) et flavine mononucléotide (FMN) reliés par un domaine de connexion, en plus d'un domaine de liaison NADPH (**Xia et al., 2011**). Grâce aux propriétés redox de ses deux groupements prosthétiques, la NCPR est capable de scinder le flux diélectronique du NADPH en deux transferts monoélectroniques vers les CYP450, dans lequel le composant oxydoréducteur est représenté par la FAD qui accepte les électrons de la NADPH, les transfère de façon interne vers le domaine FMN qui assurera à son tour le transfert externe des électrons vers le CYP450 (**Aigrain, 2010**). Ce processus est essentiel au fonctionnement des CYP450 (**Guengerich, 2001 / 2002/ 2013**) et va leur permettre d'utiliser les deux électrons de NADPH afin de cliver par réduction l'oxygène moléculaire, oxydant ainsi le substrat, via le greffage d'un atome d'oxygène. Le second atome d'oxygène mène à la formation d'eau (**Katzung, 2004**).

Après la formation du site réactif, la phase II entre en scène. Elle comprend les réactions de conjugaison au niveau du groupement greffé. Parmi ces réactions de conjugaison, on dénote la glucuronidation, la sulfation, l'acétylation, la méthylation, ainsi que des réactions de conjugaison aux acides aminés et au glutathion (GSH) (**Allain, 2000**).

Quantitativement, la conjugaison au GSH, métabolisée par la glutathion-S-transférase (GST), est la principale réaction de phase II chez de nombreuses espèces (**Sheehan et al., 2001**).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'activité GST après traitement par la Nifedipine. Ce résultat est en accord avec celui de (**Dimova et al., (1994)** et **Koleva et Dimova, (2000 / 2001)**). Cette augmentation de l'activité GST est simultanée à **une diminution du taux de GSH**. Néanmoins l'influence de la Nifedipine sur le taux de GSH est assez contradictoire. Ainsi, si **Morakinyo et al., (2011)** ont

mis en évidence une diminution du taux de GSH chez les spermatozoïdes de rats après traitement par la Nifedipine, **Yang and Hill, (2001)** et **Ray et al, (2012)** ont trouvé une augmentation de ce tripeptide au niveau des hépatocytes de rat après traitement par la Nifedipine, contrairement aux travaux de **Vitcheva et al.,(2009)** qui ont démontré le fait que la Nifedipine seule n'avait aucune influence notable sur ce paramètre toujours au niveau des hépatocytes de rat, cependant un traitement combiné Nifedipine-Cocaïne induisait une augmentation du taux GSH.

La diminution du taux de GSH accompagnée d'une induction de l'activité GST rendent compte du rôle important joué par ces deux paramètres dans la détoxification et l'élimination des composés électrophiles toxiques. Le GSH sert aussi de cofacteur pour plusieurs autres enzymes impliquées dans la défense antioxydante que sont les glutathion peroxydases, glutathion réductase, en plus de la glutathion S-transférase. Sa capacité biologique oxydoreductrice est principalement liée au groupement sulfhydryle libre du résidu de cystéine qui lui confère ses propriétés redox et nucléophiles uniques (**Pocsi et al., 2004**). Cependant en interceptant un radical hydroxyle, le glutathion génère un radical superoxyde qui doit être pris en charge par une SOD (**Barillet, 2007 / Zerriri, 2014**). De plus, outre son rôle dans la défense contre les ROS, le GSH participe à la régulation du métabolisme cellulaire où il prend part à des réactions de synthèse de protéines et d'acides nucléiques et peut également servir de source de soufre et d'azote pour la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* (**Penninckx, 2002**). Ceci a été confirmé par **Grant et al., (1996)** sur des mutants de levures dépourvues du gène GSH1, incapables de croître en l'absence de GSH et qui sont plus sensibles au stress oxydatif provoqué par le traitement par H₂O₂ et divers hydroperoxydes d'alkyle.

Concernant les glutathion S-transférases (GSTs), une famille multigène d'isoenzymes, elles sont impliquées dans la détoxification de certains produits du stress oxydatif et des électrophiles qui peuvent réagir avec divers composants cellulaires conduisant à la réduction du stress oxydant et la peroxydation lipidique subséquente (**Todorova, 2007**). Ces GSTs peuvent efficacement réduire les peroxydes exogènes ou éliminer les lipides endogènes et les peroxydes d'acide gras (**Awasthi et al., 2004/ Garcera et al., 2006**).

Au cours de la métabolisation et plus précisément au cours de la phase I de fonctionnalisation, des ROS peuvent être générées par le système CYP450 (**Valko et al., 2007 / Dostalek et al., 2007/ 2008/ Cederbaum, 2013**), et afin de pallier à tout dommage que

causeraient ces espèces réactives d'oxygène, les cellules font appel aux différentes enzymes de défense contre le stress oxydatif.

L'une des premières lignes de défense est représentée par les métallo-enzymes superoxydes dismutases (SOD). La SOD cytosolique (SOD à cuivre et à zinc : Cu/Zn SOD) et la SOD mitochondriale (SOD à manganèse : Mn SOD) sont responsables de la détoxification de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en le convertissant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elles sont indispensables pour le maintien de la vie des organismes en protégeant les cellules du stress oxydant et des dommages structurels des radicaux libres au niveau des mitochondries, des membranes, de l'ADN, etc.

Nos résultats ont mis en évidence une forte stimulation des activités des différentes SODs (Cu/Zn SOD, Mn SOD et la SOD totale) chez les cellules traitées par les concentrations croissantes de Nifedipine.

Cette induction des SODs par la Nifedipine a déjà été rapportée par **Fukuo *et al.*, (2002 / 2003)**, **Passacquale *et al.*, (2008)** et **Iwai *et al.*, (2011)**, qui expliquent cette induction par le fait que la Nifedipine influence indirectement l'expression des gènes SODs.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence l'induction de la MnSOD (mitochondriale) dès la première heure de traitement. En effet, la formation des ROS a lieu dans un premier temps au niveau des mitochondries, ce qui est assez logique vu que cet organite est le siège principal de la formation des radicaux libres au niveau de la chaîne respiratoire.

La dismutation des radicaux libres oxygénés par la SOD produit du peroxyde d'hydrogène, qui est plus stable que l'anion superoxyde mais qui reste potentiellement nocif. En présence de métaux tels que le Fe^{2+} , le peroxyde d'hydrogène est transformé, par la réaction de Fenton, en radical hydroxyle ($\bullet OH$) extrêmement réactif qui va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (**Lane, 2003 / Gardès-Albert et Jore, 2005**).

Le peroxyde d'hydrogène sera pris en charge par une deuxième ligne de défense, qui travaille de concert avec la première, représentée par les Catalases (CAT), les Peroxyrédoxines et les Peroxydases (GSH peroxidase, APX, GPX...), qui sont capables de convertir le H_2O_2 en eau. La Catalase, contrairement aux autres peroxydases, n'est pas substrat dépendante et ne produit pas de radicaux libres (**Deby et Deby-Dupont, 2009**)

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une induction de l'activité Catalase chez les cellules traitées. Cette enzyme, au même titre que la SOD est d'une grande importance pour la défense contre le stress oxydant. Cependant, **Morakinyo et al., (2011)** ont montré une diminution de l'activité CAT chez les spermatozoïdes de rats traités par la Nifedipine, les auteurs expliquent cette diminution par un fort stress oxydatif. **Sirmagul et al., (2006)** ont quant à eux, au contraire, trouvé que la Nifedipine n'avait aucun effet sur l'activité CAT chez des rats de type « rat septic shock model ».

Parallèlement, nous avons démontré, également, une augmentation des activités Peroxydases (APX et GPX). Certains auteurs ont rapportés que l'augmentation de l'activité peroxydases pouvait être une réponse à l'installation d'un stress oxydant. **Khaldi et al., (2009)**, par exemple ont trouvé une augmentation de l'activité APX chez les lichens *Ramalina farinacea* traitées par des engrais, le même résultat est observé par **Mediouni et al., (2009)** chez les feuilles de tomate (*Solanum lycopersicon*) traitées par le Cadmium et le cuivre. Nos résultats sont en accords avec ces derniers ainsi que ceux de **Misiewicz et al., (1997)** et **Meštrović et al., (2014)** qui ont démontré que la Nifedipine augmenter l'activités des peroxydases et plus précisément celles du glutathion peroxydase chez les granulocytes provenant de patients traités avec 30 mg de Nifedipine pour les premiers et chez les rats souffrant de torsion-détorsion des testicules pour les seconds, augmentant par ce fait l'activité antioxydante. Paradoxalement les résultats de **Wang et al., (2011)** chez les végétaux (radis rouge de chine) ont quand à eux mis en évidence une inhibition des activités Peroxydases suite à la perturbation de la signalisation calcique causée par la Nifedipine, parce que le systèmes de défense des plantes se fondent en partie sur une interaction « crosstalk » finement régulée entre le Calcium et le H₂O₂ et la Nifédipine inhibe l'expression du gradient de Calcium, induisant une diminution des activités peroxydases.

Nous constatons, d'après nos résultats, que la CAT est la première peroxydase à être sollicitée en réponse à un déséquilibre de la balance redox, puisque c'est l'une des enzymes majeures de détoxification des H₂O₂.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'état Redox cellulaire, un fragile équilibre entre la production des ROS et leur élimination, et qui est indispensable pour le maintien de la vie cellulaire, pour cela, nous avons procédé à la mesure de la production des métabolites réactifs d'oxygènes (ROMs) et du potentiel antioxydant biologique (BAPs).

Nos résultats ont démontré que la Nifedipine était à l'origine d'une augmentation des ROMs. Cette augmentation peut résulter de l'induction de l'activité des systèmes CYP450, l'une des source principale de formation ROS (Caro et Cederbaum, 2004/ Zangar *et al.*, 2004), mais aussi au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale considérée à juste titre comme le siège principal de la génération des ROS et qui fait suite à une inhibition de la respiration due à la présence de l'antagoniste calcique testé. D'un autre côté, l'augmentation de l'activité des Peroxydases substrat dépendantes peut également générer des radicaux libres (Deby et Deby-Dupont, 2009), ou encore le GSH (Zerriri, 2014).

Les travaux de Allanore *et al.*, (2004), Sugiura *et al.*, (2008) et Sung et Choi, (2012) ont mis en évidence un effet antioxydant de la Nifedipine particulièrement chez des organismes préalablement stressés. En revanche, les travaux de Santostasi *et al.*, (1991) ont montré que la toxicité de l'Anthracycline est exacerbée après traitement simultané avec la Nifedipine. Il en est de même concernant les travaux de Vitcheva *et al.*, (2009) **qui ont également mis l'accent sur la potentialisation de la toxicité** des D-amphétamines en présence de Nifedipine au niveau des hépatocytes de rats entraînant une diminution de la viabilité cellulaire et surtout une déplétion de plus de 80% du taux du GSH et une augmentation plus ou moins similaire de l'activité de la Lactate déshydrogénase (LDH), réfutant de ce fait sa capacité atténuante du stress oxydant. D'un autre côté, Cominacini *et al.*, (2003), qui ont testé l'activité antioxydante de différentes DHR (Lacidipine, Lercanidipine, Amlodipine, Nimodopine et Nifedipine), ont trouvé que la Nifédipine n'avait aucune influence notable sur la production des ROS, causée par des LDL oxydées par le Cu^{2+} , au niveau des cellules endothéliales aortiques bovines, de même que pour l'Amlodipine et la Nimodopine. Contrairement à la Lacidipine, et à moindre effet la Lercanidipine, qui avaient, quant à eux, un effet inhibiteur sur la formation des ROS.

Nos résultats ont également mis en évidence une augmentation du potentiel antioxydant biologique en présence de la Nifedipine. Ce résultat est en accord avec les travaux de Ghiadoni *et al.*, (2003) qui ont enregistré eux aussi une amélioration du potentiel antioxydant plasmatique des patients souffrant d'hypertension après traitement avec différents hypotenseurs dont la Nifedipine.

Cette action inductrice du BAPs, peut être expliquée par l'activation du facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor 2) qui existe chez la majorité des organismes métazoaires et qui joue un rôle important dans l'homéostasie redox et

dans la défense contre les électrophiles et les oxydants, en activant l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydant et en stimulant la production d'antioxydants (**Baird et Dinkova-Kostova, 2011 / Kovac et al., 2015**).

Ce facteur de transcription est responsable de la régulation de l'expression de plus de 90% des gènes antioxydants (environ 200 gènes) (**lisk et al., 2012 / Yang et al., 2013/ Zimmermann et al., 2015**). Parmi les gènes cibles de Nrf2, ceux codant pour : les enzymes de la phase II de la biotransformation (GST, UDP-glucuronyl transférase, NAD(P)H quinone oxidoreductase...), les enzymes et molécules de détoxification des ROS et de réduction de thiols (les peroxyredoxines, les SOD, CAT, GSH, la thioredoxine 1, la thioredoxine réductase 1, la glutathion réductase...), les transporteurs membranaires impliqués dans les phénomènes de résistances multiples aux drogues, les protéines chaperons du stress et les sous-unités du protéasome 26S (**Fourquet, 2008 / Kim et al, 2011/ Sirota et al, 2015**).

En effet selon **lisk et al., (2013)**, la Nifedipine active le Nrf2 des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales des rats Sprague-Dawley. Le processus par lequel la Dihydropyridine influence l'activation du Nrf2 reste néanmoins à éclaircir, bien que la structure de la molécule puisse avoir un rôle non négligeable sans lien avec son effet d'antagoniste calcique. En effet les auteurs ont testé l'influence de différents médicaments sur l'activation du Nrf2, dont les antagonistes calciques, particulièrement ceux de la classe des Dihydropyridines (Nifedipine et Amlodipine) et des Phenylalkylamines (Verapamil), et ont démontré que le Verapamil (antagoniste calcique) n'avait aucun effet sur l'activation du Nrf2 contrairement à la Nifedipine et l'Amlodipine.

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'augmentation de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) en présence de Nifedipine (**Berkels et al., 2001 / Zou et al., 2002 / Forstermann et Munzel, 2006**) parallèlement à l'activation du Nrf2 par le NO (**Dhakshinamoorthy, 2004 / Liu, 2007 / Um et al., 2011**), nous laissant suggérer que l'activation du Nrf2 par la Nifédipine s'effectuera probablement par l'augmentation du taux de NO. Elle peut aussi résulter de l'activation de l'AMPK par la Nifedipine. Les travaux de **Mo et al., (2014)** et **Zimmermann et al., (2015)** ont mis en lumière la diaphonie (crosstalk) entre les voies de signalisation AMPK et Nrf2, mettant l'accent sur le rôle joué par l'AMPK dans l'activation et l'amélioration de la signalisation Nrf2.

