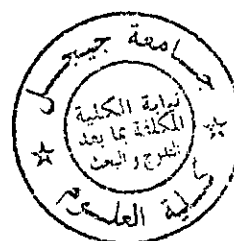


MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTRE EN BIOLOGIE
MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

OPTION : PHYTOPHARMACOLOGIE

THEME

***ETUDE COMPARATIVE IN VIVO ET IN VITRO DES EFFETS D'UN
TRAITEMENT PROLONGE PAR LES FLAVONOÏDES DE LA PROPOLIS
ALGERIENNE SUR LES FONCTIONS DES MITOCHONDRIES
ISOLEES À PARTIR DE FOIE DE RAT WISTAR***

Soutenu publiquement le 12 juillet 2006 par

HASSIBA ROUBAH

DEVANT LE JURY COMPOSE DE:

PRESIDENT	: Dr LEGHOUCHI Essaid	MC (Université de Jijel)
RAPPORTEUR	: Dr LAHOUEL Mesbah	MC (Université de Jijel)
EXAMINATEUR	: Pr DJEBBAR Mohamed- Reda	Pr (Université d'Annaba)
EXAMINATRICE	: Dr DJEBBAR Houria	MC (Université d'Annaba)
EXAMINATRICE	: Dr ABIDLI Nassira	MC (Université de Constantine)



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE JIJEL
FACULTÉ DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTRE EN BIOLOGIE
MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

OPTION : PHYTOPHARMACOLOGIE



THEME

***ETUDE COMPARATIVE IN VIVO ET IN VITRO DES EFFETS D'UN
TRAITEMENT PROLONGE PAR LES FLAVONOÏDES DE LA PROPOLIS
ALGERIENNE SUR LES FONCTIONS DES MITOCHONDRIES
ISOLEES À PARTIR DE FOIE DE RAT WISTAR***

Soutenu publiquement le 12 juillet 2006 par

HASSIBA ROUBAH

DEVANT LE JURY COMPOSE DE:

PRESIDENT	: Dr LEGHOUCHI	Essaïd	MC (Université de Jijel)
RAPPORTEUR	: Dr LAHOUEL	Mesbah	MC (Université de Jijel)
EXAMINATEUR	: Pr DJEBBAR	Mohamed- Reda	Pr (Université d'Annaba)
EXAMINATRICE	: Dr DJEBBAR	Houria	MC (Université d'Annaba)
EXAMINATRICE	: Dr ABIDLI	Nassira	MC (Université de Constantine)

"Si le chercheur allait à son travail sans aucune opinion préconçue, comment serait-il capable de choisir ces faits, parmi l'immense abondance de l'expérience la plus complexe, et seulement ces faits qui sont assez simples pour permettre que les connections aux règles soit évidentes ?"

Albert Einstein

"La nouveauté n'émerge qu'avec difficulté, manifestée par la résistance, contre un cadre fourni par les attentes"

"La découverte commence avec la conscience de l'anomalie, c'est-à-dire la reconnaissance que la nature a, d'une manière ou d'une autre, violé les attentes provoquées par les paradigmes qui gouvernent la science normale"

Thomas S. Kuhn

Remerciement

*J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à mon encadreur, le docteur **Lahouel Mesbah**, un homme de science passionné, dévoué et perspicace qui a à cœur la formation et la réussite de ses disciples. Mille mercis pour votre soutien, vos conseils, votre enseignement et votre confiance inébranlable. Votre implication dans mon travail n'a jamais été feinte et je vous en suis très reconnaissante. Vos conseils scientifiques m'ont beaucoup enrichi, et les discussions que nous avons eues ensemble ont guidé mon raisonnement. Merci infiniment d'avoir cru en moi, même si cela n'a pas toujours été facile.*

*Je remercie particulièrement et très sincèrement le Dr **Leghouchi Essaid** maître de conférence et doyen de la faculté de science de l'université de Jijel. Merci bien monsieur de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour votre confiance ininterrompue en mes compétences scientifiques et humaines. Votre disponibilité, vos conseils et vos compétences scientifiques m'ont permis de mener à bien mes travaux et d'enrichir mes connaissances. Je vous remercie vivement monsieur pour votre aide, pour avoir suivi de très près l'évolution de mon travail, pour écouter à mes nombreux problèmes, et pour accepter d'évaluer mon travail et de présider le jury de mémoire. Votre esprit de synthèse et votre érudition restent pour moi un exemple à suivre.*

Chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail :

*Monsieur le professeur **Djebbar Mohamed-Reda** de l'université de Annaba, Madame le docteur **Djebbar Houria** de l'université de Annaba et Madame le docteur **Abidli Nassira** de l'université de Constantine qui m'ont fait l'honneur de siéger à ce jury de mémoire.*

*Je remercie spécialement le docteur **Morin Didier** pour sa grande compétence dans le domaine de l'étude de la mitochondrie, pour ses réponses à mes nombreuses questions et pour m'avoir transmis une très grande partie de ses connaissances. Merci monsieur Morin!*

Je tiens à exprimer aussi mes vifs et sincères remerciements à mes enseignants qui m'ont enseigné durant mon cycle de formation, mes collègues dans la post-graduation et la graduation.

*Je remercie également tous les membres de laboratoire (de phytopharmacologie et de pédagogie) et spécialement **Yahia** pour son aide et sa patience durant toute la période de la réalisation de mon travail dans le laboratoire.*

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père, mes frères et mes soeurs, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances. Leur soutien indéfectible, m'a aidé à passer à travers cette étape importante de ma vie, leur appui à mes projets m'incite à continuer et à réaliser mes rêves.

Rouibah Hassiba

TABLE DES MATIERES :

I. INTRODUCTION	01
II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	
II.1. GENERALITE SUR LA MITOCHONDRIE	04
II.1.1. Définition	04
II.1.2. Origine	04
II.1.3. Le génome mitochondrial	04
II.1.4. Organisation structurale de la mitochondrie	05
II.1.5. Les fonctions de la mitochondrie	07
II.2. LE STRESS OXYDANT	09
II.2.1. Définition des radicaux libres	09
II.2.2. Définition de stress oxydant	09
II.2.3. Les espèces réactives de l'oxygène.....	09
II.2.4. Origine des radicaux libres.....	10
II.2.4.1. Production exogène des radicaux libres	10
II.2.4.2. Production endogène des radicaux libres.....	11
II.2.5. Implication de la mitochondrie dans le stress oxydant.....	11
• Le complexe I	12
• Le complexe III et cycle Q	14
II.2.6. Les antioxydants cellulaires et mitochondriaux.....	15
II.2.6.1. Les antioxydants enzymatiques	16
II.2.6.2. Les antioxydants non enzymatiques	17
II.2.7. Les cibles cellulaires des espèces réactives de l'oxygène.....	20
II.2.8. Les radicaux libres sont- ils indispensables à la vie ?.....	25
II.2.9. Mise en évidence d'un stress oxydant	25
II.3. LA MITOCHONDRIE ET L'APOPTOSE	25
II.3.1. Définition de l'apoptose	26
II.3.2. Les voies de l'apoptose	27
II.3.3. Les facteurs impliqués dans l'exécution de l'apoptose mitochondrial.....	27
II.3.3.1. Les facteurs libérés de la mitochondrie.....	28
II.3.3.2. Le pore de perméabilité membranaire.....	29
II.3.3.3. Les caspases	30
II.3.4. Déroulement de l'apoptose mitochondrial.....	31
II.3.5. La famille Bcl2 et son intervention dans la régulation de l'apoptose et la perméabilisation des membranes mitochondriales.....	32
II.4. LES MALADIES LIEES AU STRESS, LA MITOCHONDRIE ET L'APOPTOSE	32
II.5. LES FLAVONOÏDES	36
II.5.1. Définition.....	36
II.5.2. Distribution et localisation.....	36
II.5.3. Structure générale et classification.....	36
II.5.4. La biosynthèse.....	37
II.5.5. Pharmacocinétique des flavonoïdes.....	38
II.5.6. Activités biologiques des flavonoïdes.....	39
• L'effet antioxydant des flavonoïdes.....	40
II.5.7. La propolis comme source de flavonoïdes.....	43

III. MATERIEL ET METHODES	46
III.1. MATERIEL	46
III.1.1. Matériel végétal.....	46
III.1.1.1. Récolte de la propolis.....	46
III.1.1.2. Préparation de l'extrait éthanolique de propolis et extraction des hétérosides flavoniques.....	46
III.1.1.3. Analyses chimiques des extraits de propolis.....	47
III.1.2. Matériel animal.....	50
III.1.2.1. Entretien des animaux.....	50
III.1.2.2. Traitement des animaux.....	50
III.1.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement de foie.....	52
III.2 METHODES	52
III.2.1. Préparation des mitochondries hépatiques.....	52
III.2.2. Mesure de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis.....	55
III.2.3. Mesure de l'activité antilipoperoxydative.....	56
III.2.3.1. Dosage de MDA cytosolique.....	56
III.2.3.2. Dosage de MDA mitochondrial.....	56
III.2.4. Mesure du gonflement mitochondrial (mitochondrial swelling).....	57
III.2.5. Mesure de la production de l'anion superoxyde.....	58
III.2.6. Mesure de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes.....	58
III.2.6.1 Mesure de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique et mitochondriale.....	58
III.2.6.2. Mesure de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale.....	59
III.2.7. Dosage du glutathion hépatique.....	60
III.3. Evaluation statistique.....	61
IV. RESULTATS ET INTERPRETATION	63
IV-1-RESULTATS DE L'ETUDE CHIMIQUE DES EXTRAITS	63
IV-1-1-Les résultats chromatographiques.....	63
IV-1-2- Spectroscopie IR des extraits.....	64
IV.2. EFFET DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS SUR LES PARAMETRES MITOCHONDRIALES ET CELLULAIRES DU STRESS OXYDANT IN VITRO	65
IV.2.1. Pouvoir scavenger de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis.....	65
IV.2.2. Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques sur la production d'anion superoxyde.....	67
IV.2.3. Variation des taux de malondialdéhyde (MDA) mitochondrial.....	68
IV.2.4. Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis sur le gonflement mitochondrial.....	70
IV.2.5. L'activité enzymatique des enzymes antioxydantes	
IV.2.5.1. L'activité enzymatique de la (SOD) mitochondriale et cytosolique.....	72
IV.2.5.2. L'activité enzymatique de la (CAT) cytosolique et mitochondriale.....	74

IV .3. EFFET A LONG TERME DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG PENDANT DEUX MOIS SUR LES PARAMETRES MITOCHONDRIALES ET CELLULAIRE DE STRESS OXYDANT.....	76
IV.3. EFFET PREVENTIF DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG SUR LE STRESS MITOCHONDRIAL ET CYTOSOLIQUE INDUIT PAR LA DOXORUBICINE ADMINISTREE A 10 MG/KG.....	86
IV .4. EFFET CURATIF DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG SUR LE STRESS MITOCHONDRIAL ET CYTOSOLIQUE INDUIT PAR LA DOXORUBICINE ADMINISTREE A 10 MG/KG.....	94
V. DISCUSSION	103
VI. CONCLUSION	118
VII. ANNEXE	121
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	123

LISTE DES SCHEMAS

SCHEMA 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CHAINE DE TRANSFERT DES ELECTRONS DANS LA MEMBRANE MITOCHONDRIALE INTERNE.....	06
SCHEMA 2 : TRANSFERT EN AVANT (FER) ET TRANSFERT REVERSE DES ELECTRONS DANS LA CR.....	14
SCHEMA 3 : CYCLE Q ; A REPRESENTE LE MECANISME DE GENERATION DE O ₂ [°] DANS LE COMPLEXE III. B SITE D'ACTION DES INHIBITEURS FREQUENTS DE COMPLEXE III.....	15
SCHEMA 4 : LA REGULATION DE L'ETAT REDOX PERMET LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE CELLULAIRE..	16
SCHEMA 5 : VOIES DE PRODUCTION DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS) ET INTERVENTION DES ENZYMES ANTIOXYDANTES.....	20
SCHEMA 6 : VUE D'ENSEMBLE DE CERTAINES DES VOIES IMPLIQUEES DANS LA PRODUCTION DES RADICAUX LIBRES ET DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUES DES MEMBRANES.....	24
SCHEMA 7 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTES VOIES APOPTOTIQUES ISSUES DE LA MITOCHONDRIE.....	29
SCHEMA 8 : PORE DE PERMEABILITE TRANSITOIRE	30
SCHEMA 9 : FORMATION DE L'APOPTOSOME, ACTIVATION DE LA CASCADE APOPTOTIQUE ET INDUCTION DU PROCESSUS APOPTOTIQUE.....	32
SCHEMA 10 : SQUELETTE DE BASE DES FLAVONOÏDES	37
SCHEMA 11 : LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES.....	38
SCHEMA 12 : FLAVONOÏDES ET LEURS SITES PROPOSES POUR LA CHELATION DES IONS METALLIQUES.....	41
SCHEMA 13 : PIEGEAGE DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE PAR LES FLAVONOÏDES.....	42
SCHEMA 14 : ELEMENTS ESSENTIELS POUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTES DES FLAVONOÏDES.....	43

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LES DIFFERENTES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE.	
TABLEAU 2 : COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE SUR COUCHE MINCE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE PROPOLIS	63
TABLEAU 3a : VARIATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS EN FONCTION DES CONCENTRATIONS MOLAIRES.....	66
TABLEAU 3b : VARIATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS EN FONCTION DES CONCENTRATIONS MOLAIRES.....	66
TABLEAU 4a : EFFET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LA PRODUCTION DU SUPEROXYDE PAR DES MITOCHONDRIES ISOLEES DE FOIE DE RAT.....	67
TABLEAU 4b : EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LA PRODUCTION DU SUPEROXYDE PAR DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	67
TABLEAU 5a : VARIATION DES TAUX DE MDA MITOCHONDRIAL HEPATIQUE (NMOLE/MG DE PROTEINES) EN PRESENCE DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS	69

TABLEAU 5b: VARIATION DES TAUX DE MDA MITOCHONDRIAL HEPATIQUE EN NMOLE/MG DE PROTEINES EN PRESENCE DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.....	69
TABLEAU 6a: EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LE GONFLEMENT (SWELLING) DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	69
TABLEAU 6b: EFFET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LE GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	70
TABLEAU 7: EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIALE.....	72
TABLEAU 8: EFFET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIAL.....	72
TABLEAU 9: EFFET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIALE.....	74
TABLEAU 10: EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS (P) A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIALE.....	75
TABLEAU 11: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LA PRODUCTION DU SUPEROXYDE PAR DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	77
TABLEAU 12: VARIATION DES CONCENTRATIONS EN MDA CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG / KG ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	79
TABLEAU 13: VARIATION DES CONCENTRATIONS EN GLUTATHION CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG / KG ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	81
TABLEAU 14: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR LE GONFLEMENT (MITOCHONDRIAL SWELLING) DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	82
TABLEAU 15: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE HEPATIQUES.....	83
TABLEAU 16: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE HEPATIQUES.....	85
TABLEAU 17: EFFET PREVENTIF DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR LA DOXORUBICINE ADMINISTREE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE (IV) PENDANT UN MOIS.....	87
TABLEAU 18: VARIATION DES TAUX DE MDA CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS.....	89
TABLEAU 19: EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU PRECEDEE PAR L'ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LES TAUX DE GLUTATHION CYTOSOLIQUE HEPATIQUE.....	91
TABLEAU 20: VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV	