Il est à noter que *Saccharomyces cerevisiae* possède un transactivateur, jouant un rôle majeur dans la réponse et la tolérance au stress oxydatif et dans l'homéostasie Redox, l'homologue levurien du Nrf2, à savoir l'AP-1 transcription factor YAP1 (**Toone et Jones, 1999/ Ménager et al., 2009 / Li et al., 2010**).

Le suivi de l'état redox, des cellules, nous a permis de montrer que la production des ROS est contrebalancée par une induction du système antioxydant et ce dans le but de faire face à tout dommage cellulaire que peut causer l'installation de ce qu'on peut appeler un « stress oxydatif passif ».

Hypothèse

L'ensemble de nos résultats indique que dans les conditions de traitement utilisées dans ce travail, la Nifedipine était à l'origine du déclenchement d'un stress oxydatif passif (figure 29).

Tout d'abord, la Nifedipine en tant qu'inhibiteur calcique va bloquer l'entrée des ions Ca^{2+} provoquant une diminution de la concentration calcique cytosolique, en se fixant au niveau de la protéine Cch1 (homologue levurien des CCVD de type L), ce qui en découle une perturbation de toutes les fonctions modulées par le calcium et parmi eux la prolifération cellulaire.

Elle va ensuite traverser la membrane cellulaire. La présence de ce xénobiotique dans le cytosol va induire une cascade de réactions.

Dans un premier ordre, cette molécule sera prise en charge par le processus de métabolisation des xénobiotiques, qui est particulièrement performant comme système de détoxification. La Nifedipine va ainsi subir une biotransformation par le biais du système CYP450 (NADPH cytochrome P450 réductase, cytochrome P450, etc.) via le greffage d'un atome d'oxygène. Après la formation du site réactif, la phase de conjugaison intervient, par le biais de la glutathion S transférase qui va conjuguer le métabolite avec le glutathion, afin de favoriser son élimination.

Au cours de cette métabolisation et plus précisément au cours de la phase I de fonctionnalisation, des ROS peuvent être générées par le système CYP450. La formation de ces ROS est accrue par la surexpression du système CYP450 causée par la Nifedipine, conduisant à l'induction du système de défense antioxydant, afin de pallier à tout dommage que causeraient ces espèces réactives d'oxygène. L'une des premières lignes de défense est représentée par les superoxydes dismutases (SOD) responsables de la détoxification de l'anion superoxyde ($\text{O}_2\bullet^-$) en le convertissant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sera à son tour pris en charge par une deuxième ligne de défense, qui travaille en harmonie avec la première, représentée par les catalases et les peroxydases, qui vont le convertir en molécule d'eau.

Parallèlement, cet antagoniste calcique va aussi agir au niveau des mitochondries, perturbant leur bon fonctionnement à travers l'inhibition du métabolisme respiratoire cellulaire, dérégulant ainsi le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant à la génération des ROS. Une partie seulement de ces ROS seront prises en charge par les enzymes antioxydantes mitochondriales telles que les Mn SOD. Tandis que la majorité se retrouvera au niveau du cytosol, s'additionnant aux ROS formés par le système CYP450, provoquant ainsi un stress oxydatif. Ces ROS vont s'attaquer aux différents constituants cellulaires tels que les lipides, provoquant par conséquent leur peroxydation et conduisant à la formation des produits de lipoperoxydation à travers l'augmentation du taux des TBARS.

La Nifedipine active également l'AMPK, une protéine kinase qui fonctionne comme un suppresseur de la prolifération cellulaire en cas de stress énergétique et qui va inhiber les voies anaboliques consommatrices d'ATP et stimuler les voies cataboliques productrices d'ATP et par la suite, déclencher l'hydrolyse des sucres totaux d'où leur diminution.

Elle va aussi inhiber l'activité des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui sont responsables du déclenchement, du déroulement et du couplage des différentes phases du cycle de croissance expliquant par ailleurs son effet antiprolifératif.

D'une autre part cette Dihydropyridine va activer les facteurs de transcription tels que YAP1 qui vont se fixer sur le brin d'ADN, induisant de façon spécifique la transcription génétique d'éléments de réponse antioxydant. Cette action se traduira par une augmentation des capacités antioxydantes cellulaires à travers l'augmentation des BAPs, rééquilibrant par ce fait la balance Redox cellulaire et conduisant à la diminution de ce stress oxydant.

Ce contrebalancement entre la génération des ROS (ROMs) et leur élimination (système antioxydant global) est à l'origine de la nature passive du stress oxydant induit par la Nifedipine.

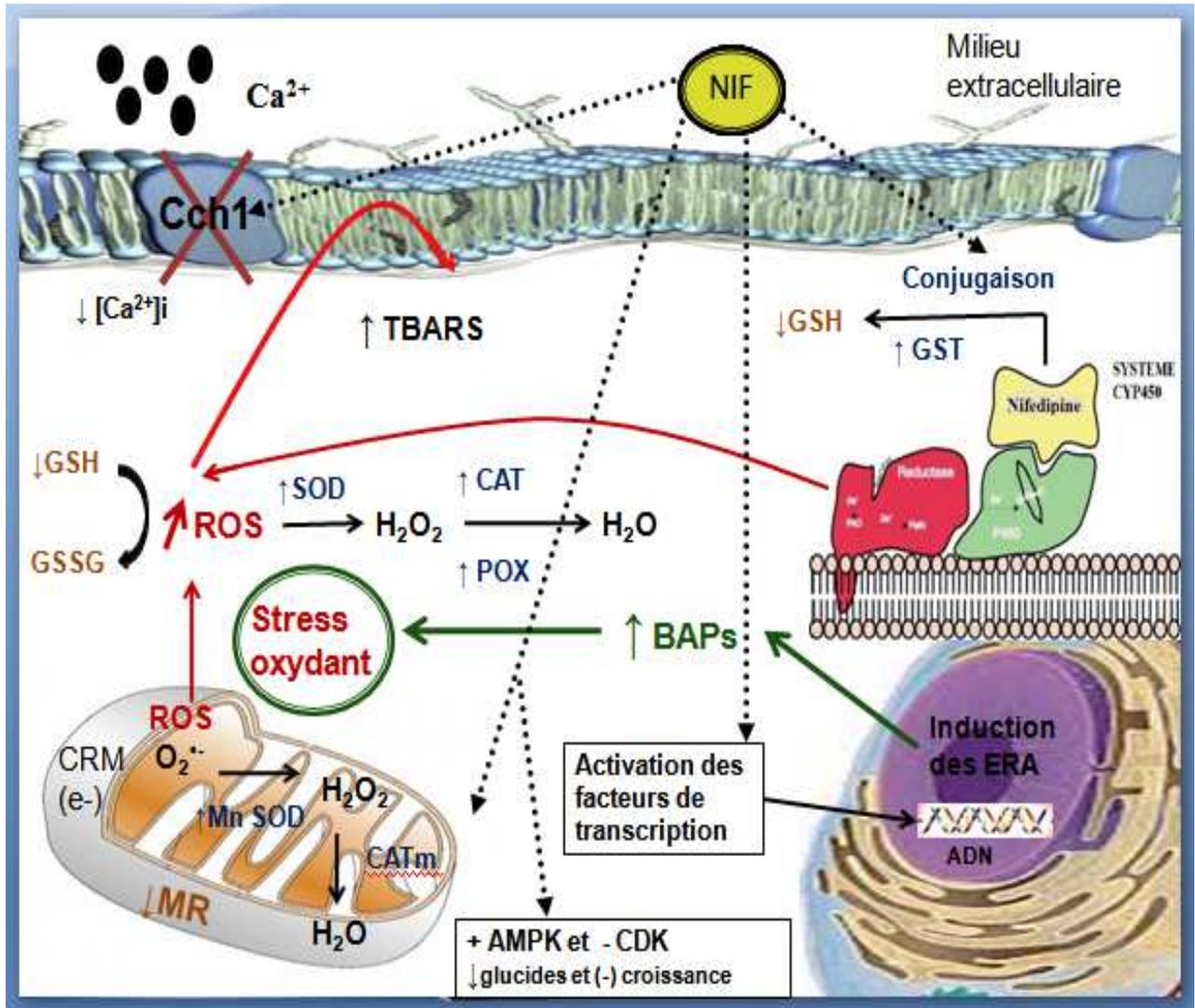


Figure 29. Schéma illustrant l'action de la Nifedipine sur le déclenchement d'un stress oxydatif passif chez *Saccharomyces cerevisiae* (réalisé par Cherait et Djebbar).

Chapitre V

CONCLUSION GENERALE Et PERSPECTIVES

Conclusion générale

L'impact de la Nifedipine sur le stress oxydatif est assez contradictoire. Certains auteurs rapportent que cet antagoniste calcique atténue le stress oxydatif et la production des ROS qui en découlent, alors que d'autres pensent que cet antagoniste calcique, au contraire, induit le déclenchement de ce type de stress, ou encore que ce xénobiotique n'a aucun effet sur ce dernier.

Dans ce présent travail, nous nous sommes donc intéressés à l'effet de la Nifedipine vis-à-vis du stress oxydant induit chez un modèle cellulaire bioindicateur de stress, *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux cibles biologiques des ROS, que peuvent constituer les protéines, glucides et lipides et nous avons mis en évidence une stimulation du taux de protéines et une diminution des taux des lipides et glucides. A partir de ces données, nous nous sommes focalisés vers les produits d'oxydation des biomolécules et plus précisément, ceux de la peroxydation lipidique où nous avons mis en évidence une augmentation du taux des TBARS.

Parallèlement, nous avons évalué l'effet de la Nifedipine, sur la cinétique de croissance cellulaire et nous avons démontré une inhibition de la prolifération. D'un autre côté, nous avons enregistré une inhibition de la consommation d'O₂ chez les cellules traitées par la Nifédipine.

A partir de ces résultats, notre intérêt s'est porté au système de défense antioxydant, couvrant un large panel d'enzymes de détoxication, que sont les NCPR, GST, CAT, APX, GPX et les différentes SODs. Nos résultats démontrent l'induction de ces enzymes de détoxication parallèlement à la diminution du taux de GSH confirmant, ainsi, le déclenchement du processus de détoxication.

Nonobstant, toutes ces données qui tendent à confirmer l'installation d'un stress oxydatif chez les levures après traitement par la Nifedipine, le suivi de la balance redox, a révélé une augmentation parallèle des ROMs et des BAPs, confirmant la nature passive de ce stress.

En effet, le maintien de la cellule dans un état redox stable est primordial pour son bon fonctionnement et pour cela le rôle des différentes enzymes de la métabolisation/détoxification est crucial. Le système de défense antioxydant endogène doit donc répondre aux attaques radicalaires de manière coordonnée, de façon à maintenir l'équilibre oxydatif, où chaque membre de la défense antioxydante a un rôle précis à jouer. La perte ou la surexpression d'un élément et une perte de coordination dans la réponse peuvent avoir des conséquences sur le bon fonctionnement de la cellule avec pour répercussion l'apparition de pathologies chroniques.

La Nifedipine, en induisant la surexpression de certains gènes impliqués dans la défense antioxydante (SOD, CYP,...) va provoquer un dérèglement de cette activité harmonieuse entre les différents protagonistes du système de défense, s'ensuit alors une cascade de réactions résultant de ce déséquilibre, conduisant au déclenchement d'un état de stress oxydatif passif.

Cette étude, nous a également permis, de souligner la pertinence de l'utilisation du système expérimental levurien comme outil et modèle alternatif pour la définition des bases cellulaires et moléculaires du stress oxydatif du aux xénobiotiques, médicaments inclus, et comprendre par suite leurs mécanismes d'actions. Ainsi le système levurien peut servir à la compréhension de la fonction cellulaire et les différents processus biologiques de bases. De ce fait, il peut être utilisé comme modèle cellulaire *in vitro* pour l'évaluation des effets des différents xénobiotiques telles que les nouveaux agents thérapeutiques permettant, à moindre coût, la compréhension de leurs mécanismes d'actions et l'identification de leurs cibles, en plus de l'évaluation de leur toxicité, une importante étape de la recherche médicamenteuse.

Perspectives

Tout au long de ce travail, nous avons essayé de répondre à plusieurs interrogations, concernant l'effet de la Nifedipine sur le stress oxydant, mais chaque réponse apportée, a ouvert la portes à d'autres interrogations nécessitant de plus amples recherches, afin d'éclaircir plusieurs autres points concernant l'implication de cette molécule sur le stress oxydant. Ainsi il serait judicieux de poursuivre et d'approfondir les recherches sur :

- L'Effet de la Nifedipine sur d'autres enzymes antioxydantes tels que les peroxyrédoxines, une famille de thiol peroxydases et la sulfiredoxine, une cysteine sulfinyl reductase qui maintient les peroxyrédoxines actives et contribue à l'homéostasie redox, ainsi que sur les thioredoxines et glutaredoxines.
- Le mécanisme par lequel la Nifedipine inhibe l'activité de PON-1, ainsi que son effet sur les autres paraoxonases (PON-2 et PON-3).
- L'impact de cette DHR sur le dysfonctionnement mitochondriale.
- L'effet de la Nifedipine au niveau du Bach2 un facteur de transcription, à l'instar de Nrf2, contrôlant l'expression de gènes des éléments de réponse antioxydante, et surtout au niveau de la protéine régulatrice Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), qui régule l'activité de Nrf2 et Bach2.

Chapitre VI

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- **Aceituno, F.E.A., 2013.** Systemic characterization of the oxygen response of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* ec1118 in oenological conditions. Phd Thesis. Pontificia Universidad Católica de Chile. Pp 124.
- **Adamis, P.D.B., Gomes, D.S., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007.** Vacuolar compartmentation of the cadmium-glutathione complex protects *Saccharomyces cerevisiae* from mutagenesis. *Toxicology Letters*, 1173, 1–7.
- **Adams, M.E., Mintz I.M., Reily M.D., Thanabal, V., Bean, B.P., 1993.** Structure and properties of omega-agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels. *Mol. Pharmacol*, 44, 681– 688.
- **Adisakwattana, S., Hsu, W.H., Yibchok-anun S., 2011.** Mechanisms of p-methoxycinnamic acid-induced increase in insulin secretion. *Horm. Metab. Res.* 43, 766–773.
- **Ahamd, K., Bracho, G.E., Wolf, D.P., Tash, J.S., 1995.** Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin and proteins phosphatases. *Arch Androl*, 35, 187-208.
- **Aigrain, L., 2010.** Conséquences de l'échange de domaines évolutivement éloignés sur l'activité et la géométrie de la NADPH-Cytochrome P450 réductase. Thèse de Doctorat. Université Paris-Sud 11. France.
- **Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Saito, H., Ohno, Y., Ito, Y., 2004.** Hydrogen peroxide modulates whole cell Ca²⁺ currents through L-type channels in cultured rat dentate granule cells. *Neuroscience letters*, 356(1), 25-28. (a).
- **Akaishi, T., Nakazawa, K., Sato, K., Ohno, Y., Ito, Y., 2004.** 4-Hydroxynonenal modulates the long-term potentiation induced by L-type Ca²⁺ channel activation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience letters*, 370(2-3), 155-159.
- **Akcay, M.N., Polat, M.F., Yilmaz, I., Akcay, G., 2003.** Serum paraoxonase levels in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology*, 50, 225–7. (a)
- **Akcay, M.N., Yilmaz, I., Polat, M.F., Akcay, G., 2003.** Serum paraoxonase levels in gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, 50, 273–275. (b)
- **Akiyoshi, B., Nelson, C.R., Ranish, J.A., Biggins, S., 2009.** Analysis of Ipl1-Mediated Phosphorylation of the Ndc80 Kinetochores Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 183, 1591–1595.

- **Alonso, M.T., Garcia-Sancho, J., 2011.** Nuclear Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium*, 49(5), 280-289.
- **Albers, E., Larsson, C., Andlid, T., Walsh, M.C., Gustafsson, L., 2007.** Effect of nutrient starvation on the cellular composition and metabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (15), 4839–4848.
- **Aldiguié, A. S., 2006.** Activité bio-catalytique en haute densité cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* pour l'intensification de la production de bio-éthanol. Thèse INSA Toulouse.
- **Aldridge, W. N. 1953.** Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl acetate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem. J*, 53, 117-124. (b)
- **Aldridge, W. N., 1953.** Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination. *Biochem. J*, 53, 110-117. (a)
- **Alici, H.A., Ekinci, D., Beydemir, S., 2008.** Intravenous anesthetics inhibit human paraoxonase-1 (PON1) activity in vitro and in vivo. *Clin Biochem*, 41, 1384–1390.
- **Allain, P., 2000.** Les médicaments, CdM Éditions, 3e édition.
- **Allanore, Y., Borderie, D., Lemaréchal, H., Ekindjian, O.G., Kahan, A. 2004.** Acute and sustained effects of dihydropyridine-type calcium channel antagonists on oxidative stress in systemic sclerosis. *Am J Med*, 116, 595-600. (a)
- **Allanore, Y., Borderie, D., Lemaréchal, H., Ekindjian, O.G., Kahan, A. 2004.** Nifedipine decreases s-VCAM-1 concentrations and oxidative stress in systemic sclerosis, but does not affect the concentrations of vascular endothelial growth factor or its soluble receptor. *1. Arthritis Res Ther*, 6, R309-R314. (b)
- **Allanore, Y., Borderie, D., Périanin, A., Lemaréchal, H., Ekindjian, O.G., Kahan, A. 2005.** Nifedipine protects against overproduction of superoxide anion by monocytes from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 7, R93-R100
- **AlQahtani, J., Al Hathi, A.A., Fatinni, Y., Al Barki, A., Al-Fifi, S., Asindi, A.A., Al Daama, S., 2001.** Nifedipine induced hyperglycemia in an infant: a case report. *Nigerian journal of pediatrics*, 28 (1), 18-20.

- **Amamra, R., Djebbar, M.R., Grara, N., Moumeni, O., Otmani, H., et al., 2015.** Cypermethrin-Induces Oxidative Stress to the Freshwater Ciliate Model: *Paramecium tetraurelia*. Annual Review & Research in Biology, 5 (5), 385-399. (a).
- **Amamra, R., Djebbar, M.R., Moumeni, O., Azzouz, Z., Zerriri, I., 2015.** Lipid peroxidation, oxidative stress and respiratory metabolism alteration in the freshwater ciliate *Paramecium tetraurelia* exposed to cypermethrin, a pyrethroid insecticide. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES), 6 (4), 115-123. (b).
- **Anderson, M.E., 1996.** Glutathione. In : PUNCHARD NA, KELLY FJ (editors), Free radicals : a practical approach. 1st Ed. New York. Oxford university Press. P 213-229.
- **Anekonda, T.S., Quinn J.F., 2011.** Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine. Biochim. Biophys. Acta, 1812, 1584-1590.
- Anzenbacher, P, U.M. Zanger (Eds.), (2012). Metabolism of drugs and other xenobiotics, Wiley-VCH, Weinheim.
- **Arora, D.K., Mohammed, A.M., Kowluru, A., 2013.** Nifedipine prevents etoposide-induced caspase-3 activation, prenyl transferase degradation and loss in cell viability in pancreatic b-cells. Apoptosis, 18, 1–8.
- **Artalejo, C.R., Adams, M.E., Fox, A.P., 1994.** Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. Nature, 367, 72–76.
- **Ashcroft, F.M., Kelly, R.P., Smith, P.A. 1990.** Two types of Calcium channel in rat pancreatic beta-cells. Pflugers Archiv, 415, 504-506.
- **Ates, O., Azizi, S., Alp, H.H., Kızıltunc, A., Beydemir, S., Cıncı, E., et al., 2009.** Decreased serum paraoxonase 1 activity and increased homocysteine and malondialdehyde levels in age-related macular degeneration. Tohoku J Exp Med, 217, 17–22.
- **Avanzato, D., Merlino, A., Porrera, S., Wang, R., Munaron, L., Mancardi, D., 2014.** Role of calcium channels in the protective effect of hydrogen sulfide in rat cardiomyoblasts. Cellular Physiology and Biochemistry, 33(4), 1205-1214.
- **Avdonin, V., Shibata, E.F., Hoshi, T., 1997.** Dihydropyridine action on voltage-dependent potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. Journal of General Physiology, 109, 169-180.

- **Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., et al., 2000.** Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 101, 2510-2517.
- **Aviram, M., Rosenblat, M., 2004.** Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*, 37, 1304–16.
- **Awasthi, Y.C., Yang, Y.S., Tiwari, N.K., Patrick, B., Sharma, A., Li, J., Awasthi, S., 2004.** Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 607-619.
- **Azzouz, Z., Berrebbah, H., Djebbar, M.R., 2011.** Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), 3243-3250.

B

- **Bacha, A., 2008.** Production et etude de l'activite de l'invertase produite par la levure *saccharomyces cerevisiae* sur substrat a base de datte. Thèse de Doctorat, Univ de Batna. Pp 14- 23.
- **Baird, L., Dinkova-Kostova, A.T., 2011.** The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway, *Archives of Toxicology*, 85, 241–272.
- **Ballatori, N., Villalobos, A.R., 2002.** Defining the molecular and cellular basis of toxicity using comparative models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 183, 207-220.
- **Barillet, S., 2007.** Toxicocinetique, toxicite chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*Danio rerio*). Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine de Metz. France. Pp 184-186. PP 476.
- **Barros, M.H., Tzagoloff, A., 2002.** Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 516, 119-123.
- **Bartsch, P., Maggiorini, M., Ritter, M., Noti, C., Vock, P., Oelz, O., 1991.** Prevention of high altitude pulmonary edema by nifedipine. *N Engl J Med*, 325, 1284 –1289.
- **Begrache, J., Massart, M.A., Robin, A., Borgne-Sanchez., Fromenty B., 2011.** Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology*, 54, 773–794.

- **Bekkari, Y., Lucas, J., Beillat, T., Chéret, A., Dreyfus, M., 2005.** Tocolyse par la nifédipine. Utilisation en pratique courante. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité (Gynecol Obstet Fertil)*, 33, 483–487.
- **Benitah, J.P., Alvarez, J.L., Gómez, A.M., 2010.** L-type Ca(2+) current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 48(1), 26-36.
- **Benoff, S., Cooper, G.W., Hurley, L., et al., 1994.** The effect of calcium ion channel blockers on sperm fertilization potential. *Fertil Steril*; 62: 606-17.
- **Berkels, R., Egink, G., Marsen, T.A., Bartels, H., Roesen, R., Klaus, W., 2001.** Nifedipine increases endothelial nitric oxide bioavailability by antioxidative mechanisms. *Hypertension*, 37, 240-245.
- **Berkels, R., Breitenbach T, Bartels H, Taubert D, Rosenkranz A, et al., 2005.** Different antioxidative potencies of dihydropyridine calcium channel modulators in various models. *Vascular Pharmacology*, 42(2), 145-152.
- **Bernadi, P., Rasola, A., 2007.** Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem*, 45, 481-506.
- **Benbouzid, H., Berrebbah, H., Berredjem, M., Djebbar, M.R., 2012.** Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium* sp. With special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94 (3), 557-565.
- **Benbouzib, H., 2012.** Evaluation et etude de la toxicité d'une famille d'acaricide sur des protistes ciliées. these de doctorat de l'université d'Annaba. p 87.
- **Berridge, M.J., 1995.** Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays*. 17(6): 491-500.
- **Berridge, M.J., 1998.** Calcium a life and death signal. *Nature*. 395 (6703): 645-648.
- **Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003.** Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (7), 517-529.
- **Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (1), 11-21.
- **Birch, R.M., Walker, G.M., 2000.** Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 678–687.

- **Bodi, I., Mikala, G., Koch, S.E., Akhter, S.A., Schwartz, A., 2005.** The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (12), 3306- 3317.
- **Borowiec, A.S., Bidaux, G., Pigat, N., Goffin, V., Bernichtein, S., Capiod, T., 2014.** Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation. *European Journal of Pharmacology*, 739, 19-25.
- **Bouaricha, H., Berrebbeh, H., Grara, N., Djebbar, M.R., 2012.** Response of *paramecium sp.* with respect to an insecticide (Proclaim): growth, content of MDA, AChE activity and respiratory metabolism. *Journal of Applied Sciences Research*, 8 (8), 4172-4180.
- **Bouaricha, H., 2013.** Evaluation du stress oxydatif induit par le Proclaim : Essai comparatif sur deux modèles biologiques (*Helix aspersa* et *Paramecium sp.*). Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba.
- **Boulassel, A., Djebbar., M.R., Rouabhi R., Djebbar, H., 2013.** Physiological and biochemical changes observed in alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia* treated with paracetamol. *International Journal of Biosciences*, 9, 1-10.
- **Bouraoui, Z., Ghedira, J., Jebali, J., Banni, M., Clerendeau, C., Narbonne, J.F., Boussetta, H., 2009.** Etude de l'effet du cadmium et du benzo[a]pyrène sur des enzymes de phase I et phase II de biotransformation chez le polychète *Nereis diversicolor*. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 22 (3), 451-459.
- **Bourgeois, C.M., Larpent, J., 1996.** Microbiologie alimentaire. Vol II: Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (Ed) Lavoisier. Paris, 523 p.
- **Bourinet, E., Stotz, S.C., Spaetgens, R.N., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J.I., Zamponi, G.W., 2001.** Interaction of SNX482 with Domains III and IV Inhibits Activation Gating of 1E (CaV2.3) Calcium Channels. *Biophysical Journal*, 81, 79- 88.
- **Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrère, C., Couette, B., et al., 2005.** Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J*, 24 (2), 315-324.
- **Braconi, D., Bernardini, G., Millucci, L., Jacomelli, G., Micheli, V., Santucci, A., 2011.** *Saccharomyces cerevisiae* as a Tool to Evaluate the Effects of Herbicides on Eukaryotic Life. *Herbicides and Environment*, 494-495.

- **Braconi, D., Sotgiu, M., Millucci, L., Paffetti, A., Tasso, F., Alisi, C., et al., 2006.** Wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to evaluate the effects on eukaryotic life of locally used herbicides. *International Journal of Ecodynamics*, 1(3), 266-283.
- **Brink, C.A., 2008.** The role of calcium and mitochondria in the etiology and treatment of three different disease paradigms. Thèse de Doctorat. Université de Toledo. Ohio.USA. 142 pages.
- **Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., Sheu, S., 2004.** Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287, C817-833
- **Brovkovich, V., Kalinowski, L., Muller-Peddinghaus, R., Malinski, T., 2001.** Synergistic antihypertensive effects of nifedipine on endothelium: concurrent release of NO and scavenging of superoxide. *Hypertension*, 37, 34-39.
- **Browne, R.W., Bloom, M.S., Schisterman, E.F., Hovey, K., Trevisan, M., et al., 2008.** Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers*, 13(2), 160-183.
- **Buschini, A., Poli, P., Rossi C., 2003.** *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones. *Mutagenesis*, 18(1), 25-36.

C

- **Cai, H., Harrison, D.G., 2000.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress, *Circ. Res*, 87, 840–844.
- **Calin-Jageman, I., Lee, A., 2008.** Cav1 L-type Ca²⁺ channel signaling complexes in neurons. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 573–583.
- **Campos, C., 2012.** Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae. *Postgrad Med*, 124, 90-97.
- **Camps, J., Pujol, I., Ballester, F., Joven, J., Simó, JM., 2011.** Paraoxonases as Potential Antibiofilm Agents: Their Relationship with Quorum-Sensing Signals in Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*, 55 (4), 1325-1331.
- **Cappuccio, F.P., Kalaitzidis, R., Duneclift, S., Eastwood, J.B., 2000.** Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *J. Nephrol.*, 13(3), 169-177.

- **Caro, A.A., Cederbaum, A.I., 2004.** Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 44, 27-42.
- **Catterall, W.A. 2000.** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **16**, 521- 555.
- **Catterall, W.A., 2000.** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 521.
- **Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., Striessnig, J., 2005.** International Union of Pharmacology XLVIII. Nomenclature and structure–function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev*, 57, 411–425.
- **Catterall, W.A., Few, A.P., 2008.** Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*, 59, 882-901.
- **Catterall, W.A., 2011.** Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives on Biology*, 3(8): a003947.
- **Cavalli, V.L.L.O., Cattani, D., Heinz Rieg, C.E., Pierozan, P., Zanatta, L., et al., 2013.** Round up disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 335–346.
- **Cederbaum, A.I., 2013.** Nrf2 and antioxidant defense against CYP2E1 toxicity. *Subcellular Biochemistry*, 67, 105-130.
- **Chakroborty, S., Stutzmann, G.E., 2014.** Calcium channelopathies and Alzheimer's disease: Insight into therapeutic success and failures. *European Journal of Pharmacology*, 739, 83-95.
- **Chander, V., Chopra, K., 2005.** Nifedipine attenuates changes in nitric oxide levels, renal oxidative stress, and nephrotoxicity induced by cyclosporine. *Renal Failure*, 27, 441-450.
- **Chen H.J., WU C.F., Huang J.L., 2005.** Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct. *Toxicology Letters*, 1555, 403-410.
- **Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P., Stepien, G., 2011.** Adenine nucleotide translocase-2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6), 562-7.
- **Chung, M., Reitberg, D.P., Gaffney, M., Singleton, W., 1987.** Clinical pharmacokinetics of nifedipine gastrointestinal therapeutic system. A controlled-release formulation of nifedipine. *American Journal of Medicine*, 83(6), 10-14.