TABLEAU 5b: VARIATION DES TAUX DE MDA MITOCHONDRIAL HEPATIQUE EN NMOLE/MG DE PROTEINES EN PRESENCE DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.....	69
TABLEAU 6a: EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LE GONFLEMENT (SWELLING) DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	69
TABLEAU 6b: EFFET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LE GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	70
TABLEAU 7: EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIALE.....	72
TABLEAU 8: EFFET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIAL.....	72
TABLEAU 9: EFFET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIALE.....	74
TABLEAU 10: EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS (P) A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIALE.....	75
TABLEAU 11: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LA PRODUCTION DU SUPEROXYDE PAR DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	77
TABLEAU 12: VARIATION DES CONCENTRATIONS EN MDA CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG / KG ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	79
TABLEAU 13: VARIATION DES CONCENTRATIONS EN GLUTATHION CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG / KG ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	81
TABLEAU 14: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR LE GONFLEMENT (MITOCHONDRIAL SWELLING) DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	82
TABLEAU 15: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE HEPATIQUES.....	83
TABLEAU 16: EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE EPATIQUES.....	85
TABLEAU 17: EFFET PREVENTIF DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR LA DOXORUBICINE ADMINISTREE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE (IV) PENDANT UN MOIS.....	87
TABLEAU 18: VARIATION DES TAUX DE MDA CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS.....	89
TABLEAU 19: EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU PRECEDEE PAR L'ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LES TAUX DE GLUTATHION CYTOSOLIQUE HEPATIQUE.....	91
TABLEAU 20: VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV	

PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT FLAVONIQUE DE PROPOLIS, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....92

TABLEAU 21 : EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU PRECEDEE PAR L'ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE93

TABLEAU 22 : EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LA PRODUCTION DE SUPEROXYDE PAR LES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....94

TABLEAU 23 : VARIATION DES CONCENTRATION EN MDA HEPATIQUE MITOCHONDRIAL ET CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....96

TABLEAU 24 : VARIATION DES CONCENTRATION EN GLUTATHION HEPATIQUE CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....98

TABLEAU 25 : EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIALE.....100

TABLEAU 26 : EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE.....102

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SPECTRE IR DE PROPOLIS.....64

FIGURE 2 : SPECTRE IR DES HETEROSIDES FLAVONIQUES.....65

FIGURE 3 : VARIATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS EN FONCTION DES CONCENTRATIONS MOLAIRES.....66

FIGURE 4 : EFFET DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LA PRODUCTION DE SUPEROXYDE PAR DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....68

FIGURE 5 : VARIATION DES CONCENTRATIONS EN MDA MITOCHONDRIAL HEPATIQUE EN FONCTION DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE PROPOLIS... 69

FIGURE 6 : EFFET DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE LA PROPOLIS ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR LE GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....71

FIGURE 7 : EFFET DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD CYTOSOLIQUE.....73

FIGURE 8 : EFFET DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIALE73

FIGURE 9 : EFFET DES FLAVONOIDES ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE.....75

FIGURE 10 : EFFET DES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS ET DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE PROPOLIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CYTOSOLIQUE..... 76

FIGURE 11 : EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR LA PRODUCTION DU SUPEROXYDE PAR DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....78

FIGURE 12 : VARIATION DES CONCENTRATIONS EN MDA CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG / KG ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS 79

FIGURE 13 : VARIATION DES CONCENTRATIONS EN MDA MITOCHONDRIAL HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG / KG ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....80

FIGURE 14 : VARIATION DES CONCENTRATIONS EN GLUTATHION CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG / KG ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.81

FIGURE 15 : EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR LE GONFLEMENT (MITOCHONDRIAL SWELLING) DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.82

FIGURE 16 : EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE CYTOSOLIQUE HEPATIQUES.84

FIGURE 17 : EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIALE HEPATIQUES.84

FIGURE 18 : EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CYTOSOLIQUE HEPATIQUES.85

FIGURE 19 : EFFET DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0,033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE HEPATIQUES.....86

FIGURE 20 : VARIATION DE POURCENTAGE DE PRODUCTION DE SUPEROXYDE PAR LES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT APRES ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE PROPOLIS, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE A 10 MG/KG PAR VOIE (IV) PENDANT TROIS JOURS.....88

FIGURE 21 : VARIATION DES TAUX DE MDA CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS..... 89

FIGURE 22 : VARIATION DES TAUX DE MDA MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE.90

FIGURE 23 : EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU PRECEDEE PAR L'ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LES TAUX DE GLUTATHION CYTOSOLIQUE HEPATIQUE.....91

FIGURE 24 : VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT FLAVONIQUE DE PROPOLIS,

DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....92

FIGURE 25: EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU PRECEDEE PAR L'ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE93

FIGURE 26: EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR LA PRODUCTION DE SUPEROXYDE PAR LES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....95

FIGURE 27: VARIATION DES CONCENTRATION EN MDA HEPATIQUE MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS..... 96

FIGURE 28: VARIATION DES CONCENTRATION EN MDA HEPATIQUE CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS..... 97

FIGURE 29: VARIATION DES CONCENTRATION EN GLUTATHION HEPATIQUE CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG PAR VOIE INTRAVEINEUSE IV PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS..... 99

FIGURE 30: EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIALE..... 100

FIGURE 31: EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE.....102

Liste des abréviations :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ATP	Adénosine tri-phosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
ANT	Adenine nucleotide translocator
Bax	Bcl-2-associated protein X
Bcl-2	b-cell lymphoma -2
CARD	Caspase recruitment domain
CAT	Catalase
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CsA	Cyclosporine
Cyt c	Cytochrome c
DISC	Death Inducing Signal Complex
Doxo	Doxorubicine
DPPH•	Radical N-diphényl-N'-picrylhydrazinyle
DTNB	Acide 5, 5' dithiodis-2-nitrobenzoïque
DUQ	Décylubiquinone
EGTA	Ethylène glycol bis (aminoéthyléther)-N,N,N',N' acide tétraacétique
FAD	Flavine-Adénosine-Dinucléotide
FADH	Flavine-Adénosine-Dinucléotide, forme réduite
FADD	Fas-associated death domain
FMN	Flavine mononucléotide
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSH	Glutathion-disulfure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HSP	Heat Shock Proteins
IAP	Inhibitors of apoptosis
MDA	Malondialdéhyde
NAD(P) ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
NADH	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide
NBT	Bleu de nitrotétrazolium
NaOH	Soude
NO [•]	Monoxyde d'azote
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	péroxydite
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
PTP	Permeability transition pore
RL	Radical libre
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TRIS	Tris [hydroxyméthyl] aminométhane
VDAC	Voltage-dependent anion channel
Vit	Vitami

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

La mitochondrie contribue non seulement à la synthèse d'ATP mais aussi au contrôle de l'homéostasie de calcium intracellulaire et à la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). La production excessive de ces espèces conduit au stress oxydant défini comme un déséquilibre prononcé entre les éléments antioxydants et prooxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes. Ces ROS sont impliquées dans de nombreuses pathologies à savoir le vieillissement, le cancer, le diabète, et les maladies neurodégénératives (1, 2). En vue de protéger l'organisme contre les radicaux libres nocifs et l'établissement d'un stress oxydatif, la formation des ROS est contrebalancée par un système de défense antioxydant qui comporte des molécules antioxydantes d'origine endogène et d'autres exogène, rapportées par l'alimentation (3).

La mitochondrie a aussi un rôle crucial dans la transduction de message apoptotique : dans la majorité de cas, elle constitue un passage obligé, mais parfois, seulement un lieu de potentialisation de l'apoptose. Ce type de mort implique l'intervention d'un pore dénommé « pore de transition de perméabilité ». L'ouverture prolongée de ce dernier induit un gonflement « swelling », abolit le potentiel de membrane et, *in fine*, inhibe la synthèse mitochondriale d'ATP et la libération des facteurs apoptogènes tel que le cytochrome c (4).

Aujourd'hui, le concept de maladies mitochondriales est bien admis et beaucoup de pathologies ont un trait commun lié à un dysfonctionnement mitochondrial. Leur spectre extraordinairement vaste a attiré l'attention des chercheurs pour focaliser leurs études sur cet organe. C'est pourquoi aujourd'hui, de nombreuses approches pharmacologiques visent à protéger les fonctions mitochondriales qui représentent donc un objectif majeur en terme d'hépatoprotection, de cardioprotection, etc. Parallèlement, plusieurs travaux ont montré le rôle des flavonoïdes, compris ceux de la propolis, dans la désactivation des radicaux libres et la protection contre le stress oxydant dont les mécanismes impliqués restent malheureusement mal élucidés.

Cependant, si actuellement des études ont mis en évidence les propriétés antioxydantes des flavonoïdes de la propolis, aucune étude n'existe dans la littérature sur leur effet antioxydant à long terme. Notre recherche traite et pour la première fois le rôle antioxydant à long terme de l'extrait éthanolique d'une part et des hétérosides flavoniques de la propolis d'autre part, c'est-à-

dire de rechercher la tolérance de l'organisme vis-à-vis d'un traitement prolongé par les deux extraits d'où l'originalité de notre recherche.

C'est à partir de ces données que nous avons fixé les objectifs de notre travail consacré à évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique et des glycosides flavoniques de la propolis :

- En premier lieu l'évaluation de l'effet antioxydant des flavonoïdes par mesure des capacités antiradicalaires, de la production du superoxyde par les mitochondries hépatiques, de pouvoir antiapoptotique par mesure de gonflement mitochondrial, de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase et de la catalase, et en fin, la peroxydation lipidique cellulaire et mitochondriale et le taux de glutathion cellulaire.
- L'étude des interactions directes ou in vitro de l'extrait éthanolique et des glycosides flavoniques de la propolis avec les mitochondries hépatiques isolées de rat.
- Evaluer le pouvoir antioxydant à long terme des deux extraits administrés à 100 mg/Kg par voie orale pendant deux mois.
- Evaluer l'effet préventif et curatif de l'extrait éthanolique et des glycosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg à l'égard de stress oxydant induit par la doxorubicine administrée par voie intraveineuse à la dose de 10 mg/Kg.
- Comparer les capacités antioxydantes de l'extrait brut de la propolis avec celles des glycosides flavoniques extraites de la propolis toujours.
- En fin, proposer un mécanisme moléculaire d'induction du stress oxydant ou l'effet pro-oxydant de la doxorubicine ainsi que le mécanisme par lequel les flavonoïdes exercent leurs capacités dans l'atténuation et la correction d'un stress oxydant.

***ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE***

II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Généralités sur la mitochondrie

C'est en 1930 que le chimiste Karl Lohman découvrit l'ATP dont la structure fut élucidée quelques années plus tard. La cellule utilise l'ATP comme fournisseur universel de l'énergie pour la multiplication, la différenciation et la réponse aux différents stimuli de l'environnement. Il a été établi que l'ATP est générée par un organite très important, "la mitochondrie" (5,6).

II.1.1. Définition

La mitochondrie est une organelle intracytoplasmique responsable de la synthèse d'ATP par le couplage de la phosphorylation oxydative avec la respiration. Les mitochondries ont un diamètre d'environ 1µm et les cellules en contiennent de nombreuses. Elles ne sont pas des organites statiques, elles se scindent ou au contraire fusionnent couramment. Leur nombre est délicatement réglé par l'expression de certaines protéines mitochondriales codées par le génome mitochondriale et nucléaire (7, 8, 9, 10)

II.1.2. Origine

La mitochondrie naquit lorsque deux bactéries, archéobactérie anaérobie (hôte) d'une part et protobactérie aérobie (symbionte) d'autre part, fusionnent pour donner un eucaryote primitif duquel tous les eucaryotes actuels dériveraient. Une telle hypothèse sur l'origine de la mitochondrie a été suggérée par la mise en évidence de l'ADN mitochondrial (ADN_{mt}) (11, 12, 13).

II.1.3. Le génome mitochondrial

Le génome mitochondrial représente au moins 1% du génome cellulaire total. C'est une molécule circulaire bicaténaire de petite taille (16569 Pb) particulièrement compacte et dépourvue d'introns. Il comporte deux autres caractéristiques, d'abord, il est d'origine maternelle ; à l'issue de la fertilisation de l'ovule, les rares mitochondries du gamète mâle incorporées sont activement dégradées, ensuite l'absence d'histones ou de système de réparation l'expose à une mutabilité accrue, 10 à 20 fois supérieur à celle de l'ADN nucléaire (14, 15, 16). L'ADN_{mt} code pour 13 protéines essentielles de la chaîne respiratoire, deux ARN ribosomiaux, et 22 ARN_t requis pour la synthèse des protéines mitochondriales par un code génétique différent de celui du noyau (13, 17). Chaque mitochondrie comporte de 2-10 molécules d'ADN dont le nombre varie en fonction des cellules, l'exposition à un stress... etc. Les facteurs nucléaires de la respiration NRF₁ et NRF₂ (Nuclear Respiratory Factors) régulent la transcription de l'ADN_{mt} et NRF₁ peut agir également sur d'autres facteurs de transcription et de régulation. Des études

récentes ont montré que l'ADN mitochondrial d'une espèce ne peut pas fonctionner en combinaison avec l'ADN nucléaire d'autres espèces (18, 19,20).

II.1.4. Organisation de la mitochondrie

La mitochondrie est limitée par une enveloppe formée de deux membranes ; la membrane interne et externe qui délimitent deux compartiments mitochondriaux, l'espace intermembranaire et l'espace matriciel.

II.1.4.1. La membrane externe : uniforme et continue, perméable à toutes les molécules de 5 KD au moins grâce à la présence de porines. Elle contient aussi des translocases, transporteurs protéiques, impliqués dans l'import des protéines (translocase of the outer membrane, TOM) et une NADH cytochrome b_5 réductase peu sensible à la roténone (21).

II.1.4.2. La membrane interne :

La membrane interne se replie pour former de nombreuses crêtes (cristea). La base d'une crête est souvent constituée d'une structure tubulaire appelée tube de jonction qui assure la communication entre l'espace interne de la crête et l'espace intermembranaire périphérique (22, 23). Dans cette membrane, on trouve la chaîne respiratoire, l'ATP synthase, de nombreux transporteurs qui assurent le passage d'éléments tels que l'ATP, ADP... etc. Elle comporte aussi des translocases (translocases of the inner membrane, TIM) et la cardiolipine, une structure spécifique des membranes internes des mitochondries et des membranes bactériennes qui est présente dans la structure quaternaire des complexes et apparaît nécessaire pour leur activité (24, 25, 26).

II.1.4.2.1. Le système de la phosphorylation oxydative

Les électrons générés par le NADH et $FADH_2$ sont transférés à l'oxygène moléculaire grâce à une série d'événements qui aboutit à la formation de l'eau et d'énergie, c'est la chaîne de transfert des électrons. Le système de la phosphorylation oxydative (OXPHOS-system) est composé de cinq complexes multiprotéiques (I- V) et de deux transporteurs mobiles d'électrons (ubiquinone et cytochrome c) dont la fonction principale est le couplage du transfert des électrons avec la respiration (10, 26, 27).