- **Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010.** Reactive oxidative species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48, 749-762.
- **Clapham, D.E., 1995.** Calcium signaling. *Cell*, 80, 259-268.
- **Clunn, G.F., Sever, P.S., Hughes, A.D., 2010.** Calcium channel regulation in vascular smooth muscle cells: synergistic effects of statins and calcium channel blockers. *Int.J. Cardiol.* 139, 2–6.
- **Cominacini, L., Fratta Pasini, A., Garbin, U., Pastorino, A.M., Davoli, A., et al., 2003.** Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302 (4), 679-684.
- **Coqueret, O., 2003.** New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*, 13(2), 65-70.
- **Coulon, V., Blanchard, J.M., 2001.** Flux calciques et expression génique. *médecine/sciences*, 17, 969-978.
- **Crabtree, H.G., 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours.** *Biochem J*, 23 (3), 536-545.

D

- **Darmani, N.A., Zhong, W., Chebolu, S., Vaezi, M., Alkam, T., 2014.** Broad-spectrum antiemetic potential of the L-type calcium channel antagonist nifedipine and evidence for its additive antiemetic interaction with the 5-HT(3) receptor antagonist palonosetron in the least shrew (*Cryptotis parva*). *European Journal of Pharmacology*, 722, 2-12.
- **Daschil, N., Humpel, C., 2014.** Nifedipine and nimodipine protect dopaminergic substantia nigra neurons against axotomy-induced cell death in rat vibrosections via modulating inflammatory responses. *Brain Research*, 1581, 1-11
- **De Souza Pereira, R., Ivonete, M., da Silva, N., Alonso Cotta, M., 2003.** Adhesion forces measured between a calcium blocker drug and its receptor in living cells using atomic force microscope. *FEBS Letters*, 552, 155-159.
- **De Souza Pereira, R.S., 2001.** The use of calcium blockers to study biochemical behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 228, 1-7.

- **deBlois, D., Tea, B.S., Dam, T.V., Tremblay, J., Hamet, P., 1997.** Smooth Muscle Apoptosis During Vascular Regression in Spontaneously Hypertensive rats. *Hypertension*, 29, 340-344.
- **Deleuze, C., David, F., Béhuret, S., Sadoc, G., Shin, H.S., et al., 2012.** T-type calcium channels consolidate tonic action potential output of thalamic neurons to neocortex. *Journal of Neuroscience*, 32(35), 12228-12236.
- **Denton, R.M., McCormack, J.G., 1985.** Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *American Journal of Physiology*, 249, E 543 –E554.
- **Denton, R.M., McCormack, J.G., 1990.** Ca²⁺ as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues, *Annual Review of Physiology*, 52, 451-466.
- **Denton, R.M., McCormack, J.G., 1993.** Calcium and the regulation of intramitochondrial dehydrogenases, *Methods of Toxicology*, 2, 390-403.
- **Deponte, M., 2013.** Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1830, 3217–3266.
- **Deshwal, R., Iqbal, M., Basnet, S., 2012.** Nifedipine for the Treatment of High Altitude Pulmonary Edema. *Wilderness and Environmental Medicine*, 23, 7-10.
- **Desquiret, V., 2008.** Mitochondrie et stress energetique : Voies de signalisation et adaptations cellulaires. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale d'Angers. Pp 23-29.
- **Díaz-Ruiz R., 2010.** Participation du fructose 1,6-biphosphate dans l'induction de l'effet Crabtree chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. These de Doctorat. , École Doctorale Sciences de la vie et de la santé. Bordeaux.
- **Diderich, J.A., Raamsdonk, L.M., Kuiper, A., Kruckeberg, A.L., Berden, J.A., et al., 2002.** Effects of a hexokinase II deletion on the dynamics of glycolysis in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2(2):165-172.
- **Dimova, S., Koleva, M., Rangelova, D., 1994.** Liver enzyme activities after multiple administration of nifedipine in mice. *Pharmacology & toxicology*, 75(5), 315-318.
- **Dissaux, A., 2010.** Etude et valorisation des principes actifs de biominéralisation du calcium pour les applications pharmaceutiques. Theses de Doctorat. Université d'Orléans. Pp 213.
- **Djata Cabral, M., 2008.** Les récepteurs aux dihydropyridines sélectivement exprimés par les lymphocytes Th2 sont importants pour leur signalisation et sont une cible dans le traitement de l'asthme allergique expérimental. Thèse de Doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier.

- **Djekoun, M., 2012.** Évaluation de l'effet du stress oxydatif généré par le Cadmium à l'échelle cellulaire : Cas de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- **Djekoun, M., Djebbar, M.R., Rouabhi, R., Zaoui, L., Bensoltane, S., Djebbar, H., 2010.** Biochemical, Enzymatic and Energy Alterations Observed in *Saccharomyces cerevisiae* Subjected to Oxidative Stress. American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences, 2 (1), 36-42.
- **Dogrul, A., Gardell, L.R., Ossipov, M.H., et al., 2003.** Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. Pain, 105 : 159-168.
- **Dolinski, K., Botstein, D., 2006.** Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. Genome research, 15(12), 1611-1619
- **Dostalek, M., Brooks, J. D., Hardy, K. D., Milne, G. L., Moore, M.M., et al., 2007.** In vivo oxidative damage in rats is associated with barbiturate response but not other cytochrome p450 inducers. Molecular Pharmacology, 72, 1419-1424.
- **Dostalek, M., Hardy, K.D., Milne, G.L., Morrow, J.D., Chen, C., et al., 2008.** Development of oxidative stress by cytochrome p450 induction in rodents is selective for barbiturates and related to loss of pyridine nucleotide-dependent protective systems. The journal of biological chemistry, 283 (25), 17147–17157.
- **Drocourt, L., Pascussi, J.M., Assenat, E., Fabre, J.M., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2001.** Calcium channel modulators of the dihydropyridines family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. Drug Metabolism and Disposition, 29, 1325-1331.
- **Droge W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Review, 82, 47–95.
- **Dulhunty, 2006.** Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 33, 763-772.
- **Dunlap, K., Luebke, J.I., Turner, T.J., 1995.** Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. Trends in Neurosciences, 18, 89-98.

E

- **ENCORE Investigators., 2003.** Effect of nifedipine and cerivastatin on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease: the ENCORE I Study

(Evaluation of Nifedipine and Cerivastatin on Recovery of Coronary Endothelial Function). *Circulation*, 107, 422-428.

- **Ekins, S., Erickson, J.A., 2002.** A pharmacophore for human pregnane X receptor ligands. *Drug Metabolism and Disposition*, 30, 96-99.
- **El Boustany, C., 2009.** Rôles des canaux calciques de la membrane plasmique dans la prolifération des cellules tumorales hépatiques. These de Doctorat. Université de Lille 1. Lille, France.
- **Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., et al., 2000.** Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25, 533-535.

F

- **Farghaly, L.M., Ghobashy, W.A., Shoukry, Y., El-Azab, M.F., 2014.** Ameliorative effect of acetyl-L-carnitine and/or nifedipine against selenite-induced cataractogenesis in young albino rats. *European Journal of Pharmacology*, 729, 1-9.
- **Faure, L., 2005.** Homéostasie cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* : Etude des effets des acides faibles. Thèse Doctorat. Univ Toulouse, Pp 27.
- **Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M., Caradonna, Z., Perego, C., et al., 2001.** High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes*, 50, 1290-1301.
- **Fei, H., Zhao, B., Zhao, S., Wang, Q., 2008.** Requirements of calcium fluxes and ERK kinase activation for glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 315, 75-84.
- **Feng, H.L., Han, Y.B., Hershlag, A., Zheng, L.J., 2007.** Impact of Ca²⁺ flux inhibitors on acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Journal of Andrology*, 28, 561-564.
- **Feng, Y., Wang, B., Du, F., Li, H., Wang, S., Hu, C., Zhu, C., Yu, X., 2013.** The involvement of PI3K-mediated and L-VGCC-gated transient Ca²⁺ influx in 17β-estradiol-mediated protection of retinal cells from H₂O₂-induced apoptosis with Ca²⁺ overload. *PLoS One*, 8(11), e77218. doi: 10.1371/journal.pone.0077218
- **Fermini, B., Priest, B., 2008.** *Ion Channels*. Springer.
- **Ferreira, L.F., Reid, M.B., 2008.** Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *Journal of Applied Physiology*, 104, 853-860.

- **Feske, S., Giltzane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L.M., Rao, A., 2001.** Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature Immunology*, 2, 316-324.
- **Fleckenstein, A., 1977.** Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 17, 149-166.
- **Flucher, B.E., Obermair, G.J., Tuluc, P., Schredelseker, J., Kern, G., Grabner, M., 2005.** The role of auxiliary dihydropyridine receptor subunits in muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 26, 1-6.
- **Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., et al., 2005.** Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes*, 54, 1331-1339.
- **Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., et al., 2006.** Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK, Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques. (*medecine/science*) *M/S*, 4 (22), 381-388.
- **Forstermann, U., Munzel, T., 2006.** Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, *Circulation*, 113, 1708–1714.
- **Fougeray, S., 2012.** Rôle du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans la régulation des réponses immune et angiogénique activées par des stress ischémiques et inflammatoires dans l'épithélium rénal humain. Thèse de doctorat. Université Paris Descartes. France. Pp 25-28
- **Fourquet, S., 2008.** Régulation redox des facteurs de transcription de la famille CNC-bZip Nrf2 et Bach2. Thèse de Doctorat. Université Paris 11, Orsay. France. pp177.
- **Frackiewicz, E.J., Shiovitz, T.M., Jhee, S.S., 2002.** Ethnicity in Drug Development and Therapeutics. Cambridge University Press, 152 pages pp 41.
- **François, A., 2013.** Distributions et fonctions du canal Calcique Cav3.2 dans les voies somatosensorielles. Thèse de doctorat en Biologie Santé. Université de Montpellier 2.
- **Fréchin, M., 2010.** Identification et rôles des partenaires de la voie de transamidation de la mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae* dans l'adaptation à la respiration. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.
- **Fromenty, B., 2010.** Toxicité mitochondriale et métabolique des médicaments : mécanismes et conséquences au niveau du foie. *Réanimation*, 19, 552-567.

- **Fuhrman, B., Gantman, A., Aviram, M., 2010.** Paraoxonase 1 (PON1) deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis. *Atherosclerosis*, 211(1), 61-68.
- **Fukuo, K., Yang, J., Suzuki, T., 2003.** Nifedipine upregulates manganese superoxide dismutase expression in vascular smooth muscle cells via endothelial cell-dependent pathway. *Hypertension Research*, 26, 503–508.
- **Fukuo, K., Yang, J., Yasuda, O., Mogi, M., Suhara, T. et al., 2002.** Nifedipine indirectly upregulates superoxide dismutase expression in endothelial cells via vascular smooth muscle cell-dependent pathways. *Circulation*, 106, 356 –361.
- **Fullerton, G.D., Kanal, K.M., Cameron, I.L., 2006.** On the osmotically unresponsive water compartment in cells. *Cell Biology International*, 30, 74-77.

G

- **Garait, B., 2006.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. These de Doctorat. Université de JOSEPH Fourier Grenoble. France. Pp 73-74.
- **Gardès- Albert, M., Jore, D., 2005.** Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l’oxygène. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Ed Lavoisier. Paris, Pp 1-23.
- **Garcera, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J., Herrero, E., 2006.** Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochemical Journal*, 398, 187-196.
- **Gartel, A.L., Radhakrishnan, S.K., 2005.** Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Research*, 65 (10), 3980–3985.
- **Gartel, A.L., Radhakrishnan, S.K., Serfas, M.S., Kwon, Y.H., Tyner, A.L., 2004.** A novel p21(WAF1/CIP1) transcript is highly dependent on p53 for its basal expression in mouse tissues. *Oncogene*, 23, 8154–8157.
- **Georgeon-Chartier, C., 2012.** Evaluation des effets du vieillissement sur la signalisation calcique des cellules musculaires lisses des arteres cerebrales dans les modeles murins c57bl6/j, samr1 et samp8 dans des conditions normales et sous restriction calorique. These de Doctorat. universite Bordeaux 1. Pp : 44.

- **Gervasio, D.F., 2008.** Analyse systémique de la modulation de la bascule respiro-fermentaire par l'acide oléique chez *Saccharomyces cerevisiae*. These de Doctorat. l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Université De Toulouse.
- **Ghiadoni, L., Magagna, A., Versari, D., Kardasz, I., et al., 2003.** Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension*, 41(6), 1281-1286.
- **Giancippoli, A., Novara, M., De Luca, A., Baldelli, P., Marcantoni, A., Carbone, E., Carabelli, V., 2006.** Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (Alpha 1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophysical Journal*, 90(5), 1830-1841.
- **Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P., Rizzuto, R., 2008.** Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Current Molecular Medicine*, 8(2), 119-130.
- **Gomes, D.S., Riger, C.J., Pinto, M.L.C., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2005.** Evaluation of the role of Ace1 and Yap1 in cadmium absorption using the eukaryotic cell model *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(3), 383-389.
- **Gómez-Sánchez, R., Gegg, M.E., Bravo-San Pedro, J.M, et al., 2014.** Mitochondrial impairment increases FL-PINK1 levels by calcium-dependent gene expression. *Neurobiology of Disease*, 62, 426–440.
- **Gotoh, Y., Imaizumi, Y., Watanabe, M., Shibata, E.F., Clark, R.B., Giles, W.R., 1991.** Inhibition of transient outward K⁺ current by DHP Ca²⁺ antagonists and agonists in rabbit cardiac myocytes. *American Journal of Physiology*, 260, H1737- H1742.
- **Grant, C., MacIver, F., Dawes, I., 1996.** Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 29, 511-515.
- **Gribkoff, V.K., Kaczmarek, L.K., 2009.** Structure, Function and Modulation of Neuronal Voltage-Gated Ion Channels. Ed John Wiley & Sons - 496 pages (221-227).
- **Guengerich, F.P., 2001.** Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 611-650.
- **Guengerich, F.P., 2002.** Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis. *Biological Chemistry*, 383(10), 1553-1564.
- **Guengerich, F.P., 2003.** Cytochromes P450, drugs and diseases. *Molecular Interventions*, 3, 194–204.

- **Guengerich, F.P., 2013.** Drug-induced Liver Disease. 3eme Edition. Edited by:Neil Kaplowitz and Laurie D. DeLeve. Academic press. Pp 15-33.
- **Guérin, R., 2008.** La calnexine : un élément clé dans l'apoptose chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. These de Doctorat. Université de Montréal. Pp 331.
- **Guiffant, D., 2008.** Utilisation de la levure en tant que model et outil: De la compréhension de la cytokinèse à l'étude de sélectivité d'une molécule à potentiel thérapeutique. Thèse de doctorat. Université de Rennes 1. France.
- **Guiraud, J., Galzy, P., 1998.** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris. 615 P.
- **Gupta, N., Gill, K., Singh, S., 2009.** Paraoxonases : Structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. Indian Journal of Medical Research, 130, 361-368.
- **Gustavsson, N., Wu, B., Han, W., 2012.** Calcium sensing in exocytosis. Advances in Experimental Medicine and Biology, 740, 731-757.

H

- **Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974.** Gluthation-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249, 7130-7139.
- **Handa, T., Singha, S., 2014.** Characterization of a new degradation product of nifedipine formed on catalysis by atenolol: A typical case of alteration of degradation pathway of one drug by another. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 89, 6-17.
- **Hanioka, N., Yamamoto, M., Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Narimatsu, S., 2010.** Functional characterization of human cytochrome P4502E1 allelic variants: in vitro metabolism of benzene and toluene by recombinant enzymes expressed in yeast cells. Arch Toxicol, 84, 363-371.
- **Hardie, D.G., 2011.** AMP activated protein kinase an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes & Development, 25 (18), 1895-1908.
- **Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A., 2012.** AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis" Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 13 (4), 251-262.
- **Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., et al., 2004.** Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. Nat Struct Mol Biol, 11, 412-419.

- **Harisseh, R., 2012.** Rôle des entrées capacitatives et de TRPV2 dans la dérégulation de l'homéostasie calcique dans le muscle squelettique humain : implication dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Université De Poitiers. P 82-83.
- **Haubenstricker, M. E., Meier, P. G., Mancy K. H., et al., 1990.** Rapid toxicity testing based on yeast respiratory activity. Bull. Environm. Contam. Toxicol, 44, 669-674.
- **Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., et al., 2005.** Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. Cell Metab 2005, 2, 9-19.
- **Hawley, S.A., Selbert, M.A., Goldstein, E.G., Edelman, A.M., Carling, D., Hardie, D.G., 1995.** 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. J. Biol. Chem. 270, 27186–27191.
- **Hayase, N., Itagaki, Y., Ogawa, S., Akutsu, S., Inagaki S., Abiko, Y., 1994.** Newly discovered photodegradation products of nifedipine in hospital prescriptions, J.Pharm. Sci, 83, 532–538.
- **Henry, P.D., 1990.** Calcium antagonist and atherosclerosis. Atherosclerosis, 10, 963- 965.
- **Henry, S.A., Kohlwein, S.D., Carman, G.M., 2012.** Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 190, 317-349.
- **Hershlag, A., Cooper, G.W., Benoff, S., 1995.** Pregnancy following discontinuation of a calcium channel blocker in the male partner. Hum Reprod, 10, 599-606.
- **Herskowitz, I., 1988.** Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev, 52, 536-553.
- **Hirata, A., Igarashi, M., Yamaguchi, H., Suwabe, A., Daimon, M., Kato, T., Tominaga, M., 2000.** Nifedipine suppresses neointimal thickening by its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth via a MEK-ERK pathway coupling with Pyk2. Br. J. Pharmacol, 131, 1521-1530.
- **Ho, C. H., Piotrowski, J., Dixon, S. J., Baryshnikova, A., Costanzo, M., Boone, C., (2011).** Combining functional genomics and chemical biology to identify targets of bioactive compounds. Curr Opin Chem Biol, 15, 66-78.
- **Ho, H.C., Suarez, S.S., 2001.** An inositol 1,4,5-triphosphate receptor-gated intracellular Ca²⁺ store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. Biol Reprod, 65, 1606-1615.

- **Hofmann, F., Lacinová, L., Klugbauer, N., 1999.** Review Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 139, 33-87.
- **Hofmann, F., Flockerzi, V., Kahl, S., Wegener, J.W., 2014.** L-Type $Ca_v1.2$ calcium channels: From in vitro findings to in vivo function. *Physiological Review*, 94 (1), 303-326.
- **Horl, W.H., Haag, M., Riegel, W., Heidland, A., 1987.** Effect of nifedipine on carbohydrate metabolism in the rat. *Res Exp Med*, 187, 203-210.
- **Hotchkiss, A., Feridooni, T., Zhang, F., Pasumarthi, K.B.S., 2014.** The effects of calcium channel blockade on proliferation and differentiation of cardiac progenitor cells. *Cell Calcium*, 55(5), 238-251.
- **Huber, I., Wappl, E., Herzog, A., Mitterdorfer, J., Glossmann, H., Langer, T., Striessnig, J., 2000.** Conserved Ca^{2+} -antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain. *Biochemistry Journal*, 347 (3), 829-836.
- **Hughes, T. R. 2002.** Yeast and drug discovery. *Funct Integr Genomics*, 2, 199-211.
- **Hugtenburg, J.G., Van Voorst, M.J., Van Marle, J., Mathy, M.J., et al., 1990.** The influence of nifedipine and mioflazine on mitochondrial calcium overload in normoxic and ischaemic guinea-pig hearts. *Eur J Pharmacol*, 178(1), 71- 78.

I

- **Ileana C. Farcasanu, Radu Mitrica, Ligia Cristache, Ioana Nicolau, Lavinia L. Ruta, Liliana Paslaru, Sorin Comorosan. (2013)** Optical manipulation of *Saccharomyces cerevisiae* cells reveals that green light protection against UV irradiation is favored by low Ca^{2+} and requires intact UPR pathway. *FEBS Letters*, 587, 3514–3521.
- **Imaoka, S., Yamada, T., Hiroi, T., Hayashi, K., Sakaki, T., Yabusaki, T., Fume, Y., 1996.** Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Pharmacology*, 51, 1041-1050.
- **Imanishi, M., Ishizawa, K., Sakurada, T., Ishizawa, Y., Yamano, N., et al., 2014.** Drug development for cardiorenal disease based on oxidative stress control. *Journal of Pharmaceutical Society of Japan (Yakugaku Zasshi)*, 134(6), 715-719.

- **Iversen, E., Jeppesen, D., Steensgaard-Hansen, F., 1990.** Direct diabetogenic effect of diltiazem? *J Intern Med*, 227, 285-86.
- **Iwai, M., Kanno, H., Inaba, S., Senba, I., Sone, H., Nakaoka, H., Horiuchi, M., 2011.** Nifedipine a calcium channel blocker attenuate intolerance and white adipose tissue dysfunction in Type 2 Diabetic KK-A(Y) Mice. *American journal of hypertension*, 24 (2), 169-174.

J

- **Jackson, R. S., 1994.** Wine science, principles and applications, Academic press, San Diego, California, 235-276.
- **Jamet, T., 2012.** Approches thérapeutiques pour le traitement de la myopathie myotubulaire. These de Doctorat. Université de Strasbourg. P23.
- **Janero, D.R., 1990.** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 9, 515-540.
- **Jaouad, L., de Guise, C., Berrougui, H., Cloutier, M., et al., 2006.** Age-related decreased in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis*, 185 (1), 191-200.
- **Jawich, D., 2006.** Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Thèse de Doctorat, L'institut National Polytechnique De Toulouse. Pp 134.
- **Jentsch, T.J., Hubner, C.A., Fuhrmann, J.C., 2004.** Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1039-1047.
- **Jeziorskia, M.C., Greenberg, R.M., 2006.** Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action. *The International Journal for Parasitology*, 36(6), 625–632.
- **Jonas, J.C., Bensellam, M., Duprez, J., Elouil, H., Guiot, Y., Pascal, S.M., 2009.** Glucose regulation of islet stress responses and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 11, 65–81.

K

- **Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006.** Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, 444, 840–846.
- **Kalant, M.D., Roshchlau, W.H.E., 1998.** Principles of Medical Pharmacology, 6th Edn., Oxford University Press, New York.
- **Kappel, V.D., Frederico, M.J.S., Postal, B.G., Mendes, C.P., Cazarolli, L.H., Silva, F.R.M.B0., 2013.** The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect. *European Journal of Pharmacology*, 702, 264-268.
- **Kastelova, A., Koleva, M., Staneva-Stoytcheva, D., 2000.** Changes in rat liver monooxygenase activities after administration of atenolol, nifedipine and diltiazem alone and in combination. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 22(8), 627-631.
- **Katzung, B.G., 2004.** Basic & Clinical Pharmacology, 9e edition.
- **Khaldi F., Djebar., H Rouabhi R. and Djebar .M.R., 2009.** Cellular reponse of a pollution bioindicator model (*Ramalina farinacea*) following treatment with fertilizer. *American-Eurasian Journal of Toxicologie sciences*, 1 (2), 69-73.
- **Kim, H.J., di Luccio, E., Kong, A.N., Kim, J.S., 2011.** Nrf2-mediated induction of phase 2 detoxifying enzymes by glyceollins derived from soybean exposed to *Aspergillus sojae*. *Biotechnology Journal*, 6(5), 525-536.
- **Kim, J.E., Choi, H.C., 2010.** Losartan inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through activation of AMP-activated protein kinase. *Korean J. Physiol. Pharmacol*, 14, 299-304.
- **Kim, W.H., Lee, J.W., Suh, Y.H., Hong, S.H., Choi, J.S., et al., 2005.** Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 54, 2602-2611.
- **Kiowski, W.M.D., Erne, P., Bühler, F.R., 1990.** Use of nifedipine in hypertension and Raynaud's phenomenon. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 4(5), 953-940.
- **Kirschvink, N., de Moffarts, B., Lekeux, P., 2008.** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177, 178–191.

- **Kissova, I., Plamondon, L.T., Brisson, L., Priault, M., et al., 2006.** Evaluation of the roles of apoptosis, autophagy and mitophagy in the loss of plating efficiency induced by Bax expression in yeast. *J Biol Chem*, 281, 36187-36197.
- **Kocharin, K., 2013.** Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Polyhydroxybutyrate Production. Phd thesis. CHALMERS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY. Göteborg, Sweden.
- **Koleva, M., Dimova, S., (2001).** Effect of long-term multiple nifedipine administration on the antinociceptive activity of acetaminophen. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 23 (10), 537-540.
- **Koleva, M., Dimova, S., 2000.** Effects of nifedipine, verapamil, diltiazem and trifluoperazine on the antinociceptive activity of acetaminophen. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 22(10), 741-745.
- **Konno, Y., Sekimoto, M., Nemoto, K., Degawa, M., 2004.** Sex difference in induction of hepatic CYP2B and CYP3A subfamily enzymes by nicardipine and nifedipine in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 20– 28.
- **Kovac, J.R., Chrones, T., Sims, S.M., 2008.** Temporal and spatial underlying capacitative calcium entry in human colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(1), 88-98.
- **Kovac, S., Angelova, P.R., Holmström, K.M., Zhang, Y., Dinkova-Kostova, A.T., Abramov, A.Y., 2015.** Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 794–801.
- **Krebs, H., 1972.** The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. » *Essays in Biochemistry*, 8, 1-34.
- **Kreger-van Rij, N.J.W., 1984.** The yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam
- **Kumar Azad, G., Singh, V., Mandal, P., Singh, P., Golla, U., et al., 2014.** Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. *FEBS Open Bio*, 4, 77–89.

L

- **Lacinova, L., 2005.** Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*, 24 (1), 1-78.
- **Lacolley, P., 2008.** Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext. Paris. Pp 7-8 et 53-56.
- **Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A., Sáez, M.J., 1982.** Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 19-25.
- **Landry, Y., Gies, J.P., 2009.** Pharmacologie : Des cibles vers l'indication thérapeutique. 2ème Ed. Dunod. Paris. Pp 67-87.
- **Lane, N., 2003.** Oxygen, the molecule that made the world. New York : Oxford University Press, 366 p.
- **Larpent, J.P., Gourgoud, M., 1985.** Elément de microbiologie. Ed.Herman. Paris, 464p
- **Laurent, L., 1991.** Eléments minéraux. In: Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol 4. Ed. Lavoisier. Paris, pp : 79-79.
- **Laurent, S., Boutouyrie, P., Lillo-Le Louet, A., 2001.** Antagonistes du calcium. *Encyclopedie Médecine Chirurgie, Cardiologie*, 11, 906-910.
- **Laurent, S., Tropeano, A.I., Lillo-Le Louet, A., 2002.** Antagonistes du calcium. *Médecine thérapeutique*, 8(6), 317-324. Revue : Inhibiteurs calciques
- **Laybutt, D.R., Preston, A.M., Akerfeldt, M.C., et al., 2007.** Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50, 752–763
- **Le Chevoirn, M.A.R., 2008.** Les inhibiteurs calciques chez les Carnivores domestiques : Pharmacologie et thérapeutique. Thèse Doctorat Veterinaire, la faculte de medecine de Creteil. Pp 52
- **Lee, Y.H., Kuo, T.F., Chen, B.Y., Feng, Y.K., Wen, Y.R., Lin, W.C., Lin, F.H., 2005.** Toxicity assessment of montmorillonite as a drug carrier for pharmaceutical applications: yeast and rats model. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 17, 12-18.
- **Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garini, J., Labarre, J., Toledano, M.B., 1999.** Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (23), 16040–16046.