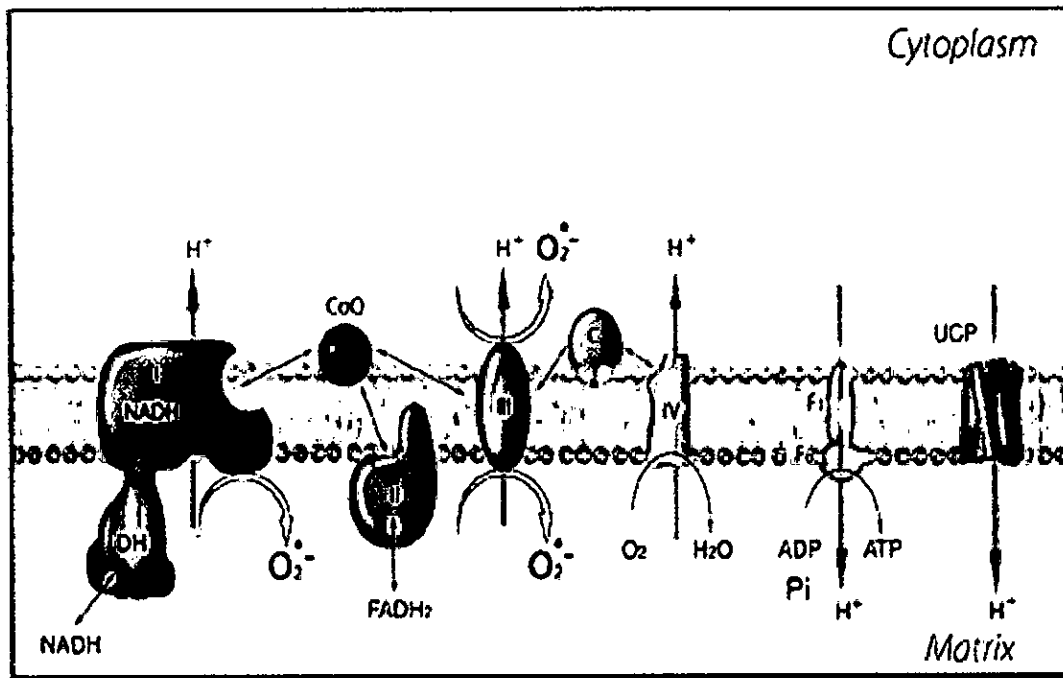


Schéma 1 : Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons dans la membrane mitochondriale interne (28).

- **Le Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase**

Un complexe multiprotéique de 980 KD composé de 46 protéines dont 7 sont codées par l'ADN_{mt} et le reste par l'ADN nucléaire. Il est inhibé par la roténone et contient une seule flavoprotéine à FMN et au moins cinq centres redox Fe-S. Cette enzyme oxyde le NADH et réduit le décyubiquinone en décyubiquinol en utilisant l'énergie libérée par le pompage des protons à travers la membrane mitochondriale. L'organisation spatiale et la fonction du complexe ont été obtenues à partir des études faites sur *E. coli*, *Neurospora crassa* ... etc. Des études de microscopie électronique ont montré qu'il avait une structure en L (26, 27, 29,30, 31).

- **Le complexe II ; Succinate ubiquinone réductase**

C'est le seul complexe dont les sous unités sont toutes codées par l'ADN nucléaire. Ce complexe correspond à la succinodeshydrogénase de cycle de krebs. Son rôle est le transfert des électrons à l'ubiquinone sans translocation de protons (26, 27).

- **Le Complexe III ; cytochrome bc₁ ou COQ cyt c réductase**

C'est un dimère de 550 KD contenant 10 polypeptides parmi lesquelles les cytochromes b, c₁ et une protéine à centre Fe-S. Son rôle est d'oxyder le COQ et de transférer les électrons au cytochrome c. Ce transfert est accompagné de l'expulsion de protons. Le cytochrome c est une

hémoprotéine existant dans l'espace intermembranaire et qui établit une navette d'électrons entre le complexe III et VI (27, 32).

- **Le Complexe VI ; cytochrome c oxydase**

Au sein de ce complexe, les électrons passent un à un à un ion Cu^{+2} d'abord, puis au cytochrome cyt a, ensuite au cyt a_3 , et enfin à l'oxygène pour former de l'eau. Il est composé de 13 polypeptides, de deux cytochromes a ($\text{a} + \text{a}_3$) et de deux atomes de cuivres. Le cytochrome c oxydase fonctionne comme une pompe à protons ; deux H^+ sont expulsés de la matrice pour un e^- transféré. Le complexe IV est inhibé par le monoxyde de carbone et les cyanures (27, 33).

- **Le Complexe V ; ATP-synthase ou $\text{F}_0 \text{F}_1$ synthase**

Ce complexe utilise le gradient électrochimique généré par les complexes I, III et IV pour condenser l'ADP et le P_i en donnant l'ATP. Il est composé de deux unités : l'unité F_0 qui traverse la membrane mitochondriale interne constituant le canal protonique du complexe, et l'unité F_1 qui catalyse la synthèse d'ATP. Alternativement, lorsque le potentiel membranaire diminue (lors d'une ischémie par exemple), la même enzyme peut hydrolyser l'ATP et dans ce cas l'enzyme est appelée F_1F_0 ATPase (25, 27, 34).

II.1.4.3. La matrice mitochondriale

Dans la matrice, on trouve plusieurs copies d'ADN_{mt}, ARN_i, et plusieurs enzymes indispensables à la synthèse protéique, l'oxydation du pyruvate... etc. (21).

II.1.5. Les fonctions de la mitochondrie

Les mitochondries exécutent plusieurs tâches au niveau de la cellule.

- a. **La synthèse d'ATP**

Les mitochondries constituent ce qu'on a coutume d'appeler "*la centrale énergétique de la cellule*". La respiration aérobie est le processus de transfert des électrons du NADH ou du FADH_2 sur l'oxygène moléculaire (O_2). Le NADH et le FADH_2 sont produits lors de la glycolyse et/ou du cycle de l'acide citrique. Ces deux mécanismes utilisent les acides organiques et autres composés résultants de la dégradation des sucres ou de l'amidon. Le pyruvate, principalement issue de la glycolyse constitue le substrat mitochondrial majeur ; Au cours de cycle de Krebs, son oxydation libère des électrons dont le transfert d'un complexe à l'autre de la chaîne respiratoire s'accompagne d'une extrusion de protons. Le gradient de protons ainsi généré est utilisé par l'ATP synthase pour l'élaboration de l'ATP. Par l'ATP, la cellule dispose l'énergie requise pour le déroulement des différents processus biologiques (27, 35, 36).

b. L'implication dans le stress oxydant

Une conséquence de la respiration mitochondriale est la génération des électrons impairs. L'interaction de ces derniers avec l'oxygène moléculaire conduit à la synthèse d'une gamme d'espèces réactives de l'oxygène. En conditions pathologiques, ces ROS induisent un stress oxydant lorsqu'il y aura un déséquilibre entre leur synthèse et leur détoxification (36, 37).

c. L'implication dans l'apoptose

La mitochondrie est très essentielle pour la vie des eucaryotes, mais elle peut jouer un rôle intégrateur des voies de la mort cellulaire programmée. Une collection hétérogène des protéines résident normalement dans l'espace intermembranaire est relarguée dans le cytosol. Ces dernières interfèrent avec des molécules cytosoliques pour induire la cascade apoptotique et la mort cellulaire programmée (38, 39, 40).

d. La régulation de l'homéostasie du calcium

La mitochondrie joue un rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie du calcium cellulaire. Le contrôle des taux de calcium intramitochondrial par ce qu'on appelle cyclisme de calcium est identifié de plus de 20 ans. Les mitochondries prennent le calcium principalement par un transporteur, dont la nature moléculaire nous élude toujours et cela par échange avec le sodium via le transporteur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. Quelques données ont suggérés que ceci pourrait agir comme un canal, s'ouvrant avec la probabilité accrue une fois que la concentration cytoplasmique se lève. Ces deux systèmes de transport associés au transporteur Na^+/H^+ établissent un cycle de transport continu à travers la membrane mitochondriale interne. L'afflux de calcium dans la matrice par cet intermédiaire dépend de gradient de potentiel électrochimique. Les cibles principales de la voie mitochondriale d'importation de calcium sont les déshydrogénases de cycle de Krebs car toutes ces enzymes sont régulées par le calcium. Il est démontré que l'accumulation de calcium dans la matrice mitochondriale constitue un facteur déclenchant de l'ouverture de pore géant et l'apoptose. Ainsi, l'exposition des neurones à un surdosage massif de calcium conduit à l'apoptose tandisqu'un surcharge modéré aboutit à la nécrose (41, 42, 43, 44).

II.2. Le stress oxydant

L'oxygène, bien que molécule indispensable à la vie, est susceptible d'induire des effets endommageants dans l'organisme. Ces derniers sont différents selon le type d'organisme, son âge, l'état physiologique et le régime alimentaire suivi. En particulier, l'apport nutritionnel en vitamines A, E et C, en métaux (de transition ou autres), en antioxydants et en lipides polyinsaturés paraît être un paramètre important (45). L'appellation "*dérivés réactifs de l'oxygène*" n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde, radical hydroxyle... etc.) mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (46).

II.2.1. Définition des radicaux libres

Stricto sensu, un radical libre est une espèce chimique caractérisée par la présence, au niveau d'un atome, d'un électron non apparié au niveau de son orbitale électronique périphérique. Cet état confère à la molécule une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires ce qui entraîne des modifications irréversibles au niveau de la cellule comme la dénaturation de l'ADN, l'inactivation des enzymes, ou encore, la peroxydation des lipides membranaires. Les radicaux libres ayant une durée de vie très limitée, de l'ordre de la microseconde, ils se forment de façon inévitable en parallèle au métabolisme énergétique et par une multitude de voies. La production excessive de ces radicaux libres aboutit à ce qu'on appelle *stress oxydant* (47, 48, 49).

II.2.2. Définition de stress oxydant

Dans les conditions normales, il existe un équilibre entre la production des radicaux libres et les défenses antioxydantes. Lorsque un déséquilibre survient, soit une production des radicaux libres augmentée par rapport aux capacités antioxydantes intactes, soit un état déficient de ces derniers, soit ces deux situations cumulées, alors les RL vont immédiatement réagir et altérer les molécules de la cellule avec des conséquences qui peuvent être dramatiques ; cette situation définit "*le stress oxydant*" (50, 51). Le stress oxydant peut mener à une désorganisation des cellules cibles, voire à la nécrose cellulaire, endommageant l'interstitium environnant et les cellules adjacentes. Le stress oxydant extracellulaire est également cytotoxique, comme cela est observé au niveau des sites inflammatoires (52).

II.2.3. Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans la cellule, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les radicaux secondaires se forment par

réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réactions à un électron tel le superoxyde $O_2^{\cdot -}$, le radical hydroxyle $\cdot OH$ ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} . D'autres espèces dérivées de l'oxygène, comme l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$) ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (53). L'addition d'un électron à l'oxygène conduit au radical superoxyde, peu réactif lui-même, mais représentant un précurseur d'espèces plus agressives. La dismutation du superoxyde conduit en effet à la synthèse de H_2O_2 qui peut participer à la biosynthèse du radical $\cdot OH$; ce dernier ayant une grande responsabilité majeure dans la cytotoxicité des RL par réaction avec les différents constituants cellulaires. Alternativement, deux radicaux libres peuvent réagir entre eux pour mettre fin au processus radicalaire. C'est notamment le cas entre deux superoxyde ou entre le superoxyde et le monoxyde d'azote, ou superoxyde et peroxyde d'hydrogène; la première aboutit au peroxyde d'hydrogène, la deuxième au peroxyde d'azote et la troisième au radical hydroxyle. Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) diffuse facilement dans la mitochondrie, ou produit par elle-même (54, 55, 56, 57).

		Demi-vie (secondes)
Oxygène	O_2	$> 10^2$
Radical hydroxyle	$\cdot OH$	10^{-9}
Radical hydroperoxyde	HO_2^{\cdot}	nd
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}	10^{-6}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	10^{-2}
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	nd
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	10^{-6}
Oxygène singulet	1O_2	10^{-6}
Radical oxyde nitrique	NO^{\cdot}	nd
Peroxyde d'azote	$ONOO^{\cdot}$	nd
Hypochlorite	$HOCl$	nd

nd : non déterminé

Tableau 1 : Les différentes espèces réactives de l'oxygène (52).

II.2.4. Origine des radicaux libres

Nos cellules sont continuellement agressées par des radicaux libres, essentiellement des espèces réactives de l'oxygène, dont la formation est liée aussi bien à des facteurs exogènes qu'endogènes

II.2.4.1. Production exogène des radicaux libres

L'environnement dont lequel nous vivons ainsi que notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme. Ainsi, les rayonnements électromagnétiques (rayons UV, IR), certains métaux de transition (fer), les fumées de combustions (de cigarette), les poussières d'amiante et de silice sont autant des facteurs qui contribuent à la genèse des RL.

La prise des médicaments, notamment les anticancéreux, est un inducteur puissant du stress (48, 58, 59).

Le stress induit par les médicaments anticancéreux

Des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité. Ils agissent selon un mécanisme de transfert d'électrons. Ainsi, selon les travaux de Sinha et al. (1989), réalisés sur des cultures de cellules tumorales mammaires, l'adriamycine est bioactivée en radical semiquinone de l'adriamycine par réduction enzymatique (cytochrome P450). Ce radical peut réagir avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde. Pour une autre anthracycline, la daunorubicine (DOS), la réduction en radical libre (DSO[•]) se réalise alors que la molécule est déjà intercalée dans l'ADN (60, 61)

II.2.4.2. Production endogène des radicaux libres

Nos cellules sont également une source de production des RL ; certaines cellules de notre système immunitaire, en particulier les polynucléaires neutrophiles produisent des RL via l'activation de l'enzyme myéloperoxydase. L'inflammation est par ailleurs une source importante de RL produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé "*respiratory burst*" consistant à l'activation du complexe de la NADH oxydase. Cette enzyme est spécialisée dans la fabrication du radical superoxyde à la suite d'une stimulation. Cette production est à l'origine de la synthèse de molécules comme le HO[•] et l'hypochlorite indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Les RL peuvent aussi s'accumuler lorsqu'il existe un dysfonctionnement au niveau des réactions de détoxification principalement au niveau du foie. Les ions métalliques ainsi que la xanthine oxydase sont des remarquables promoteurs des processus radicalaires ; la première transforme le H₂O₂ en radical hydroxyle encore plus réactif, et la deuxième génère du superoxyde en présence d'O₂ et de xanthine ou d'hypoxanthine. Beaucoup de cellules sont capables de produire le monoxyde

d'azote à partir d'arginine et d'oxygène dans une réaction catalysée par la NO synthase. De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir l'oxygène est susceptible d'être à l'origine d'une production des RL. La source endogène prépondérante des RL par nos cellules est cependant liée à l'activité des mitochondries (48, 50, 53, 62).

II.2.5. L'implication de la mitochondrie dans le stress oxydant

En addition à la synthèse d'ATP, la chaîne respiratoire mitochondriale est une source puissante des ROS considérées comme étant l'agent pathogène de plusieurs maladies. Au cours de transfert des électrons dans la chaîne respiratoire, du radical superoxyde est produit par contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la chaîne, une production que l'on peut comparer aux déchets inévitables des centrales énergétiques. Il est estimé que dans les conditions normales 1-4 % de l'oxygène consommé est incomplètement réduit en superoxyde (10, 29, 63, 64). Dans la mitochondrie, il existe neuf sites responsables de cette production; ils sont ubiquitaires dans les mitochondries des mammifères, mais leurs expression et capacité de production se différent selon les tissus et les cellules (51). Mais le complexe I et III de la chaîne sont considérés comme étant les principaux sites de cette production (10).