- **Leen, J.S., Huh, W.K., Lee, B.H., Baek, Y.U., Hwang, C.S., et al., 2001.** Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase plays a crucial role in the reduction of Derythroascorbyl free radical in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527, 31-38.
- **Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., et al., 1996.** Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique*, 56(3), 305-319.
- **Leonardi, O., Mints, G., Hussain, M.A., 2003.** Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol*, 149, 99–102.
- **Lerman, A., Zeiher, A.M., 2005.** Endothelial function: cardiac events, *Circulation*, 111, 363-368.
- **Leyral, G., Vierlingn E., 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments. 4^{ème} Ed- Doin. Bordeaux, Pp : 24-25.
- **Li , J., Li, Q.X., Xie, X.F., Ao, Y., Tie, C., Song, R.J., 2009.** Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats. *European Journal of Pharmacology*, 620, 97–104.
- **Li, W., Thakor, N., Xu, EY., Huang, Y., Chen, C., et al., 2010.** An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Research*, 38(3), 778-788.
- **Liao, Y.F., Tsai, M.L., Chen, C.C., Yen, C.T., 2011.** Involvement of the Cav3.2 T-type calcium channel in thalamic neuron discharge patterns. *Molecular Pain*, (7), 43
- **Lisk, C., Irwin, D., Connor, I., 2012.** Off Target therapeutic effects of commonly used drugs to treat acute mountain sickness. *The FASEB Journal*, 26, 1b776.
- **Lisk, C., McCord, J., Bose, S., Sullivan, T., Loomis, Z., et al., 2013.** Nrf2 Activation: A potential strategy for the prevention of Acute Mountain Sickness. *Free Radic Biol Med*, 63, 264-273.
- **Lory, P., Bidaud, I., Chemin, J., 2006.** T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium*, 40, 135-146.
- **Lu, C., Chan, S.L., Fu, W., Mattson, M.P., 2002.** The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal facilitates opening of voltage-dependent Ca²⁺ channels in neurons by increasing protein tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24368-24375.
- **Lushchak, V.I., 2014.** Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.

M

- **Ma, B., Prueksaritanont, T., Lin, J.H., 2000.** Drug interaction with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metab. Dispos*, 28, 125-130.
- **Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2000.** Brock Biology of microorganisms. Upper Saddle River: Prentice Hall.
- **Maedler, K., Spinass, G.A., Lehmann, R., Sergeev, P., Weber, M., et al., 2001.** Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*, 50, 1683–1690.
- **Maenpaa, J., Ruskoaho, H., Pelkonen, O., 1989.** Inhibition of hepatic microsomal drug metabolism in rats by five calcium antagonists. *Pharmacol. Toxicol*, 64, 446–450.
- **Mak, I.T., Zhang, J., Weglicki., 2002.** Protective effects of dihydropyridines Ca-blockers against endothelial cell oxidative injury due to combined nitric oxide and superoxide. *Pharmacological Research*, 45, 27-33.
- **Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., et al., 2007.** The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia*, 50, 2486–2494.
- **Matsubara, M., Akizuki, O., Ikeda, J., Saeki, K., Yao, K., Sasaki, K., 2008.** Benidipine, an anti-hypertensive drug, inhibits reactive oxygen species production in polymorphonuclear leukocytes and oxidative stress in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *European Journal Of Pharmacology*, 580, (1–2), 201-213.
- **Massart, A., 2011.** Supplémentation en oméga 3 et antioxydant et stress oxydant au cours d'un entraînement de judo. Thèse de Doctorat. Université d'Orléans. P 16.
- **Masters, B.S., Marohnic, C.C., 2006.** Cytochromes P450- a family of proteins and scientists-understanding their relationships. *Drug Metabolism Review*, 38, 209–225.
- **Matuo, R., Sousa, F.G., Soares, D.G., Bonatto, D., Saffi, J., et al., 2012.** *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 70(4), 491-502.
- **Mazars, C., Thuleau, P., Lamotte, O., Bourque, S., 2010.** Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Molecular Plant*, 3(4), 706–718.

- **Mediouni C., Ben Ammar W., Houlné G., Chabouté M.E., Jamal F., 2009.** Cademium and copper induction of oxidative stress and antioxydative reponse in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regul*, 57, 89-99.
- **Meštrović, J., Drmić-Hofman, I., Pogorelić, Z., Vilović, K., Šupe-Domić, D., et al., 2014.** Beneficial effect of nifedipine on testicular torsion-detorsion injury in rats. *Urology*, 84 (5), 1194-1198.
- **McDonough, S.I., 2004.** Calcium Channel Pharmacology. Springer. Kluwer Academics/Plenum publishers. New York. 418 pages
- **McDonough, S.I., Bean, B.P., 2010.** Calcium Channels. Willey and sons. eLs.
- **McRory, J. E., Hamid, J., Doering, C. J., Garcia, E., Parker, R., et al., 2004.** The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *Journal of Neuroscience*, 24, 1707–1718.
- **Meijer, L., 2003.** Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, 5, 311-326.
- **Menacho-Márquez, M., Murguía, J.R., 2007.** Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clinical and Translational Oncology*, 9(4), 221-228. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462974>)
- **Menager, M.T., Garnier-Laplau, J., Gayffon, M., 2009.** Toxicologie nucléaire, environnementale et humaine. Ed Lavoisier. France. P 216 (812 pages).
- **Menezes-Rodrigues, F.S., Pires-Oliveira, M., Duarte, T., Paredes-Gamero, E.J., Chiavegatti, T., Oliveira Godinho, R., 2013.** Calcium influx through L-type channels attenuates skeletal muscle contraction via inhibition of adenylyl cyclases. *European Journal of Pharmacology*, 720, 326–334.
- **Meunier, B., Fisher, N., Ransac, S., Mazat, J.P., Brasseur, G., 2013.** Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827, 1346–1361.
- **Misiewicz, A., Dziewit, T., Radwan, K., Srodoń-Sikora, I., Szota, M., et al., 1997.** The effect of nifedipine on peroxidation and some antioxidant factors in polymorphonuclear granulocytes of peripheral blood. *Polski Merkurusz Lekarski*, 2 (12), 368-370.
- **Miura, S., Fujino, M., Matsuo, Y., Tanigawa, H., Saku, K., 2005.** Nifedipine-induced vascular endothelial growth factor secretion from coronary smooth muscle cells promotes endothelial tube formation via the kinase insert domain-containing receptor/fetal liver Kinase-1/NO Pathway. *Hypertensin Research*, 28 (2), 147–153.

- **Mo, C., Wang, L., Zhang, J., Numazawa, S., Tang, H., et al., 2014.** The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. *Antioxidants and Redox Signal*, 20(4), 574-588.
- **Mohammadkhani, N., Heidari, R., 2008.** Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology*, 32, 23-30.
- **Monteil, A., Chemin, J., Bourinet, E., Mennessier, G., Lory, P., Nargeot, J., 2000.** Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(9): p. 6090-100.
- **Mooradian, A.D., Haas, M.J., 2011.** Glucose-induced endoplasmic reticulum stress is independent of oxidative stress: A mechanistic explanation for the failure of antioxidant therapy in diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 1140–1143.
- **Morakinyo, A.O., Iranloye, B.O., Adegoke, O.A., 2009.** Antireproductive effect of calcium channel blockers on male rats. *Reproductive Medicine and Biology*, 8, 97-102.
- **Morakinyo, A.O., Iranloye, B.O., Daramola, A.O., OA Adegoke, O.A., 2011.** Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress. *Advances in Medical Sciences*, 56 (1), 95-105.
- **Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., Saavedra, E., 2007.** Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal*, 274(6), 1393-1418.
- **Morgan, D.L., 2007.** The cell cycle: principles of control. London: New Science Press. pp. 30–31.
- **Munaron. L., Antoniotti, S., Fiorio Pla, A., Lovisolo, D., 2004.** Blocking Calcium entry : a way to controll cell proliferation. *Current Medicinal Chemistry*, 11(12), 1533- 1543. **(b)**
- **Munaron. L., Antoniotti, S., Lovisolo, D., 2004.** Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(2), 161-168. **(a)**
- **Murphy, A. N., Kelleher, J. K., Fiskum, G., 1990.** Submicromolar Ca²⁺ regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10527-10534.
- **Murray, M., Butler, A.M., 1996.** Enhanced inhibition of microsomal cytochrome P450 3A2 in rat liver during diltiazem biotransformation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279, 1447–1452.

- **Mustacchi, R., Hohmann, S., Nielsen, J., 2006.** Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast* 23, 227–238.

N

- **Nargeot, J., 2000.** A tale of two (Calcium) channels. *Circulation Research*, 86 (6), 613-615.
- **Nehme, N., 2008.** Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* : impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Thèse Doctorat. Univ Toulouse. Pp 4-7.
- **Neumann, D., Suter, M., Tuerk, R., Riek, U., Wallimann, T., 2007.** Co-expression of LKB1, MO25alpha and STRADalpha in bacteria yield the functional and active heterotrimeric complex". *Molecular Biotechnology*, 36 (3), 220–231.
- **Nikonenko, I., Bancila, M., Bloc, A., Muller, D., Bijlenga, P., 2005.** Inhibition of T-Type Calcium Channels Protects Neurons from Delayed Ischemia-Induced Damage. *Molecular Pharmacology*, 68 (1), 84-89.

O

- **Ono, K., Iijima, T., 2010.** Cardiac T-type Ca(2+) channels in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(1), 65-70.
- **Opatowski, Y., Chen, C.C., Campbell, K.P., Hirsch, J.A., 2004.** Structural analysis of the voltage-dependent Ca²⁺ : channel β subunits functional core and its complex with the $\alpha 1$ interaction domain. *Neuron*, 42, 387-399.
- **Orecna, M., Hafko, R., Toporcerova, V., Strbak, V., Bacova, Z., 2010.** Cell swelling-induced insulin secretion from INS-1E cells is inhibited by extracellular Ca²⁺ and is tetanus toxin resistant. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26, 197–208.
- **Oswald, M., 2006.** Déterminisme génétique de la biosynthèse des terpénols aromatiques chez la vigne. Thèse Doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg 1.
- **Oteng-Gyang, K., 1984.** Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris. Pp: 43-46.

P

- **Padovani, T.R., Guyatt, G., Lopes, L.C., 2015.** Nifedipine versus terbutaline, tocolytic effectiveness and maternal and neonatal adverse effects: a randomized, controlled pilot trial. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(3), 244-250
- **Pankratov, Y., Lalo, U., 2013.** Calcium permeability of ligand-gated Ca²⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, 739, 60-73.
- **Passacuale, G., Desideri, G., Croce, G., Murgo, S., Mancarelli, M.M., et al., 2008.** Nifedipine improves the migratory ability of circulating endothelial progenitor cells depending on manganese superoxide dismutase upregulation. *Journal of Hypertension*, 26(4), 737-746.
- **Patergnani, S., Suski, J.M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., et al., 2011.** Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Communication and Signaling*, 9:19. <http://www.biosignaling.com/content/pdf/1478-811X-9-19.pdf> (consulté le 12 septembre 2014 à 21h 26).
- **Peiter, E., Fischer, M., Sidaway, K., Roberts, S.K., Sanders, D., 2005.** The *Saccharomyces cerevisiae* Ca²⁺ channel Cch1pMid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Letters*, 579, 5697–5703.
- **Penninckx, M.J., 2002.** An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2, 295-305.
- **Pepe, S., 2000.** Mitochondrial function in ischaemia and reperfusion of the ageing heart. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27(9), 745-750.
- **Perez-Reyes, E., 2003.** Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological Review*, 83(1), 117-161.
- **Perez-Reyez, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., et al., 1998.** Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*, 391, 896-900.
- **Perez-Reyez, E., 1999.** Three for T : molecular analysis of the low-voltage-activated calcium channel family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56, 660-669,
- **Perez-Reyez, E., Schneider, T., 1995.** Molecular biology of calcium channels. *Kidney International*, 48, 1111-1124,

- **Perisse, E., 2009.** Le calcium, un déclencheur moléculaire de la formation de la mémoire olfactive à long terme chez l'abeille : approches comportementale et transcriptomique. Theses de Doctorat. Université de Toulouse. Pp 183.
- **Peter, H., Ray, R., Evert, F., Eichhorn, S.E., 2003.** Biologie végétale. 1ère édition (traduite). Edition De Boeck université. Paris. Pp 330-331.
- **Petit, T., Diderich, J.A., Kruckeberg, A.L., Gancedo, C., Van Dam, K., 2000.** Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182(23), 6815-6818.
- **Pichard, L., Fabre, I., Fabre, G., Domergue, J., Saint, A.B., Mourad, G., Maurel, P., 1990.** Cyclosporin A drug Interactions. Screening for inducers and inhibitor of cytochrome P450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 18, 595– 606.
- **Piro, S., Anello, M., Di Pietro, C., Lizzio, M.N., Patane, G., et al., 2002.** Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. *Metabolism*, 51, 1340–1347.
- **Pitt, B., 1997.** Diversity of calcium antagonist. *Clinical Therapy*, 19, 3 - 17.
- **Pivetti, C.D., Yen, M.R., Miller, S., Busch, W., Tseng, Y.H., et al., 2003.** Two families of mechanosensitive channel protein. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 66-85.
- **Pocsi, I., Prade, R.A., Penninckx, M.J., 2004.** Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49, 1-76.
- **Poitout, V., Robertson, R.P., 2008.** Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocrine Reviews*, 29, 351–366.
- **Pol, D., 2000.** Travaux Pratiques de Biologie des Levures, Ellipses, 59-107.
- **Poole-Wilson, P.A., Kirwan, B.A., Vokó, Z., de Brouwer, S., van Dalen, F.J., Lubsen, J., ACTION Investigators., 2006.** Safety of nifedipine GITS in stable angina: the ACTION trial. *Cardiovascular Drugs Therapy*, 20(1), 45-54.
- **Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., Mattanovich, D., 2005.** Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*, 31, 245–259.
- **Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 2003.** Microbiologie. 2eme Ed. De Boeck Bruxelles. 1137 pages: pp112-115.

- **Prevarskaya, N., Skryma, R., Bidaux, G., Flourakis, M., Shuba, Y., 2007.** Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ*, 14 (7), 1295-1304.
- **Priault, M., Camougrand, N., Kinnally, K.W., Vallette, F.M., Manon, S. 2003.** Yeast as a tool to study Bax/mitochondrial interactions in cell death. *FEMS Yeast Res* 4, 15-27.
- **Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., La Du, B.N., 1996.** The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33, 498-507.
- **Purves *et al.*, 1999.** Neurosciences. De Boeck Universités, Bruxelles.

Q

- **Qaddouri, B., Guaadaoui, A., Bellirou, A., Hamal, A., et al., 2011.** The Budding Yeast “*Saccharomyces cerevisiae*” as a Drug Discovery Tool to Identify Plant-Derived Natural Products with Anti-Proliferative Properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-5.
- **Quillen, E.E., Rainwater, D.L., Dyer, T.D., Carless, M.A., et al., 2012.** Novel associations of nonstructural Loci with paraoxonase activity. *Journal of Lipids*, 189681, 1-7.