- **Le cytochrome b₅ réductase**

Le cytochrome b₅ réductase oxyde le NAD (P) H et réduit le cytochrome b₅, elle peut ainsi réduire le radical ascorbyl, et de ce fait, elle intervient dans la génération de l'ascorbate. Elle peut produire l'anion superoxyde avec une vitesse de 300 nmol/mg de protéines (51).

- **Monoamine oxydase**

Catalyse l'oxydation des amines en l'accompagnant de la libération de H₂O₂ avec un potentiel générateur qui peut dépasser celui du complexe III inhibé par l'antimycine. Elle peut être la source majeure de H₂O₂ lors de l'ischémie (65, 66).

- **Dihydroorotate déshydrogénase**

Convertit le dihydroorotate en orotate, étape dans la synthèse des nucléotides pyrimidiques. Elle peut produire tant le peroxyde d'hydrogène que l'anion superoxyde (51).

- **Succinate déshydrogénase**

Dans les particules submitochondriales oxydant le succinate, la production des ROS par la succinate déshydrogénase peut être inhibée par son inhibiteur, le carboxin. Le mécanisme par lequel cette enzyme produit les ROS dans les mitochondries intactes reste obscure (67).

- **Glycérol -3 –phosphate déshydrogénase**

Une enzyme à FAD intervenant dans le métabolisme lipidique et la navette glycérol phosphate. La production de peroxyde d'hydrogène peut être effectuée par l'enzyme elle-même ou par le complexe I par transfert reverse des électrons (51, 68).

- **Aconitase**

L'enzyme catalyse la conversion du citrate en isocitrate dans la matrice mitochondriale. Durant son inactivation par le superoxyde, par oxydation de son groupement Fe-S et libération du fer, elle produit le radical hydroxyle (63, 69).

- **Le complexe de l'alpha cétooglutarate déshydrogénase**

Deux études récentes ont montré que le complexe est capable de produire le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde. Il apparaît que la source de cette production dans le complexe est la sous unité dihydrolipoamide déshydrogénase (51, 70, 71).

- **Le complexe I**

Plusieurs expériences ont prouvé l'implication du complexe I dans la production des ROS dont le site exact de cette production, malheureusement, reste partiellement obscure (72, 73). Des études ont proposé que ce dernier est localisé entre le groupement flavine et le site liant la roténone tandis que d'autres ont suggéré qu'il est le groupement flavine lui-même (74).

Les données globales dans ce sujet supportent l'opinion que les ROS sont très probablement produites par l'un des centres Fe-S et que le centre N-1a Fe-S est le candidat puissant (74). En présence des substrats NAD⁺- liés comme le malate/pyruvate, le complexe I génère du superoxyde à partir du NADH lorsqu'il est inhibé par la roténone, par un mécanisme potentiel membranaire indépendant (75). Le complexe I peut aussi produire du superoxyde à partir de l'ubiquinol ; le processus implique le transfert reverse des électrons à partir du coenzyme Q vers le NAD⁺ au lieu de l'oxygène par un mécanisme potentiel membranaire dépendant (63). Ce processus est inhibé par la roténone qui bloque le passage des électrons entre l'ubiquinone et le centre N-2 Fe-S du complexe ainsi que par les agents découpleurs et l'acidification du milieu (51, 76).

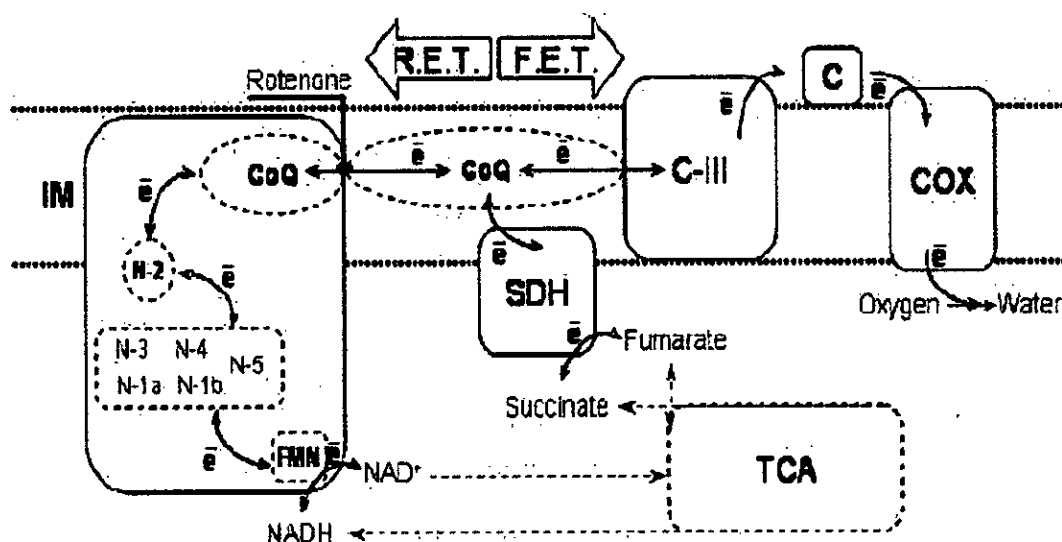


Schéma 2 : Transfert en avant (FET) et transfert reverse (RET) des électrons dans la CR (51).

L'inhibition de la production de superoxyde dans le complexe I par les agents agissant au niveau du site liant la rotenone indique la séquence de transfert suivante :

Coenzyme Q réduit \longrightarrow site liant la rotenone \longrightarrow site générateur des ROS
 \longrightarrow NAD^+ dans la matrice mitochondriale (51).

Puisque sept polypeptides de complexe I sont codés par l'ADN_{mt}, ce complexe est plus exposé aux effets radicalaires que les autres complexes de la chaîne respiratoire en augmentant ainsi la synthèse des ROS (77).

• Le complexe III et le cycle Q

En présence d'antimycine A, le complexe III devient un générateur robuste du superoxyde qui est ensuite dismuté pour donner le H_2O_2 . La source de $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans le complexe peut être le cytochrome 566 (cyt₅₆₆), le radical ubisemiquinone ou le centre Riesk Fe-S (29, 78).

De nombreux travaux ont constaté que cette production est fort probablement attribuée à la formation d'un radical ubisemiquinone instable, qu'il n'a été jamais détecté, au centre Q_0 (79). L'un des deux électrons cédés par l'ubiquinone au complexe III est capturé par le centre Fe-S et cédé au cyt c_1 puis au cyt c, l'autre électron s'engage dans le cycle Q ; il atteint via les cyt b_{566} et b_{562} la face matricielle du complexe, où il est capté par une molécule de COQ pour donner le radical ionisé $\text{COQ}^{\cdot-}$ qui peut céder son électron à l'oxygène moléculaire pour donner naissance au superoxyde (63).

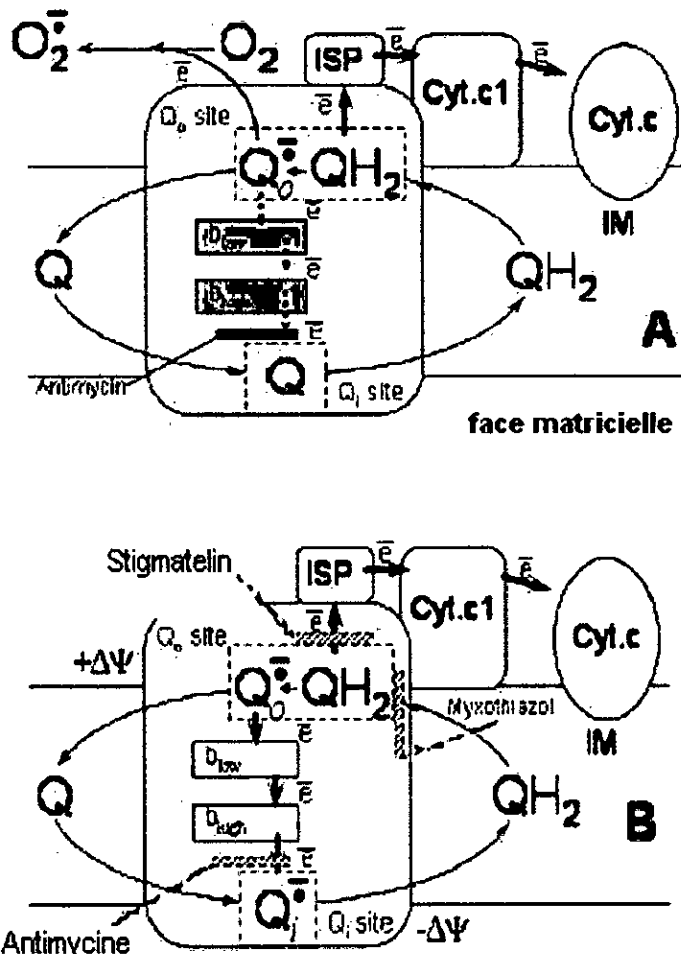


Schéma 3 : Cycle Q ; A représente le mécanisme de génération de $O_2^{\bullet -}$ dans le complexe III. B site d'action des inhibiteurs fréquents de complexe III (51).

Il existe plusieurs substances qui agissent sur le cycle soit par inhibition ou par induction ; l'antimycine A prévient le transfert de deuxième électron vers le centre Q_i en induisant l'accumulation du radical semiquinone au centre Q_0 , cependant les inhibiteurs de ce dernier inhibe la formation de cet semiquinone, soit par interruption de l'attachement de QH_2 au centre Q_0 (myxothiazol) ou par blocage de transfert du premier électron vers la protéine Fe-S. (ISP ; sulfure protéine ou Riesk protéine). Parmi les substances naturelles, le trans-resveratrol prévient la production des espèces réactives de l'oxygène par inhibition du complexe III et plus précisément par interaction avec le cycle Q (51, 79, 80).

In vivo, il apparaît que le complexe I constitue la source majeure des espèces réactives de l'oxygène par transfert reverse des électrons parcequ'en absence d'antimycine A, la formation de superoxyde par le complexe III est minimale (81). L'étude structurale du complexe III par les rayons X révèle que le centre O du complexe est orienté vers l'espace intermembranaire en

suggérant que ce complexe libère son superoxyde dans le cytoplasme au lieu de la matrice mitochondriale. Cependant, le centre Fe-S ainsi que le groupement flavine du complexe I sont orientés vers la face matricielle de la membrane interne, ce qui prouve la libération de superoxyde dans la matrice mitochondriale (5, 82, 83).

II.2.6. Défenses antioxydantes

Les radicaux libres se produisent spontanément et d'une manière continue au sein de notre organisme. Cependant, ils sont rigoureusement contrôlés par de multiples antioxydants. Lorsque ce précaire équilibre est rompu soit par une augmentation du nombre de radicaux libres, soit par une baisse de l'activité antioxydante, il survient un stress oxydatif. Afin de contrer l'action oxydante des radicaux libres, notre organisme possède une « armée » d'antioxydants de nature protéique, enzymatique et d'agents oxydables. Ces antioxydants interviennent en trois temps, constituant ainsi trois lignes de défense : la prévention à plein temps, la détoxification active suite à un stress oxydatif, et la détoxification passive (84). On peut envisager sous le terme "antioxydant" au sens large, l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ROS (53). Les antioxydants sont subdivisés en deux catégories ; les antioxydants enzymatiques et ceux non-enzymatiques.

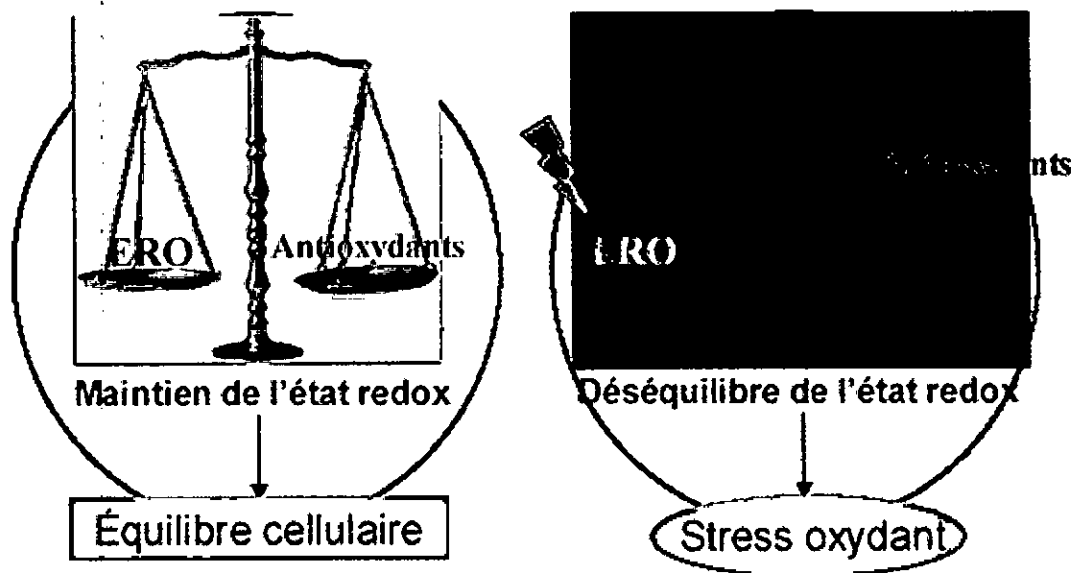


Schéma 4 : La régulation de l'état redox permet le maintien de l'homéostasie cellulaire (62)

II.2.6.1. Les antioxydants enzymatiques

La défense antioxydante enzymatique s'organise en deux types de défenses, l'une primaire, l'autre secondaire. La défense primaire fait intervenir la SOD, la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase. La défense secondaire comprend le recyclage du glutathion avec la glutathion réductase ainsi que le système de réparation de l'ADN, des protéines et des lipides (52).

a. La superoxyde dismutase (SOD)

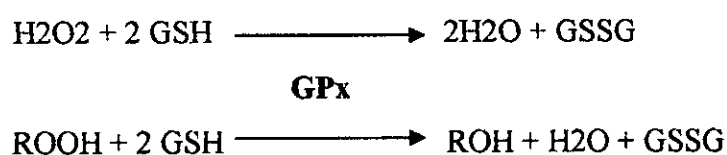
Les SOD sont une famille d'enzymes catalysant la réaction entre l' $O_2^{\cdot -}$, un électron et deux protons pour former le H_2O_2 . Trois isoformes ont été identifiées chez les mammifères : la cuivre/zinc SOD (Cu/Zn -SOD), la manganèse SOD mitochondriale (Mn/SOD) et la SOD extracellulaire (EC/SOD). La première se retrouve dans le cytosol et le noyau de tous les types cellulaires ; la seconde a pour rôle de maintenir la fonction mitochondriale où siège la chaîne respiratoire ; la troisième, une glycoprotéine, est produite par les fibroblastes et les cellules gliales puis sécrétée dans le liquide extracellulaire. Il est observé que les animaux présentant un déficit au niveau de Mn-SOD meurent après quelques jours de la naissance, tandis qu'ils ayant ce déficit au niveau de la Cu/Zn-SOD survivent d'une façon normale (51, 85, 86).

b. La catalase (CAT)

Le résultat de la dismutation de l'anion superoxyde, le H_2O_2 , est converti en H_2O et O_2 à l'aide de la catalase. Cette protéine est un homodimère de 56 KD, essentiellement localisée dans les peroxysomes. Cette enzyme est présente en fortes concentrations dans le foie et les globules rouges. Dans le tissu cardiaque, il est pensé que la catalase existe seulement au niveau des mitochondries avec une activité très basse par rapport au glutathion peroxydase (51, 62).

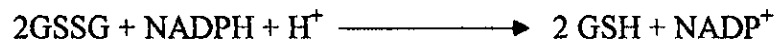
c. Les glutathion peroxydases (GPx) et réductases

Les glutathions peroxydases sont sans doute le système majeur de protection car elles détruisent non seulement le H_2O_2 mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation lipidique des acides gras ou du cholestérol. Elles peuvent être détectées dans plusieurs compartiments cellulaires compris la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure GSSG (62, 87).



L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (62).

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG qui ne peut pas transporté vers le cytosol. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du NADP^+ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, la G6PD (glucose-6-phosphate-déhydrogénase) (51, 62)



d. Glutathion-s-transferase (GST)

La cellule utilise le glutathion GSH dans les réactions de conjugaison de la phase II. Ces dernières sont catalysées par la glutathion-s-transferase.

Cette enzyme protège la mitochondrie et la cellule de différents produits toxiques inclus ceux de la peroxydation lipidique par l'addition d'une molécule de GSH au produit toxique (88, 99).

II.2.6.2. Les antioxydants non-enzymatiques

En plus du système enzymatique, la cellule peut disposer de l'appui de molécules antioxydantes non-enzymatiques. Parmi celle-ci certaines sont synthétisées par nos cellules comme le CoQ_{10} , et le glutathion. Beaucoup d'antioxydants sont cependant des vitamines qui doivent nécessairement être apportées par l'alimentation ; il s'agit, entre autre, de la vitamine C, de la vitamine E, de carotènes, de la vitamine A et des flavonoïdes. La défense non enzymatique comprend des substances liposolubles (vitamine E, β - carotène et bilirubine) et des substances hydrosolubles (vitamine C, glutathion) (53, 90).

a. Les thioredoxins (les peroxyredoxins)

Les peroxyredoxins sont des peroxydes récemment découvertes qui interviennent dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène. Dans la mitochondrie, il existe deux isoformes des peroxyredoxins, la PrX_3 , dont l'expression de gène codant est induite par le stress, et la PrX_5 . La première est abondante dans le cœur et la glande surrénal tandisque la deuxième dans le testicule. Elles sont régénérées sous la forme active par la disulfide oxydoréductase thioredoxins (TrX_2) réduite par la thioredoxin réductase (TrXR_2). Le système thioredoxins mitochondrial peut être essentiel pour le développement des mammifères car les ruptures des gènes TrX_2 chez la souris ont eu comme conséquence l'apoptose massif pendant

l'embryogenèse. Cependant l'overexpression n'augmente pas nécessairement la résistance cellulaire aux ROS (51, 91).

b. Le glutathion

Le glutathion (L-gamma-glutamyl-L-cysteinyl glycine) est un tripeptide qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant dont 90% existe sous la forme réduite GSH. Il est riche en soufre ce qui lui confère son rôle de piègeur de radicaux libres. Il existe des enzymes responsables de la synthèse, de dégradation ou de recyclage du glutathion. Certaines de ces enzymes ont un rôle crucial pour la stabilisation de ce composé et le maintien de l'équilibre redox. La mitochondrie contient 10-12 % du GSH total qu'il est d'origine cytosolique car elle est dépourvue des enzymes indispensables à la biosynthèse. Il est transporté vers la mitochondrie par plusieurs transporteurs tels les transporteurs de GSH haute et faible affinité (51, 92, 93).

c. Le Coenzyme Q₁₀ et la vitamine E

Le CoQ₁₀, le seul antioxydant liposoluble synthétisé par l'organisme, constitue une navette de transport des électrons dans la chaîne respiratoire (94). Le caractère hydrophobe de CoQ₁₀ et de la vitamine E leur permet de s'insérer dans les lipides membranaires en empêchant la peroxydation lipidique (95). Des études sur les hépatocytes isolées du rat ont montré l'effet antioxydant de l'ubiquinole, la forme principalement active, exogène (96). Cet effet est du en spectre large de l'interaction directe de l'ubiquinole avec le superoxyde ou indirecte avec les radicaux lipidiques (94). Il peut aussi agir en association avec la vitamine E par régénération de sa forme active à partir du radical tocophéroxyl (97).

d. Le cytochrome c

L'espace intermembranaire contient 0.7 mM de cytochrome c (cyt c) qui peut être réduit alternativement par les électrons de la chaîne respiratoire ou par le superoxyde. Vu le rôle antioxydant de cyt c, la perte de ce dernier conduit à une production massive des ROS dont la relation exacte entre eux reste à être élucidée (51, 98).

e. Les flavonoïdes et les bêta-carotènes

L'activité antioxydante des flavonoïdes a été décrite par Kandswami et Middleton. Le bêta-carotène, "la provitamine A", est un piègeur d'oxygène singulet ; une seule molécule peut inactiver des centaines de molécules de ce dernier (99, 100). De nombreuses molécules, à savoir la ferritine, la transferrine, la céruloplasmine et l'albumine, la lactoferrine et bien d'autres, permettent de chélater les métaux de transition impliqués dans la formation de radicaux hydroxyles lors des réactions concomitantes de Haber-Weis et Fenton. Elles sont réparties dans l'organisme et permettent de diminuer la production de radicaux libres (3).

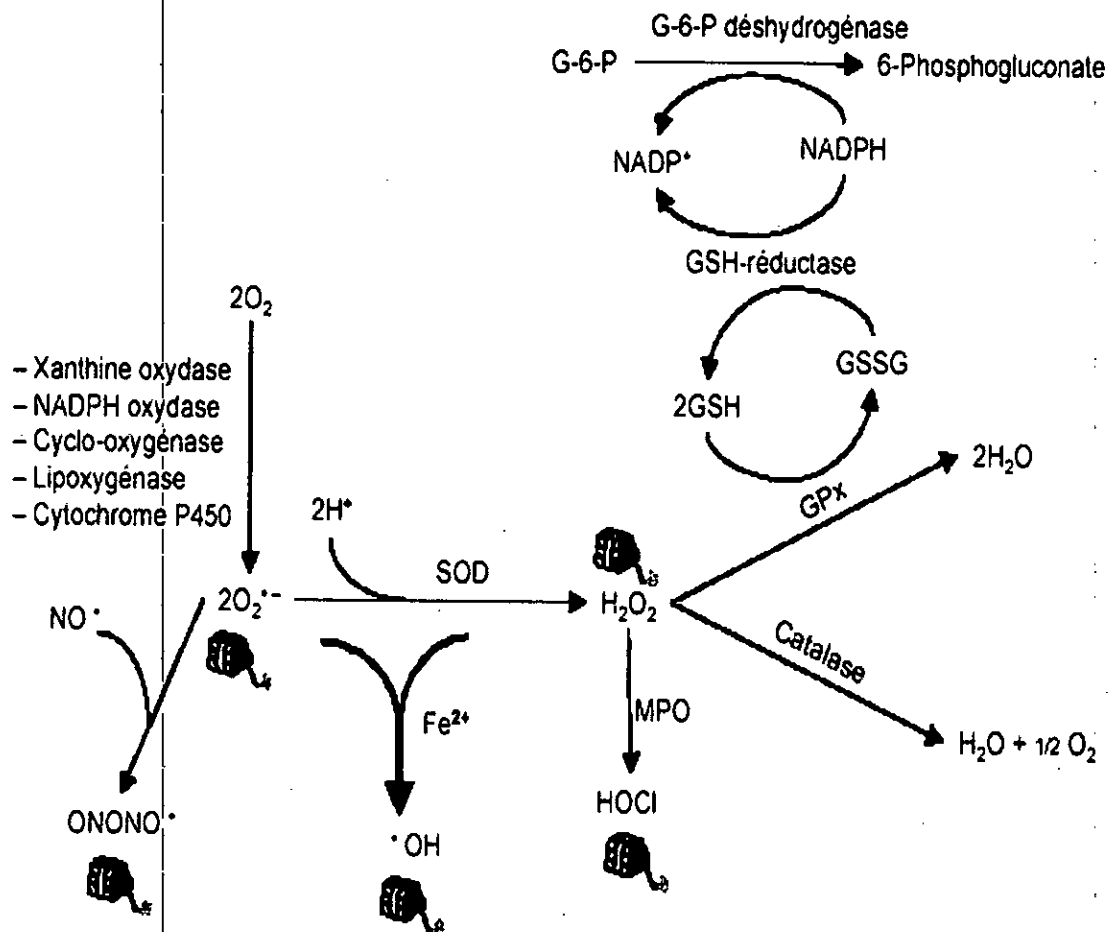


Schéma 5 : Voies de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et intervention des enzymes antioxydantes. SOD : superoxyde dismutase ; MPO : myéloperoxydase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSH et GSSG : glutathion réduit et oxydé ; G-6-P : glucose-6-phosphate (52).

II.2.7. Les cibles cellulaires de radicaux libres

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression des protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganisent la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation de fœtus, dépôts de protéines anormales, fibroses, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression (53). Les radicaux libres peuvent attaquer les composants cellulaires à savoir l'ADN mitochondrial et nucléaire, les protéines et les lipides (101).

a. Péroxydation de l'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène ont une grande réactivité sur certaines bases de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine (8-OHdG) normalement éliminée par les enzymes de réparation de l'ADN. La proportion d'ADN muté est corrélée avec son contenu en 8-OHdG (102, 103). Puisque l'ADN mitochondrial est dépourvu d'histones et se trouvent à un niveau cellulaire où la concentration des radicaux libres est la plus importante, cet ADN est plus vulnérable par les ROS que l'ADN nucléaire notamment lors du vieillissement (104).

b. La peroxydation protéique

Les protéines sont également des cibles de radicaux libres ; Dean et al ont montré que les protéines peuvent être attaquées par les radicaux libres même à des concentrations très élevées en vitamine E. Les dommages oxydatifs au niveau des protéines peuvent se manifester de diverses manières : apparition des groupements hydroperoxydes, oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à la fragmentation de la protéine...etc. Néanmoins, les protéines chaperonnes jouent un rôle essentiel dans les processus de stabilisation et d'assemblage des protéines dont leurs biosynthèse doit être considérée comme réponse au stress oxydant (105, 106).

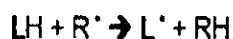
c. La peroxydation lipidique

Lorsque les systèmes de défense anti-radicalaire sont dépassés, il se produit une accumulation de ROS créant une situation de stress oxydant responsable de l'oxydation des protéines et des lipides (peroxydation lipidique). La peroxydation lipidique concerne les lipides membranaires (phospholipides et cholestérol principalement) et les lipoprotéines. Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des radicaux libres et la peroxydation de ces derniers déstabilise les membranes de la cellule et notamment la membrane interne des mitochondries. La destruction de la bicouche phospholipidique des crêtes mitochondriales entraîne une production supplémentaire de radicaux libres (52, 107). Il n'est pas connu exactement quel est le radical ou l'espèce initiateur de la peroxydation lipidique, mais il apparaît que le radical $\cdot\text{OH}$ attaque en effet avec beaucoup d'efficacité les lipides et induit des effets néfastes précoces sur le fonctionnement cellulaire (108). La peroxydation lipidique se décompose en 3 phases ; phase d'initiation, phase de propagation et une phase de terminaison.

• **La phase d'initiation**

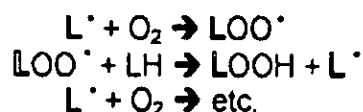
Tout d'abord la phase d'initiation correspond au soustraction d'un atome d'hydrogène à un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) d'une chaîne acylée d'acide gras polyinsaturé par un radical

comme 'OH ou ROO'. Elle conduit à la formation d'un radical libre L' se stabilisant par un remaniement électronique conduisant à la formation de deux diènes conjugués qui a la propriété d'absorber dans l'ultraviolet à 234 nm selon la réaction suivante (52, 108, 109):



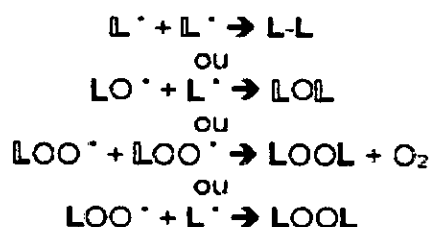
• **La phase de propagation**

C'est une étape explosive d'amplification se développant en présence d'oxygène. Il y a formation d'un radical peroxyde LOO• par combinaison de L• avec l' O₂. Le radical LOO• réagit à son tour avec une autre molécule d'AGPI, formant ainsi un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical d'acide gras L• qui assure la propagation de la chaîne de peroxydation. On admet généralement que chaque radical L• peut être à l'origine d'une centaine de molécule de LOOH comme il est décrit dans les réactions suivantes (90) :



• **La phase de terminaison**

Enfin, la phase de terminaison correspond à la rencontre de deux espèces radicalaires et la formation des composés stables dont les associations possibles sont illustrées dans les réactions suivantes (52, 90) :



Après cette phase de terminaison débute un processus de dégradation des hydroperoxydes lipidiques *via* des phénomènes de cyclisation et d'hydrolyse aboutissant à la formation de nombreux dérivés comme des alcools, des aldéhyde, des époxydes et des hydroperoxydes, dont les principaux sont le 4-hydroxynonéal et malondialdéhyde (MDA) (52).

Le facteur essentiel déterminant les réactions en chaîne des radicaux libres *in vivo* est la concentration de la vitamine E dans la bicouche lipidique qui à son tour peut initier d'autres réactions en chaîne lorsqu'elle existe en faibles concentrations. Il est connu que les métaux de transition peuvent initier la peroxydation lipidique car ils participent à la régénération des espèces réactives de l'oxygène et la propagation du processus par réduction des hydroperoxydes

lipidiques qui en absence des métaux de transition forment des produits stables. Les peroxydes lipidiques sont potentiellement toxiques et sont capables d'endommager l'ensemble des cellules. Plusieurs composés réactifs formés lors de la peroxydation lipidique présentent des propriétés génotoxiques et mutagéniques, et interagissent avec les protéines et l'ADN. C'est particulièrement le cas de l'hydroxynonénale (HNE) et le malondialdéhyde (MDA) qui forment des adduits avec l'ADN (111). Le HNE induit une myriade d'effets délétères au niveau de la cellule comme il est considéré l'agent le plus génotoxique des produits de la peroxydation lipidique. D'autre part, il est trouvé que le MDA provoque des tumeurs thyroïdiens. Il est fortement pensé que les isoprostanes sont les marqueurs évidents de la peroxydation lipidique dans l'organisme humain qui peuvent être détectés par des méthodes spectrophotométriques dans le sérum (110).