R

- **Raab, A.M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D., Lang, C., 2010.** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metabolic Engineering*, 12, 518–525.
- **Rabkin, S.W., Kong, J.Y., 2000.** Nifedipine does not induce but rather prevents apoptosis in cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, 338 (3), 209-217.
- **Racioppi, L., Means, A.R., 2008.** Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses: novel routes for an ancient traveler. *Trends in Immunology*, 29 (12), 600-607.
- **Raemsch, K.D., Sommer, J., 1983.** Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine. *Hypertension*, 5(4), 118-24.

- **Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K., 2007.** Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1, 3159 – 3165.
- **Randall, A., Benham, C.D., 1999.** Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 14, 255-272.
- **Rasmussen, M.K., Zamaratskaia, G., 2014.** Regulation of Porcine Hepatic Cytochrome P450-Implication for Boar Taint. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 11, 106–112.
- **Ray, S., Mondal, S., Dana, N., 2012.** Evaluation of protective role of nifedipine on lipid peroxidation using reduced glutathione as model marker. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 1(2), 97-100.
- **Rey, M., 2009.** Transporteur mitochondrial d'ADP/ATP : étude par échange hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse et caractérisation de mutations pathogènes. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier - Grenoble 1. France. P 51-52.
- **Richards, M.W., Butchern, A.J., Dolphin, A.C., 2004.** Ca²⁺ channel β -subunits: structural insights aid our understanding. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, 626–632.
- **Rintala, E., Toivari, M., Pitkänen, J.P., Wiebe, M.G., Ruohonen, L., Penttilä, M., 2009.** Low oxygen levels as a trigger for enhancement of respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMed Central Genomics*, 10, 461.
- **Roderick, H., Cook, S.J., 2008.** Ca²⁺ signaling checkpoints in cancer: remodeling Ca²⁺ for cancer proliferation and survival. *Nature Review Cancer*, 8(5), 361-375.
- **Rodriguez, C.E., Shinyashiki, M., Froines, J., Chun Yu, R., Fukuto, J. M., Cho, A. K., 2004.** An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology*, 201,185-196.
- **Rodriguez, R., Meuth, M., 2006.** Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Molecular Biology of the Cell*, 17 (1), 402–412.
- **Rojas-Rivera, D., Díaz-Elizondo, J., Parra, V., Salas, D., Contreras, A., et al., 2009.** Regulatory volume decrease in cardiomyocytes is modulated by calcium influx and reactive oxygen species. *FEBS Letters*, 583, 3485-3492.
- **Rosenberg, S.S., Spitzer, N.C., 2011.** Calcium Signaling in Neuronal Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 42-59.

- **Rosenblat, M., Vaya, J., Shih, D., Aviram, M., 2005.** Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL- mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 179, 69-77.
- **Rossell, S., van der Weijden, C.C., Kruckeberg, A., Bakker, B.M., Westerhoff, H.V., 2002.** Loss of fermentative capacity in baker's yeast can partly be explained by reduced glucose uptake capacity. *Molecular Biology Reports*, 29, 255–257.
- **Rossi, A.E., Dirksen, R.T., 2006.** Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*, 33, 715-731.
- **Roussel, X., 2009.** Enzymologie moléculaire d'une sulfinyl réductase, la sulfirédoxine : caractérisation du mécanisme catalytique. These de doctorat. Université de Nancy. Pp205.
- **Rousset, M., Charnet, P., Cens, T., 2005.** Structure of the calcium channel beta subunit: the place of the beta-interaction domain. *Medecine Science*, 21(3), 279-283.
- **Rudiger, J.J., Roth, M., Bihl, M.P., Cornelius, B.C., Johnson, M., et al., 2002.** Interaction of C/EBP- α and the glucocorticoid receptor in vivo and in nontransformed humain cell. *FASEB Journal*, 16, 177–184
- **Rui, O., Hahn, M., 2007.** The *Botrytis cinerea* hexokinase, Hxk1, but not the glucokinase, Glk1, is required for normal growth and sugar metabolism, and for pathogenicity on fruits. *Microbiology*, 153(8), 2791-2802.
- **Russmann, S., Lauterburg, B. H., 2009.** Lésions hépatiques toxiques médicamenteuses. *Forum Med Suisse*, 44, 1044-1050.

S

- **Saib, A., Berrebbah, H., Berredjem, M., Djebar, M.R., 2014.** Cytotoxic study of three derivatives amidophosphonates on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia*. *Toxicology Research*, 3, 395–399.
- **Saida, K., van Breemen, C., 1983.** Mechanism of Calcium antagonist-induced vasodilation. Intracellular actions. *Circulation Research*, 52, 137–142.
- **Sala, S., Matteson, D. R. (1990).** Single-channel recordings of two types of calcium channels in rat pancreatic beta-cells. *Biophysical Journal*, 58, 567-571.

- **Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P., 2008.** Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1-13.
- **Sasaki, H., Watanabe, F., Murano, T., Miyashita, Y., Shirai, K., 2007.** Vascular smooth muscle cell apoptosis induced by 7-ketocholesterol was mediated via Ca²⁺ and inhibited by the calcium channel blocker nifedipine. *Metabolism Clinical and Experimental*, 56, 357– 362.
- **Satrustegui, J., Pardo, B. Del Arco, A., 2007.** Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiological Review*, 87(1), 29-67.
- **Satyanarayana, A., Kaldis, P., 2009** .Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28, 2925–2939.
- **Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A., Perry, G., 2005.** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali dell’Istituto Superiore di Sanità*, 41(2), 143-164.
- **Sbartai, I., Berrebbah, H., Rouabhi, R., Sbartai, H., et al. 2009.** Behavior of *Paramecium* Sp., Treated with Bifenazate with Special Emphasis on Respiratory Metabolism, Protein and Generation Time. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 1 (1), 13-18.
- **Schachinger, V., Britten, M.B., Zeiher, A.M., 2000.** Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 10, 1899–1906.
- **Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001.** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191-212.
- **Schafer, F.Q., Buettner, G.R.,** Redox state and redox environment in biology. In : **Forman, R.J., Fukuto, J., and Torres, M., 2003.** eds. *Signal transduction by reactive Oxygen and Nitrogen Species : pathways and chemical principles.* Kluwer Academic Publ, Chapter 1.
- **Schild L, Bukowska A, Gardemann A, Polczyk P, Keilhoff G,** et al., 2006. Rapid pacing of embryoid bodies impairs mitochondrial ATP synthesis by a calcium-dependent mechanism--a model of in vitro differentiated cardiomyocytes to study molecular effects of tachycardia. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1762(6), 608-615.

- **Schmidt-Mende, J., Gogvadze, V., Hellström-Lindberg, E., Zhivotovsky, B., 2006.** Early mitochondrial alterations in ATRA-induced cell death. *Cell death and Differentiation*, 13, 119–128.
- **Scriban, R., 1993.** *Biotechnologie. (4ème Ed) Technologie et documentation - Lavoisier.* Paris, 886 p.
- **Sedova, M., Dedkova, E.N., Blatter, L.A., 2006.** Integration of rapid cytosolic Ca^{2+} signals by mitochondria in cat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291, C840-50.
- **Seino, S., Shibasaki, T., Minami, K., 2011.** Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 2118–2125.
- **Serviddio, G., Bellanti, F., Vendemiale, G., 2013.** Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 952–968.
- **Servais, S., 2004.** Alteration mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en reponse à l’ozone: effets de l’age et une supplémentation d’omega-3. These de doctorat. Claude Bernard- Lyon-1 Université. France. Pp 48-49.
- **Shackelford, D.B., Shaw, R.J., (2009).** The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Review. Cancer*, 9, 563–575.
- **Shanish Antony, A., Gudluru, S., Pal, B., Vadivelan, R., et al., 2010.** Indomethacin, nifedipine and its combination produced anti-parkinson’s activity in 6-ohda lesioned rat model. *Pharmacie Globale (IJCP)*, 01 (04), 1-3.
- **Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., et al., 2004.** The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 3329-3335.
- **Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001.** Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360, 1-16.
- **Shen, A.L., and Kasper, C.B., 1993.** Protein and gene structure and regulation of NADPH-Cytochrome P450 oxidoreductase, in *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 105, Schenkman, J.B., and Greim, H., eds., Springer, (New York, NY: 1993) pp. 35-59.

- **Silvers, K.J., Chazinski, T., McManus, M.E., Bauer, S.L., et al., 1992.** Cytochrome P-450 3A4 (Nifedipine Oxidase) Is Responsible for the C-oxidative Metabolism of 1-Nitropyrene in Human Liver Microsomal Samples. *Cancer Research*, 1992, 52: 6217-6241.
- **Simon, J.A., Yen, T.J., 2003.** Novel Approaches to Screen for Anticancer Drugs Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, 223, 555-576.
- **Simons, T.J., 1988.** Calcium and neuronal function. *Neurosurgical Review*, 11, 119-129.
- **Sinnegger-Brauns, M.J., Huber, I.G., Koschak, A., Wild, C., et al., 2009.** Expression and 1,4-Dihydropyridine-Binding Properties of Brain L-Type Calcium Channel Isoforms. *Molecular Pharmacology*, 75 (2), 407-414.
- **Sirmagul, B., Kilic, F.S., Tunc, O., Yildirim, E., Erol, K., 2006.** Effects of verapamil and nifedipine on different parameters in lipopolysaccharide-induced septic shock. *Heart Vessels*, 21(3),162-168.
- **Sirmagul, B., Kilic, F.S., Tunc, O., Yildirim, E., Erol, K., 2006.** Effects of verapamil and nifedipine on different parameters in lipopolysaccharide-induced septic shock. *Heart Vessels*, 21(3), 162-168.
- **Sirota, R., Gibson, D., Kohen R., 2015.** The role of the catecholic and the electrophilic moieties of caffeic acid in Nrf2/Keap1 pathway activation in ovarian carcinoma cell lines. *Redox Biology*, 4, 48–59.
- **Smith, A.M., Ammar, R., Nislow, C., Giaever, G., 2010.** A survey of yeast genomic assays for drug and target discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 127, 156-164.
- **Sobal, G., Menzel, E.J., Sinzinger, H., 2001.** Calcium antagonists as inhibitors of *in vitro* low density lipoprotein oxidation and glycation. *Biochemical Pharmacology*, 61, 373–379.
- **Sonkusare, S., Palade, P.T., Marsh, J. ., Telemaque, S., Pesic, A., Rusch, N.J., 2006.** Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. *Vascular Pharmacology*, 44, 131-142.
- **Stadtman, E.R., 2006.** Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40, 1250-1258.
- **Stanford, S.C., 2014.** Psychostimulants, antidepressants and neurokinin-1 receptor antagonists (‘motor disinhibitors’) have overlapping, but distinct, effects on monoamine transmission: The involvement of L-type Ca²⁺ channels and implications for the treatment of ADHD. *Neuropharmacology*, 87, 9-18.

- **Stead, S., Werstiuk, E.S., Lee, R.M., 2000.** Nifedipine induces apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Life Science*, 67(8), 895-906.
- **Stepanov, A., Nitiss, K.C., Neale, G., Nitiss, J.L., 2008.** Enhancing Drug Accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* by Repression of Pleiotropic Drug Resistance Genes with Chimeric Transcription Repressors. *Molecular Pharmacology*, 74 (2), 423-431.
- **Striessnig, J., Koschak, A., 2008.** Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca_v2.1 channels with gene knockout models. *Channels (Austin)*, 2, 233–251.
- **Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P., 2014.** L-type Ca_v2.1 channels in heart and brain. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 3(2), 15–38.
- **Sturgeon, C.M., Kemmer, D., Anderson, H.J., Roberge, M., 2006.** Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnology Journal*, 1, 289-298.
- **Sugiura, T., Kondo, T., Kureishi-Bando, Y., et al., 2008.** Nifedipine Improves Endothelial Function: Role of Endothelial Progenitor Cells. *Hypertension*, 52, 491-498.
- **Sung, J.Y., Choi, H.C., 2012.** Nifedipine inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and reactive oxygen species production through AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Vascular Pharmacology*, 56, 1–8.
- **Syeda, K., Mohammed, A.M., Arora, D.K., Kowluru, A., 2013.** Glucotoxic conditions induce endoplasmic reticulum stress to cause caspase 3 mediated lamin B degradation in pancreatic β -cells: Protection by nifedipine. *Biochemical Pharmacology*, 86 (9), 1338-1346.

T

- **Tadmouri, A., 2007.** Les déterminants moléculaires et cellulaires de la mutation humaine R482X de la sous-unité Cav_v4 impliqués dans l'épilepsie. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier.
- **Takahashi, T., Momiyama, A., 1993.** Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*, 366, 156–158.
- **Talbert, M., Gérard Willoquet, G., Gervais, R., 2009.** Le guide pharmaco clinique. Wolters Kluwer France, 1063 pages.

- **Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., et al., 1987.** Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 328(6128), 313-318.
- **Tang, C., Koulajian, K., Schuiki, I., Zhang, L., Desai, T., et al.(2012).** Glucose-induced beta cell dysfunction in in vivo in rats: link between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Diabetologia*, 55, 1366–1379.
- **Taylor, J.T., Huang, L., Keyser, B.M., Zhuang, H., Clarkson, C.W., Li, M., 2005.** Role of high-voltage-activated calcium channels in glucose-regulated beta-cell calcium homeostasis and insulin release. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 289, E900–E908.
- **Teng, J., Goto, R., Iida, K., Kojima, I., Iida, H., 2008.** Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium-channel homologue Cch1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 154, 3775–3781.
- **Tenti, G., Egea, J., Villarroya, M., León, R., Fernandez, G.C., et al., 2013.** Identification of 4,6-diaryl-1,4-dihydropyridines as a new class of neuroprotective agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 4, 590-594.
- **Teramoto, V., Brading, F.A., 1998.** The effects of nifedipine and other calcium antagonists on the glibenclamide-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from pig urethra. *British Journal of Pharmacology*, 123, 1601-1608.
- **Territo, P. R., Mootha, V. K., French, S. A., Balaban, R. S., 2000.** Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase". *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 278(2), C423-435
- **Thomas, S.E., Dalton, L., Malzer, E., Marciniak, S.J., 2011.** Unravelling the story of protein misfolding in diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 2(7), 114-118.
- **Thompson C., Macaulay, V., O'Byrne, K., Kemp, G.J., Wilnerl, S., et al., 1996.** Modulation of bryostatin 1 muscle toxicity by nifedipine: effects on muscle metabolism and oxygen supply. *British Journal of Cancer*, 73, 1161-1165.
- **Thuillez, C., 1998.** Médications cardiovasculaires et respiratoires. Paris : Hermann Ed. 1998,549p.
- **Thuriaux, P., 2004.** Les organismes modèles : "la levure" .Ed. DECLIN. Paris. 1-144 P
- **Todorova, T., 2007.** Glutathione S-transferases and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg I et Université de Sofia St. Kliment Ohridski. Pp 155.