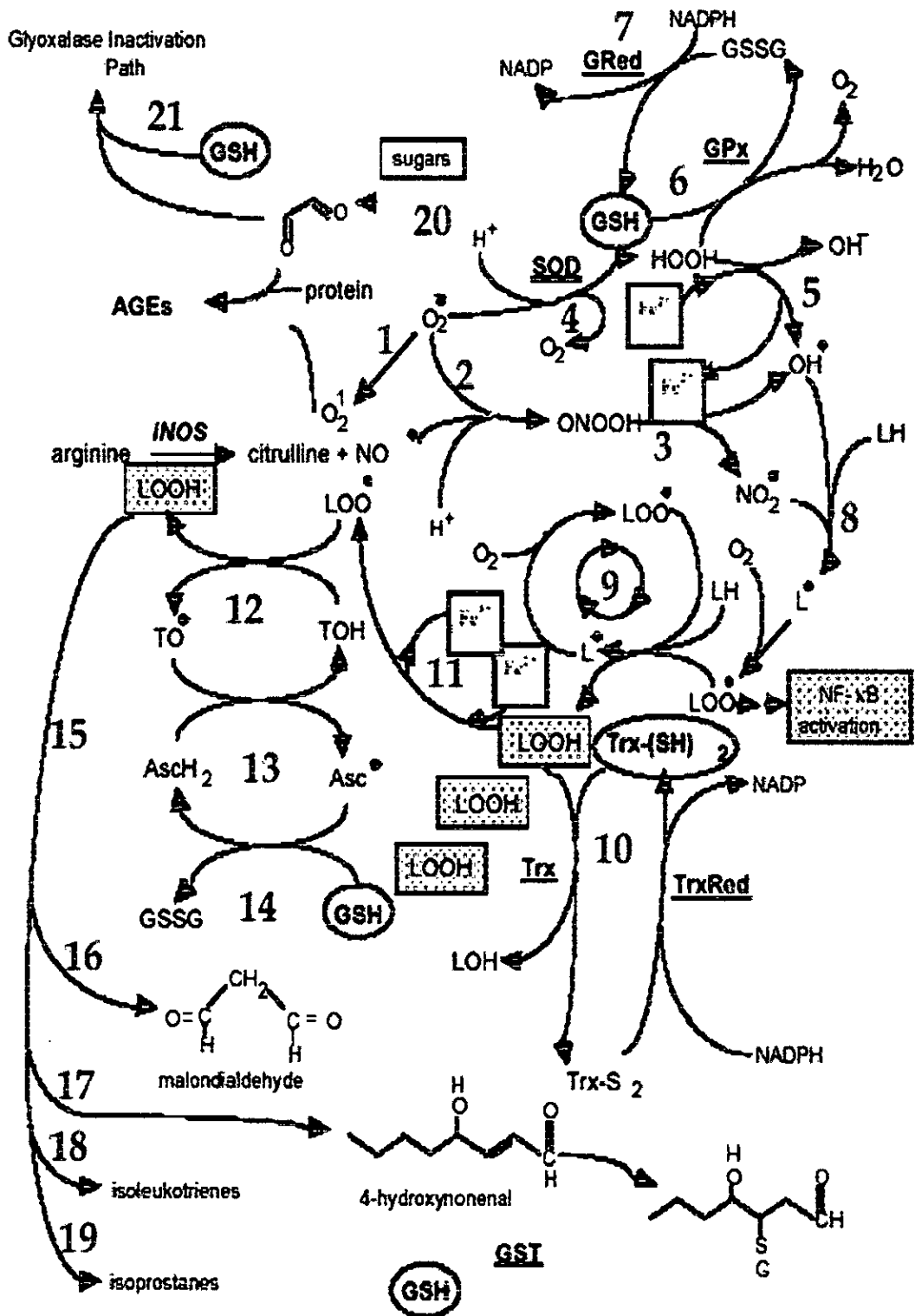


Schéma 6 : Vue d'ensemble de certaines des voies impliquées dans la production de radicaux libres et de la peroxydation lipidiques des membranes (111).

II.2.8. Les radicaux libres sont- ils indispensables à la vie ?

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, la défense immunitaire contre les agents pathogènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, la régulation de la dilatation capillaire, la fécondation de l'ovule, l'absorption de l'eau dans le tractus digestif, la régulation du métabolisme cellulaire et à la modulation de l'expression de gènes codant pour les enzymes antioxydantes. Chez l'homme, les gènes antioxydants les plus inductibles par un stress oxydant sont ceux de la SOD à manganèse, de la catalase, de la thioredoxine et HSP70 alors que ceux de la Cu-Zn SOD et la glutathion peroxydase sont peu inductibles. Mais les ROS peuvent ainsi activer des gènes de fonctions cellulaires autre que ceux de la lutte contre les RL, ceci par l'intermédiaire de facteurs redox sensibles comme NF-KB qui aboutit à l'activation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Ayant besoin d'une certaine quantité d'espèces réactives de l'oxygène, l'organisme ne cherche donc pas à les détruire mais à contrôler leur niveau pour éviter le stress oxydant (53, 62, 112).

II.2.9. Mise en évidence d'un stress oxydant

La difficulté de mettre en évidence un stress oxydant de façon directe réside dans le fait que les espèces réactives de l'oxygène ont une demi vie extrêmement courte. Les techniques mises en œuvre afin de doser les radicaux oxygénés sont complexes, coûteuses et difficilement réalisables en pratique. Par conséquent, des produits issus des processus d'oxydation, appelés marqueurs oxydants, sont utilisés afin de mettre en évidence indirectement et de quantifier un stress oxydant subi par l'organisme. De plus, des antioxydants peuvent être dosés afin de souligner des carences éventuelles ou encore un déséquilibre entre les anti- et les pro-oxydants. De nombreux marqueurs sont actuellement décrits. La détection ciblée de plusieurs marqueurs appartenant à des classes de molécules différentes est donc recommandée (3, 113, 114). De nombreux marqueurs du stress oxydant sont encore à développer et étudier bien que pour certains, les techniques d'analyse soient maintenant au point comme par exemple celles qui ont été développées pour doser la myéloperoxydase (MPO) (115) ou encore l'ADN oxydé (116). La conséquence pratique est que l'analyse et l'interprétation des résultats sur les marqueurs oxydants et des antioxydants ne peuvent se faire que via un laboratoire maîtrisant un grand nombre de techniques d'analyse et ayant une expérience dans le domaine du stress oxydant. En effet, de nombreuses techniques sont nécessaires pour analyser ces marqueurs. Une attention

particulière doit être portée à la gestion des prélèvements. Ainsi par exemple, il est important de respecter les délais de centrifugation, de respecter la chaîne du froid au cours du transport des échantillons (4° à -80° C selon les marqueurs), et réaliser l'analyse dans des délais adéquats (3, 117).

II.3. La mitochondrie et l'apoptose

II.3.1. Définition de l'apoptose

C'est en 1972, que Willie, Kerr et Curie ont utilisé le terme apoptose « *apoptosis* » pour décrire une forme de mort cellulaire ayant des caractéristiques morphologiques distinctes de celles de la nécrose. Le terme apoptose dérive d'un mot grec décrivant la chute des feuilles mortes d'un arbre en automne, est utilisé pour désigner un type de mort intrinsèquement programmée qui, semble jouer un rôle opposé ainsi complémentaire à la mitose dans la régulation des populations cellulaires et qui, peut être initiée par une variété de stimuli environnementaux, physiologies ou pathologiques (4, 118, 119). Ce type de mort est alors définie par des modifications morphologiques caractéristiques : condensation du cytoplasme ; détachement des cellules des tissus ; condensation de la chromatine ; fragmentation de la cellule en corps apoptotiques délimités par une membrane, suivie d'une phagocytose et d'une dégradation rapide. La condensation de la chromatine ainsi que la condensation, le bourgeonnement et la fragmentation du noyau requièrent le clivage des lamines nucléaires par les caspases. La perte de la forme générale de la cellule est causée par la digestion des protéines de cytosquelette (120, 121, 122). Il s'agit donc d'un processus actif dans lequel la cellule est détruite avec préservation de l'architecture membranaire. L'intégrité membranaire, la capacité d'élimination cellulaire font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune inflammation et de ce fait, elle s'oppose à la nécrose qui implique la destruction et la dispersion du contenu cellulaire dans l'environnement provoquant ainsi une inflammation (119). C'est un mécanisme universel des êtres vivants uni ou pluricellulaires ; elle intervient lors de l'embryogenèse pour sculpter les différents organes, elle élimine les cellules sénescents ou malades, la repense aux différents types de stress et enfin elle constitue un mécanisme fondamental du bon fonctionnement du système immunitaire. On prend conscience depuis les dix dernières années que l'apoptose est impliqué dans de nombreux processus pathologiques, soit par activation excessive comme dans les maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, Alzheimer...etc.) soit par défaut d'intervention conduisant ainsi au développement des tumeurs malignes (123, 124, 125).

II.3.2. Les voies de l'apoptose

En terme générale, les voies apoptotiques peuvent être divisées en deux catégories principales : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

II.3.2.1. La voie extrinsèque ou la voie récepteur dépendant

Cette voie passe obligatoirement par un récepteur membranaire et nécessite l'intervention d'un signal proapoptotique. Parmi les signaux induisant ce type de mort cellulaire, l'exemple de Fas est le mieux connu. La fixation du ligand sur son récepteur entraîne la dimerisation de ce dernier, puis le recrutement successif d'une protéine cytoplasmique d'adaptation (FADD, Fas-Associated Death Domain) et la procaspase 8 et le complexe ainsi formé (DISC, Death Inducing Signal Complexe) libère la caspase 8 pour disséminer le signal apoptotique. Une fois la caspase 8 est activée, deux scénarios ont été décrits. Chez certaines lignées cellulaires appelés type I, la caspase 8 déclenche la cascade de caspase en clivant la procaspase 3 en caspase 3. Par contre, chez les cellules type II, l'activité de la caspase 8 est beaucoup moins grande et ne suffit généralement pas à l'activation directe de la procaspase 3 et dans ce cas, la faible activité de la caspase 8 permet le clivage de Bid, qui peut alors causer la fuite de cytochrome c des mitochondries et l'activation de la caspase 9 et de la cascade des caspases (126, 127, 128, 129).

II.3.2.2. La voie intrinsèque ou la voie mitochondriale

Cette voie peut être mise en route par une grande variété de stimuli tel que l'exposition aux agents endommageant l'ADN et le stress oxydant. Plusieurs travaux ont montré l'implication de la mitochondrie dans la mort cellulaire programmée. Il est proposé que la formation d'un pore, le pore de transition membranaire, puisse conduire à l'apoptose par la libération des facteurs proapoptotiques de la mitochondrie (24, 79, 130).

II.3.3. Les facteurs impliqués dans l'exécution de l'apoptose mitochondrial

L'implication de la mitochondrie dans l'apoptose a été mise en évidence par l'identification de plusieurs protéines mitochondriales capables d'activer le processus apoptotique. Elles induisent l'apoptose soit par activation des caspases ou par neutralisation des inhibiteurs cytosoliques de l'apoptose. L'induction de la voie mitochondriale cause la dissipation de la différence de potentiel membranaire mitochondrial et le relâchement dans le cytosol de plusieurs protéines de l'espace intermembranaire. Parmi celle-ci évidemment le cytochrome c mais aussi AIF, l'endonucléase G, Smac/Diablo, les procaspases 2 et 9 et les inhibiteurs des IAPS (131, 132, 133).

II.3.3.1. Les facteurs libérés de la mitochondrie

a. Le cytochrome c

Le cytochrome c, un composant de la chaîne de transfert des électrons, est lié à la membrane mitochondriale interne par les molécules de la cardiolipine. La libération du cytochrome c, largement médiée par les espèces réactives de l'oxygène, apparaît comme événement central dans l'induction de l'apoptose. Cette libération est précédée par la dissociation du cyt c de son emplacement soit, par peroxydation lipidique de la cardiolipine -composé de 90% d'acides gras polyinsaturés- ou d'altération des voies de sa biosynthèse. Le cytochrome c est capable d'activer les caspases *in vitro*, par addition à un extrait cellulaire et *in vivo*, par micro-injection (24, 79, 132).

b. Smac/Diablo

Une autre protéine agissant sur la voie Apaf-1/ caspase 9 a été isolée par deux groupes nommée alternativement Diablo ou Smac. C'est une protéine mitochondriale de 27KDa, libérée simultanément avec le cytochrome c lors de l'engagement de la mitochondrie dans l'apoptose.

Le mode d'action de cette protéine est l'enlèvement de l'inhibition des caspases par la liaison et la séquestration des protéines de la famille IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose) (131).

c. AIF (apoptosis inducing factor):

Apoptosis-inducing factor (AIF) est une flavoprotéine de 57 KD qui ressemble les oxydoréductases bactériennes. L'immunofluorescence confirme la localisation de l'AIF dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Lors de l'apoptose, l'AIF est transporté de la mitochondrie vers le noyau où il provoque la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN par un mécanisme indépendant des caspases et qui reste obscure. Il a certaines similitudes avec le cytochrome c ; les deux protéines ont un groupement prosthétique et une activité indépendante de l'état redox (131, 134, 135).

d. L'endonucléase G :

L'endonucléase G (endo G) est une nucléase mitochondriale de 30 KD purifiée à partir des mitochondries de rat traitées par le tBid, un membre de la famille Bcl-2 libéré sous l'effet de la caspase 8. Elle est codée par le génome mitochondrial, transporté vers le cytosol puis vers la mitochondrie. Dans la mitochondrie, il est pensé que l'endo G participe à la réplication mitochondriale. Une fois libérée, elle est capable de fragmenter l'ADN par une activité indépendante des caspases (131).

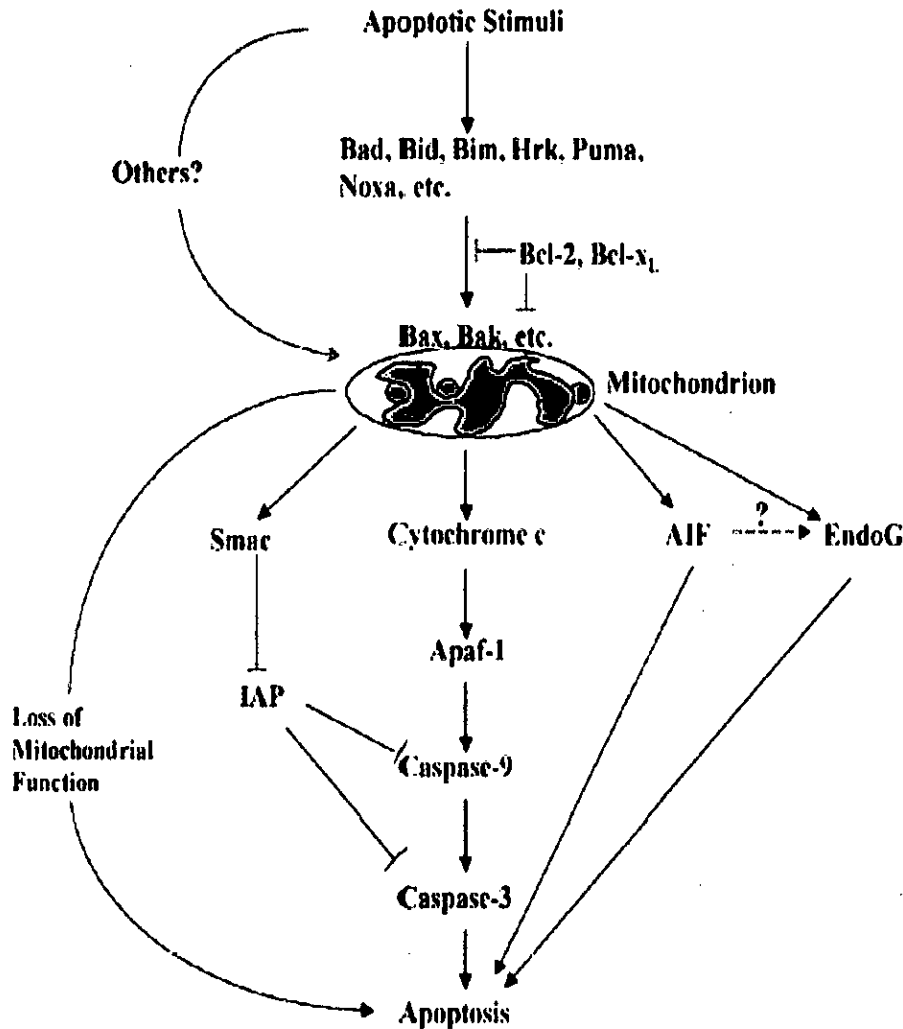


Schéma 7 : Schéma représentant les différentes voies apoptotiques issues de la mitochondrie (131).

II.3.3.2. Le pore de perméabilité transitoire PTP (permeability transition pore)

La perméabilité transitoire (permeability transition) est une augmentation rapide de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux molécules de poids moléculaire inférieur à 1500 D, en aboutissant à un effondrement de potentiel membranaire, découplage de la phosphorylation oxydative et le gonflement mitochondrial (24, 136). Ce phénomène est la conséquence de la formation d'un pore ou d'un canal au niveau de la membrane mitochondriale dont le diamètre à l'ouverture complète est de 3 nm (23). Le PTP est situé principalement au niveau des sites de contact entre la membrane interne et externe ou le canal anionique voltage dépendant VDAC et les ANT (inner membrane adenine nucleotide translocator) sont concentrés. En addition, une protéine sensible à la cyclosporine A (CsA), la cyclophylline est associée au pore. La cyclosporine A, inhibiteur potentiel de PTP protège les cellules de l'ischémie-

repérfusion par blocage de l'ouverture de pore. L'ouverture de pore est inhibée par plusieurs composés compris l'ADP et l'ATP, et stimulée par le phosphate inorganique et principalement le calcium et les espèces réactives de l'oxygène. Le PTP intervient dans la régulation de la libération de cytochrome c mais le rôle physiologique reste obscur (24, 34, 80, 130, 136).

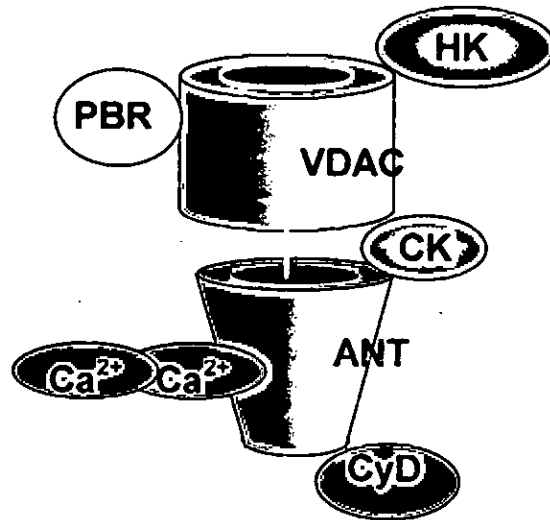


Schéma 8 : Pore de perméabilité transitoire (137).

II.3.3.3. Les caspases

Le déroulement du processus apoptotique nécessite généralement l'implication d'un groupe d'enzymes protéolytiques qui clivent une variété de substances biologiques tant cytoplasmiques que nucléaires. Ces protéases ont été nommées *caspases* "Cysteine Aspartate Specific Protease" puisqu'elles ont toutes un résidu cystéine dans leur site actif et qu'elles clivent après un résidu aspartate. Elles sont bien conservées évolutivement, de l'homme jusqu'aux nématodes et aux insectes. Elles sont toutes produites sous forme d'un grand précurseur inactif « procaspase zymogène » contenant trois domaines : Un prodomaine en N terminal, une grosse sous unité (20 KD, P20) et une petite sous unité (10 KD, P10) (4). L'activation d'une procaspase dépend d'une part du clivage, après des résidus aspartates ce qui suggère l'autocatalyse et de l'association subséquente des deux sous unités pour former un hétérodimère (p20-p10) avec un site actif auquel contribuent des acides aminés de chaque chaîne (138, 139, 140). Les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent être subdivisées en caspases initiatrices (9, 10 et probablement 11) responsables de déclenchement des cascades d'activation des caspases et en caspases effectrices (3, 6 et 7) qui dégradent des substances cellulaires spécifique (141, 142). L'activation pharmacologique des caspases en utilisant de petites molécules constitue une approche effective

dans la dégradation des cellules cancéreuses ou au moins d'enlever la résistance aux médicaments anticancéreux. Le blocage de l'expression des gènes qui codent pour les inhibiteurs des caspases par des oligonucléotides antisens est une autre stratégie puissante dans la thérapie du cancer (138, 143, 144). Il est noté que certaines substances ne sont pas clivées dans tous les types cellulaires. L'actine, par exemple, est clivé dans les neurones et des thymocytes mais pas dans les autres types cellulaires durant l'exécution de programme apoptotique (145).

II.3.4. Déroulement de l'apoptose mitochondrial

La libération du cytochrome c dans le cytosol aboutit au déclenchement de l'apoptose. Le cytochrome c se lie à une protéine cytosolique Apaf-1, une protéine cytosolique ayant un domaine de recrutement des caspases (CARD). L'oligomérisation d'Apaf-1 en présence de cytochrome c et d'ATP permet le recrutement de procaspase 9 via le domaine CARD pour former un très gros complexe (700-1400 KDa) appelé apoptosome, au sein duquel la procaspase 9 s'active et amorce une cascade de caspases en clivant les caspases 3 et 7. Ces caspases effectrices clivent plusieurs substrats intracellulaires conduisant aux caractéristiques morphologiques de l'apoptose. Certaines données semblent indiquer que le rapport Apaf-1 : caspase 9 est près de 1 : 1 mais la proportion de cytochrome c demeure inconnue et on ne sait toujours pas si sa présence est transitoire dans le complexe. Quant à la structure de l'apoptosome, une étude en microscopie cryo- électronique a permis de déterminer grossièrement une structure heptamérique en forme de roue. Cette structure a mené à la formation de différentes hypothèses quant au mécanisme d'activation de la procaspase 9. Etant donné les conséquences graves que pourraient entraîner une activité caspase inappropriée, celle-ci doit être contrôlée de manière stricte. Par exemple, les IAP (inhibitors of apoptosis) semble être un moyen utilisé pour réprimer les caspases initiées par accidents et éviter ainsi l'implication de la cascade. Les protéines de cette famille inhibent les caspases 3, 7, 8 et 9 (4, 146, 147, 148).

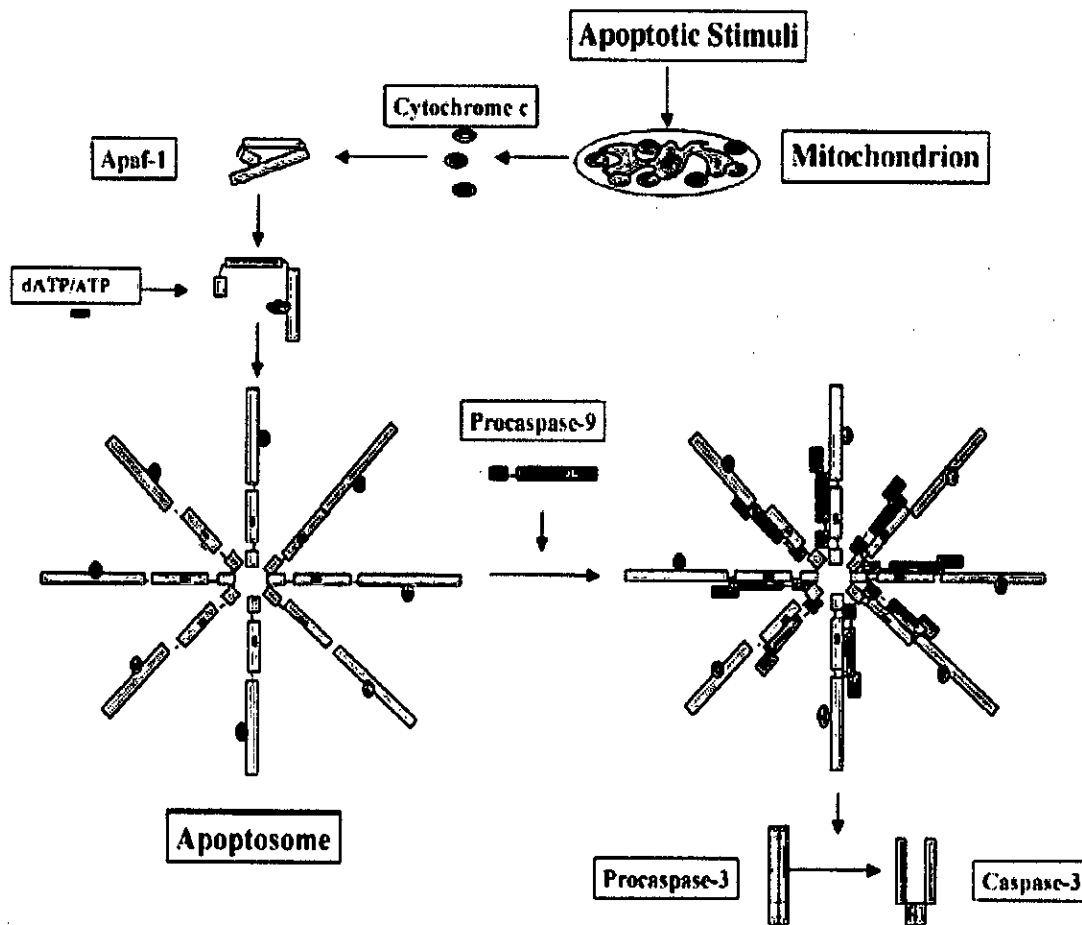


Schéma 9 : formation de l'apoptosome, activation de la cascade apoptotique et induction du processus apoptotique (131).

II.3.5. La famille Bcl-2 et son implication dans la régulation de l'apoptose et la perméabilisation des membranes mitochondriales

La mitochondrie est reconnue comme étant un point d'intégration majeure de signaux de mort ou de survie engendrés par une panoplie de stimuli intra et extracellulaire. Les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle crucial dans la régulation de sentier mitochondrial (149, 150). La famille Bcl-2 (B- cell lymphoma gene 2) comporte une douzaine de protéines considérées comme régulateurs majeurs de la voie intrinsèque de l'apoptose (138). Si l'on réfère à leurs fonctions biologiques, on peut classer les membres de la famille Bcl-2 en deux sous familles, des membres antiapoptotiques tel que Bcl-2, mais aussi Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1 et des membres proapoptotiques comme Bax, Bak, Bcl-XS, Bok, Bad, Bim, Noxa... etc. (151, 152). En effet, l'identification d'un nouveau membre proapoptotique Bid, fut une découverte majeure. Bid

permet de faire le lien entre les récepteurs de mort et la libération de cytochrome c en établissant ainsi le lien entre la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Bid est directement clivé par la caspase 8 et le fragment C terminal permet la libération de cyt c. Le rapport entre les membres proapoptotiques et antiapoptotiques détermine la décision vers la mort ou la survie cellulaire (4, 138, 153, 154). Durant l'apoptose, la membrane mitochondriale doit être perméable d'une manière ou d'une autre, sélective ou non. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'action des membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 ; formation de canaux, formation de pores lipidique, formation de canaux chimériques et ouverture de pore géant. On ne sait pas cependant si les modifications de perméation des deux membranes sont corrélées ou comment. Toutefois, ces modifications sont modulées par les protéines pro-ou-anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les protéines antiapoptotiques sont en partie localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale, cette localisation empêche la dissipation du potentiel ainsi que la libération de cyt c. Inversement, il semble que les protéines proapoptotiques puissent directement induire ces modifications. En effet, Bcl-XL, Bax peuvent interagir avec VDAC, cette interaction modifie la perméabilité des membranes mitochondriales. Il semble que Bax / Bak puisse soit induire un changement de conformation du canal VDAC à fin de former un pore permettant le passage de différentes molécules apoptogènes soit interagir directement avec VDAC et participer ainsi à agrandir le pore (4, 155).

II.4. Les maladies liées à la mitochondrie, le stress et l'apoptose

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites dans la chaîne respiratoire mitochondriale sont impliquées dans de très nombreuses maladies comme les maladies neurodégénératives, l'ischémie-réperfusion, le vieillissement ... etc. (29).

II.4.1. Le vieillissement

Le stress oxydant est impliqué dans la détérioration progressive des structures cellulaires accompagnant le vieillissement. La théorie des radicaux libres de vieillissement " free radical theory of aging" proposée par Harman est basée sur l'idée que les macromolécules vitales des cellules constamment exposées au ROS sont endommagées progressivement. Cette théorie postule que les altérations au hasard de l'ADNmt sont responsables du déclin énergétique accompagnant la sénescence. D'autre part, il est observé que le nombre de copies d'ADNmt augmente avec l'âge chez le rat et l'homme. Une autre théorie apparentée, la théorie mitochondriale de vieillissement "mitochondrial theory of aging" propose que le vieillissement soit le résultat de l'accumulation de l'ADNmt endommagé par les ROS conduisant au

dysfonctionnement des complexes de la chaîne et par la suite la sénescence. Le vieillissement est caractérisé par l'augmentation de la production des ROS et la diminution des activités et des capacités des systèmes antioxydants conduisant au déséquilibre de la balance pro-oxydants / antioxydants et l'accumulation des dommages oxydatifs et l'apoptose. Il a été démontré que l'activité de la SOD mitochondriale augmente significativement chez les sujets âgés avec diminution du taux des GPx, Cu-Zn/SOD et de la catalase (10, 29, 156).

II.4.2. L'ischémie-réperfusion

L'ischémie correspond à l'interruption complète ou partielle de l'irrigation sanguine d'un tissu ou d'un organe. L'hypoxie résultante aboutit à la diminution de l'activité de la chaîne respiratoire et la réduction de la synthèse d'ATP. La réperfusion correspond à la réoxygénation de tissu ischémique, observée surtout lors des thromboses et la transplantation d'organes. Sur le plan mitochondrial, elle est caractérisée par une augmentation des ROS dans la matrice mitochondriale et surcharge de cette dernière en calcium. Cela provoque l'ouverture de pore géant et la libération du cytochrome c et les autres facteurs proapoptotiques en aboutissant à la mort cellulaire programmée. Il est observé que l'ischémie brève provoque l'apoptose alors que l'ischémie prolongée conduit à la nécrose. Il existe plusieurs agents agissant sur la mitochondrie et qui inhibent l'apoptose, c'est le cas des inhibiteurs des caspases et la cyclosporine. La cyclosporine protège les myocytes et les hépatocytes de la mort apoptotique induite par l'anoxie, et minimise les dommages suivant la réperfusion des cellules de cœur, de foie et du cerveau (80, 157, 158, 159, 160).