- **Todorovic, S.M., Pathirathna, S., Brimelow, B.C., Jagodic, M.M., Ko, S.H., et al., 2004.** 5beta-reduced neuroactive steroids are novel voltage-dependent blockers of T-type Ca²⁺ channels in rat sensory neurons *in vitro* and potent peripheral analgesics *in vivo*. *Molecular Pharmacology*, 66, 1223-1235.
- **Toone, W.M., Jones, N., 1999.** AP-1 transcription factors in yeast. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(1), 55-61.
- **Tottene, A., Volsen, S., Pietrobon, D., 2000.** Alpha(1E) subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *Journal of Neuroscience*, 20, 171–178. **Trancikova, A., Weisova, P., Kissova, I., Zeman, I., Kolarov, J., 2004.** Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-xL. *FEMS Yeast Research*, 5, 149-156.
- **Triggle, D.J., Gopalakrishnan, M., Rampe, D., Zheng, W., 2006.** Voltage-Gated Ion Channels as Drug Targets, Volume 29. John Wiley & Sons.
- **Triggle, D.J., Gopalakrishnan, M., Rampe, D., Zheng, W., 2006.** Voltage-Gated Ion Channels as Drug Targets. John Wiley & Sons, 21 août 2006: 492 pages
- **Tschudi, M.R., Mesaros, S., Luscher, T.F., Malinski, T., 1996.** Direct *in situ* measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries: increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension*, 27, 32–35.
- **Tuckwell, H.C., 2012.** Quantitative aspects of L-type Ca²⁺ currents. *Progress in Neurobiology*, 96 (1), 1-31.
- **Tulasamma, P., Venkateswarlu, P., 2012.** Spectrophotometric determination of nifedipine in pharmaceutical formulations, serum and urine samples via oxidative coupling reaction. *Arabian Journal of Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.025> consulté le 15 septembre 2013 à 15h08.

U

- **Um HC, Jang JH, Kim DH, Lee C, Surh YJ. (2011).** Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells. *Nitric Oxide*; 25(2) :161-168.

V

- **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44–84.
- **Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005.** Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161-1208.
- **Valverde, R.H., Britto-Borges, T., Lowe, J., Einicker-Lamas. M., Mintz, E., Cuillel, M., and Vieyra, A. 2010.** Two serine residues control sequential steps during catalysis of the yeast copper ATPase through different mechanisms that involve kinase-mediated phosphorylations. *Journal of Biological Chemistry*.
- **Valverde, R.H.F., Morin, I., Lowe, J., Mintz, E., Cuillel, M., and Vieyra, A., 2008.** Cyclic AMP-dependent protein kinase controls energy interconversion during the catalytic cycle of the yeast copper-ATPase. *FEBS Letters*, 582(6), 891-895.
- **Van Gaal, L.F., Mertens, I.L., De Block, C.E., 2006.** Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444 (2006), 875–880.
- **Van Leeuwen, J.S., Vredenburg, G., Dragovic, S., Tjong, T.F.J., et al., 2010.** Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. *Toxicology Letters*, 200 (3), 162-168.
- **Van Maris, A.J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M. et al., 2006.** Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Leeuwenhoek*, **90**, 391–418.
- **Vargas, F.A., Aceituno, F.F., et al., 2010.** Biochemistry and Molecular Biology of Yeast Alcoholic Fermentation. *Comprehensive Food Fermentation and Biotechnology*. Pandey, A., Soccol, C.R., Gnansounou E., et al. New Delhi, India, Asiatech Publishers. 2.
- **Vergnani, L., Hatrik, S., Ricci, F., Passaro, A., Manzoli, N., et al., 2000.** Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation*, 101, 1261–1266.
- **Verhaar, M.C., Honing, M.L., van Dam, T., Zwart, M., Koomans, H.A., et al., 1999.** Nifedipine improves endothelial function in hypercholesterolemia, independently of an effect on blood pressure or plasma lipids. *Cardiovascular Research*, 42, 752–760.
- **Verkhatsky, A., Parpura, V., 2014.** Calcium signaling and calcium channels: Evolution and general principles. *European Journal of Pharmacology*, 739, 1-3.

- **Vitcheva, V., Kondeva-Burdina, M., Mitcheva, M., 2009.** D-amphetamine toxicity in freshly isolated rat hepatocytes: a possible role of CYP3A. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60, 139-145.
- **Vitcheva, V., Simeonova, R., Karova, D., Mitcheva, M., 2010.** Nifedipine lowers cocaine-induced brain and liver enzyme activity and cocaine urinary excretion in rats. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 62, 131-137.
- **Voet, D., Voet, J.G., 2005.** *Biochimie*. 2e ED. Edition De Boeck, pp. 837. Bruxelles.

W

- **Waghmare, A., Kanyalkar, M., Panicker, L., Srivastava, S., 2011.** Glass transition temperature (T_g) as a measure of sperm fertility: Effect of antifertility drug nifedipine and its analogues. *Thermochimica Acta*, 523, 232– 236.
- **Wahl, M.A., Koopmann, I., Ammon, H.P., 1998.** Oxidative stress causes depolarization and calcium uptake in the rat insulinoma cell RINm5F. *Experimental and clinical endocrinology diabetes* 106 (3), 173-177
- **Walker, G., 1998.** *Yeast Physiology and Biotechnology*, Wiley, West Sussex.
- **Wang, G., Dayanithi, G., Newcomb, R., Lemos, JR., 1999.** An R-type Ca(2+) current in neurohypophysial terminals preferentially regulates oxytocin secretion. *Journal of Neuroscience*, 19, 9235–9241.
- **Wang, G.X., Poo, M.M., 2005.** Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature*, 434, 898–904.
- **Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., et al., 1999.** Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin de phosphorylation of BAD. *Science*, 284, 339–343.
- **Wang, L., Wang, L., Li, F.J., Wang, L.S., Wang, M.H., 2011.** Modulation of Endogenous Peroxidase by Exogenous Peroxidase in Chinese Red Radish Seedling. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 52(5), 448-454.
- **Wang, Y., Mattson, M.P., 2014.** L-type Ca²⁺ currents at CA1 synapses, but not CA3 or dentate granule neuron synapses, are increased in 3xTgAD mice in an age-dependent manner. *Neurobiology of Aging*, 35, 88-95.

- **Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Stteitz, J. A., Wainer, A.M. 1987.** Yeast as the E. coli of eucaryotic cell. Molecular biology of the gene. Benjamin-Cummings, 550-593.
- **Weckberker, G., Cory, G., 1988.** Ribonucléotide reductase activity abd growth of glutathione depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. Cacer letters, 40, 257-264.
- **Weiss, N., De Waard, M., 2006.** Les canaux calciques dépendants du voltage au coeur de la douleur. Medecine/Science, 22 (4), 396-404.
- **Weiss, N., Tournier-Lasserre, E., De Waard, M., 2007.** Rôle du canal calcique P/Q dans la migraine hémiplégique familiale. Médecine/Sciences, 23(1), 53-63.
- **Willson, T.M., Kliewer, S.A., 2002.** PXR, CAR and drug metabolism. Nature Reviews, 1, 259– 266.
- **Winterbourn, C.C., 2015.** Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? Free Radical Biology and Medicine, 80, 167-170.
- **Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., et al., 2005.** C(Ca²⁺)/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. Cell Metabolism, 2, 21-33.
- **Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., et al., 2003.** LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Current Biology, 13, 2004-8
- **Wright, R.M., Simpson, S.L., Lanoil, B.D., 1995.** pH and the cAMP-dependant protein kinase mediate growth phase induction of the cytochrome c oxidase subunit VI gene, COX6, in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and biophysical research communications, 214, 3, 1051-1059
- **Wu, J.R., Liou, S.F., Lin, S.W., Chai, C.Y., Dai, Z.K., et al., 2009.** Lercanidipine inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation via reducing intracellular reactive oxygen species and inactivating Ras-ERK1/2 signaling. Pharmacological Research, 59, 48–56.

X

- **Xia, C., Panda, SP., Marohnic, C.C., Martásek, P., Masters, B.S., Kim, J.J.P., 2011.** Structural basis for human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase

deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108 (33), 13486-13491.

- **Xia, M., Imredy, J.P., Koblan, K.S., Bennett, P., Connolly, T.M., 2004.** State-dependent inhibition of L-type calcium channels: cell-based assay in high-throughput format. *Analytical Biochemistry*, 327, 74-81.
- **Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J.C., 2005.** Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2656–2664.
- **Xu, G., Chen, J., Jing, G., Shalev, A., 2012.** Preventing b-cell loss and diabetes with calcium channel blockers. *Diabetes*, 6, 848–856.

Y

- **Yagami, T., Ueda, K., Sakaeda, T., Itoh, N., Sakaguchi, G., et al., 2004.** Protective effects of a selective L-type voltage-sensitive calcium channel blocker, S-312-d, on neuronal cell death. *Biochemical Pharmacology*, 67, 1153-1165.
- **Yamagishi, S., Nakamura, K., Takenaka, K., Matsui, T., Pleiotropic, I.H., 2006.** Effects of nifedipine on atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 1543–1547.
- **Yamamoto, E., Nakamura, T., Kataoka, K., Tokutomi, Y., et al., 2010.** Nifedipine prevents vascular endothelial dysfunction in a mouse model of obesity and type 2 diabetes, by improving eNOS dysfunction and dephosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 403, 258–263.
- **Yamamoto, H., Kawada, T., Shimizu, S., Kamiya, A., Turner, M.J., et al., 2015.** Acute effects of intravenous nifedipine or azelnidipine on open-loop baroreflex static characteristics in rats. *Life Sciences*, 126, 37-41.
- **Yamasato, K., Burlingame, J., Kaneshiro, B., 2015.** Hemodynamic effects of nifedipine tocolysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(1):17-22.
- **Yan, Z., Chi, P., Bibb, J.A., Ryan, T.A., Greengard, P., 2002.** Roscovitine: a novel regulator of P/Q-type calcium channels and transmitter release in central neurons. *Journal of Physiology (London)*, 540, 761–770.
- **Yan, Y., Wei, C., Zhang, W., Cheng, H., Liu, J., 2006.** Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 (7), 821–826.

- **Yang, L., Qu, M., Wang, Y., Duan, H., Chen, P., et al., 2013.** Trichostatin A Inhibits Transforming Growth Factor- β -Induced Reactive Oxygen Species Accumulation and Myofibroblast Differentiation via Enhanced NF-E2-Related Factor 2-Antioxidant Response Element Signaling. *Molecular Pharmacology*, 83(3), 671-680.
- **Yao, B., Mueller, D.M., 1999.** The role of the Amino-Terminal b barrel domain of the a and b subunits in the yeast F1-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(2), 95-104.
- **Yue, D.T., 2004.** The dawn of high-resolution structure of the queen of the ion channels. *Neuron*, 42, 357-361.

Z

- **Zafren, K., 2014.** Prevention of high altitude illness. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 12(1), 29-39.
- **Zanchetti, A., 1987.** Role of calcium antagonists in systemic hypertension. *American Journal of Cardiology*, 59, 130B–136B.
- **Zangar, RC., DR. Davydov, et Verma F. (2004).** Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316-331.
- **Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M., 2008.** Functional pharmacogenetics/ genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1093-1108.
- **Zanger, U.M., Schwab, M., 2013.** Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138 (1), 103-141.
- **Zampol, M.A., Busso, C., Gomes, F., Jose Ribamar Ferreira-Junior, J., Tzagoloff, A., Barros, M.H., 2010.** Over-expression of COQ10 in *Saccharomyces cerevisiae* inhibits mitochondrial respiration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402, 82–87.
- **Zucchi, R., Ronca-Testoni, S., 1997.** The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacology*, 49(1), 1-52.

- **Zhang, Z., Liew, C.W., Handy, D.E., Zhang, Y., Leopold, J.A., et al., 2010.** High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *FASEB Journal*, 24, 1497–1505.
- **Zhang, C., Peng, W., Wang, M., Zhu, J., Zang, Y., et al., 2010.** Studies on protective effects of human paraoxonases 1 and 3 on atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Gene Therapy*, 17, 626-633.
- **Zhang, Q., Sha Ma, A.Z., Wang, C., Tang, W., Song, Z., 2015.** Nifedipine inhibits ox-LDL-induced lipid accumulation in human blood-derived macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457, 440-444.
- **Zou, M.H., Shi, C., Cohen, R.A., 2002.** Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite, *Journal of Clinical Investigation*, 109, 817–826.
- **Ziesche, R., Petkov, V., Lambers, C., Erne, P., Block, L.H., 2004.** The calcium channels blocker amlodipine exerts its antiproliferative action via P21 (waf1/cip1) gene activation. *The FASEB Journal*, 18 (13), 1516-1523.

Lien internet

1. **Deby, C., Deby-Dupont, G., 2009.** L'oxygène et la vie: tome 1 - Initiation au métabolisme de l'oxygène - Chapitre XV: Défense contre l'oxydation incontrôlée. Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement, Université de Liège. Consulter le 1 octobre 2014 à 14h30
<http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/antiros.html>
2. **Fearnley, C.J., Roderick, H.L., Bootman, M.D., 2011.** Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. consulter le 17/01/ 2013 à 15h52.
<http://cshperspectives.cshlp.org/content/3/11/a004242.abstract>
3. **Fougeray, S., Bouvier, N., Beaune, P.C., Legendre, C., Anglicheau, D., Thervet, E., Pallet, N., 2011.** Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death and Disease*, 2, e143. doi:10.1038/cddis.2011.26
consulter le 16 Avril 2012 à 18h16.
<http://www.nature.com/cddis/journal/v2/n4/full/cddis201126a.html>
4. **Hill-Eubanks, D.C., Werner, M.E., Heppner, T.J., Nelson, M.T., 2011.** Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a004549
consulter le 23 Janvier 2012 à 15h58.
<http://cshperspectives.cshlp.org/content/early/2011/06/27/cshperspect.a004549>
5. <http://yeastgenome.org/>
6. **Zimmermann, K., Baldinger, J., Mayerhofer, B., Atanasov, A.G., Dirsch, V.M., Heiss, E.H., 2015.** Activated AMPK boosts the Nrf2/HO-1 signalling axis- a role for the unfolded protein response, *Free Radical Biology and Medicine*,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.030> consulter le 12 Avril 2015 à 16h22.