II.4.3. Les maladies neurodégénératives

Le dysfonctionnement mitochondrial conduit aux dommages oxydatifs détectés dans plusieurs maladies neurodégénératives. Ces pathologies sont souvent liées à des facteurs génétiques liés en grand part à des facteurs exogènes comme le stress (29). Le stress oxydant constitue un événement principal dans la pathogénie de la maladie de Parkinson (PD). L'évidence pour ceci dérive des études *in vitro* et *in vivo*. La maladie de Parkinson est caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la substance grise du système nerveux qui due à l'augmentation des ROS formées lors du métabolisme des catécholamines ; la dopamine par exemple conduit à l'apoptose de manière dose dépendante ; le métabolisme chimique ou enzymatique de la dopamine elle-même catalyse la production des espèces réactives de l'oxygène. L'oxydation enzymatique de la dopamine aboutit à la formation de H₂O₂ par l'intermédiaire de la monoamine oxydase. Il est ainsi observé que le taux de GSH et l'activité enzymatique de complexe I diminuent chez les patients parkinsoniens. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la

réduction des activités des complexes II, III et VI dans les cellules cervicales et II et III dans la maladie de Huntington (161, 162, 163, 164, 165).

II.4.4. Les encéphalomyopathies mitochondriales

Les encéphalomyopathies mitochondriales constituent l'une des maladies liées aux mutations de l'ADN_{mt}. La Plupart de ces mutations conduit au dysfonctionnement des transporteurs de la chaîne mitochondriale et par conséquent la phosphorylation oxydative avec prolifération excessive des mitochondries innormales. Une étude récente a constaté l'augmentation de l'apoptose dans les biopsies musculaires des sujets ayant des mutations au niveau des gènes codants les protéines de la chaîne respiratoire par rapport à ceux possédant des mutations au niveau des gènes structuraux. L'augmentation des taux de malondialdéhyde, de 8-OH²dG, et l'augmentation de niveau des protéines carbonylées ont été observées chez les sujets atteints par des encéphalomyopathies mitochondriales (166, 167, 168).

II.4.5. Sclérose amyotrophique latérale (SAL)

La responsabilité la plus nette des radicaux libres est mise en évidence dans les maladies directement induites par des anomalies d'un gène antioxydant. Plusieurs mutations de la Cu/Zn SOD ont été observées dans les formes familiales d'une maladie neurologique de la sclérose latérale amyotrophique. Il a été proposé que la SOD 1mutée exerce son activité toxique par des mécanismes impliquant la formation excessive de ONOO⁻. Cette pathologie est inhibée par la vitamine E, les inhibiteurs des caspases et la protéine Bcl-2 (53, 169).

II.4.6. Le cancer

Les relations entre le stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites ; les RL interviennent dans l'activation des pro- carcinogènes en carcinogènes, créant des lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibent les gènes suppresseurs des tumeurs comme la P₅₃. La p₅₃ est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Il est porté que la p₅₃ peut agir sur le PTP et la libération du cytochrome c et l'AIF et qu'elle subit des mutations dans la majorité des cancers chez l'homme (170). Les défauts de la phosphorylation oxydative ont été observés dans plusieurs autre maladies comme l'atrophie de Leber et les différents types d'ataxies. Dans l'ataxie de Friedreich, la déficience en frataxine entraîne un trop plein de fer dans la matrice mitochondriale qui conduit à l'apparition des RL et la destruction des complexes de la chaîne respiratoire (171, 172, 173).

II.5. Les flavonoïdes

En terme chimique, la diversité des plantes est reflétée par l'énorme variabilité interspécifique des produits de métabolisme secondaire. Les composés phénoliques constituent un groupe très important de métabolites secondaires. Ils se reconnaissent à la présence d'un ou de plusieurs groupements OH modifiés ou non, attachés à une structure aromatique (174). Les composés phénoliques des végétaux constituent un groupe d'une extrême diversité dont les flavonoïdes font partie. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour. Ainsi, nous en absorbons chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale (60, 175).

II.5.1. Définition des flavonoïdes

Le terme flavonoïdes (du latin, flavus : jaune) rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent une classe de plus de 4000 phénylbenzopyranes dont la fonction principale semble être la coloration des fleurs et des fruits. Les flavonoïdes sont également présents dans les cellules épidermiques des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs des rayons ultra violets. Pour les plantes, ils régulent la croissance et la reproduction par induction de l'expression des gènes et par d'autres voies (84, 108, 176, 177, 178).

II.5.2. Distribution et localisation des flavonoïdes

La présence des flavonoïdes chez les algues n'a pas, à ce jour, été démontrée. S'ils sont fréquents chez les bryophytes, ce sont toujours des flavonoïdes majoritairement des *O*-et *C*- hétérosides de flavones et des dérivés *O*-uroniques. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes (salade, choux, épinards, etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones. Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin, et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires (84, 179).

II.5.3. Structure générale et classification des flavonoïdes

II.5.3.1 Structure générale

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, ont la même unité structurale de base. Le squelette de base est composé de deux cycles benzéniques A et B réunis

par un hétérocycle pyrane ou pyrone (avec une double liaison) C au milieu ; c'est le noyau chromane $C_6-C_3-C_6$ (84, 108, 180).

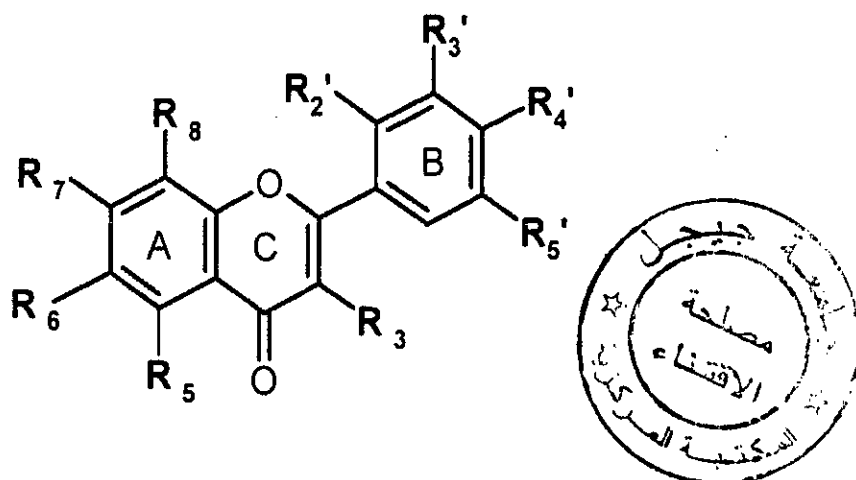


Schéma 10 : Squelette de base des flavonoïdes (181)

II.5.3.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire présentant une grande variabilité structurale. Ils sont subdivisés en plusieurs classes selon la présence (ou l'absence) d'un groupement oxydé à la position 4, d'une double liaison entre le carbone 2 et 3, ou d'un hydroxyle en position 3 de l'hétérocycle C. Structuellement, ils sont repartis en quinze familles de composés dont les plus importants sont les anthocyanes, flavonol, catéchines, flavanones, isoflavones et dihydroflavonols. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone (84, 108).

II.5.4. La biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont formés dans les chloroplastes et participent à la phase lumière-dépendante de la photosynthèse pendant laquelle ils catalysent le transfert des électrons. Ils sont synthétisés à partir des acides aminés aromatiques, phénylalanine et tyrosine, et les unités d'acétate. Généralement, leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun le 4,2,4',6' tétrahydroxychalcone. Par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune est métabolisée en différentes classes des flavonoïdes. Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et d'acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent in vivo (84, 108, 182). (Voir schéma 11)

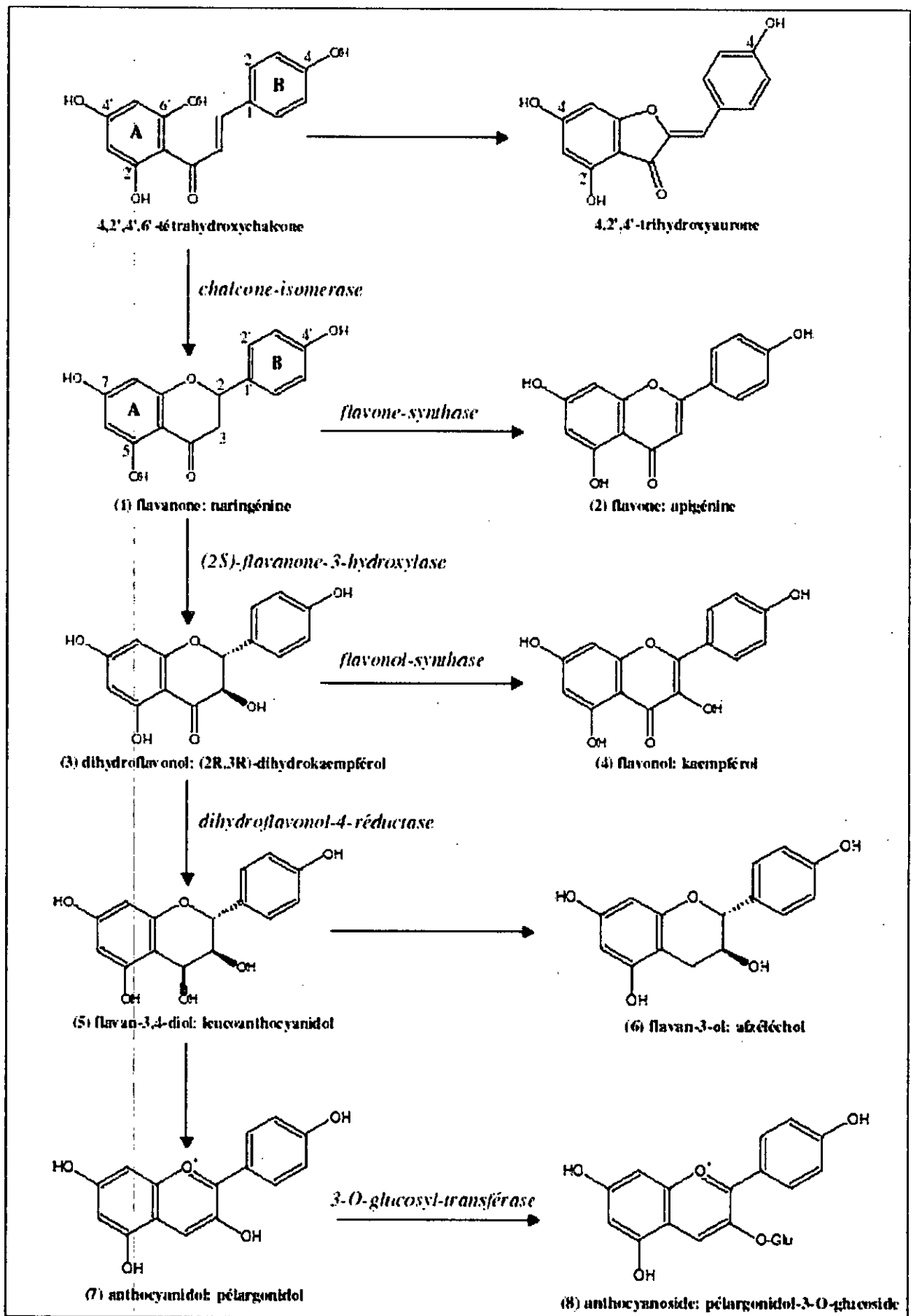


Schéma 11 : La biosynthèse des flavonoïdes (84)

II.5.5. Pharmacocinétique des flavonoïdes

Une des quelques études récentes sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme a été effectuée par Cova et al 1992 en utilisant la diosmine, la forme glycosylée de la diosmetine.

II.5.5.1. Métabolisme des flavonoïdes

Les flavonoïdes liés aux sucres sont appelés les flavonoïdes hétérosides, alors que ceux qui ne sont pas liés sont des flavonoïdes aglycones. A l'exception des flavanols, les flavonoïdes existent dans la nature sous forme glycosidique (180). Le duodénum est le site crucial de l'absorption des flavonoïdes diététiques. A ce niveau, les aglycones sont métabolisés par les enzymes de conjugaison et les métabolites résultants sont ensuite secrétés dans la muqueuse et le sang (183, 184). Les formes circulantes des flavonoïdes absorbés ont été identifiés comme méthylés, sulfatés, ou liés à l'acide glucuronique (185). Les métabolites des flavonoïdes sont ensuite éliminés soit dans les urines soit par voie biliaire. La partie éliminée dans la bile est captée par le foie où elle est métabolisée par les enzymes hépatiques. Une fois excrétés dans la bile, ces métabolites sont déversés dans le duodénum où ils peuvent être réabsorbés après hydrolyse par la flore microbienne permettant ainsi de maintenir une concentration non négligeable dans le sang (177, 186).

II.5.5.2. Biodisponibilité des flavonoïdes

La biodisponibilité des flavonoïdes est l'un des sujets compliqués, et les études faites dans ce domaine ne prennent pas en considération certains paramètres comme l'absorption intestinale et le métabolisme splanchnique (177). Il est bien déterminé que la glycosylation et sa nature influent puissamment la biodisponibilité des flavonoïdes (187). En général, la biodisponibilité des flavonoïdes est relativement faible et dépend de trois facteurs principaux : la capacité de transport via la cellule intestinale, l'intensité de la sécrétion des métabolites conjugués et l'activité de la sécrétion biliaire. Hollman et Katan 1998 ont discutés la biodisponibilité et les effets bénéfiques des flavonoïdes chez l'homme, ils ont trouvé que les formes glycosidiques de la quercétine étaient mieux absorbables que la forme aglycone. Pour la quercétine, le pic (196µg/ml) est atteint après 2,9 heures, avec un temps de demi vie d'élimination de 16,8h, de distribution de 3,8h et d'absorption de 0,87h. La biodisponibilité a un effet direct sur les effets biologiques des polyphénols et notamment sur la capacité antioxydante des tissus. In vitro, le pouvoir antioxydant de nombreux polyphénols est supérieur à celui de la vitamine C et de la vitamine E (108, 177, 188).

II.5.6. Les activités biologiques des flavonoïdes

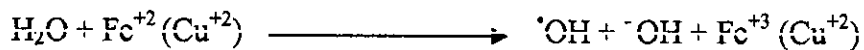
Pour la plante, les flavonoïdes ayant un rôle très important notamment dans le contrôle de la croissance et du développement en interagissant de manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains flavonoïdes jouent un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire les métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre les infections causées par les bactéries ou par les champignons. Ils sont des composés phénoliques ayant un spectre large d'effets biologiques comme ils sont les composants les plus actifs de plusieurs plantes médicinales (84, 176, 189, 190). En règle générale, les flavonoïdes sont, in vitro, des inhibiteurs d'une large gamme des enzymes telles la lipooxygénase, la cyclooxygénase, monooxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A₂ et la protéine kinase (191). Par leur propriété "vitaminique p", ils diminuent la perméabilité des vaisseaux capillaires, renforçant leur résistance. Ils possèdent ainsi des propriétés anti-allergiques, anti-ischemiques, antibactériennes, antivirale, antithrombotiques, antitumorales et antioxydantes (190, 192, 193, 194).

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase (84). L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est due aussi à leur capacité à induire l'apoptose des cellules tumorales en plus d'inhiber la phase initiatrice que progressive de cancer. Il est probable que le pouvoir antioxydant des flavonoïdes est à l'origine de leurs activités biologiques (195, 196, 197, 198).

➤ Effet antioxydant des flavonoïdes

a. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu²⁺) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs de différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques. On peut résumer (schéma) les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (i) un noyau catéchol sur le cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (84).

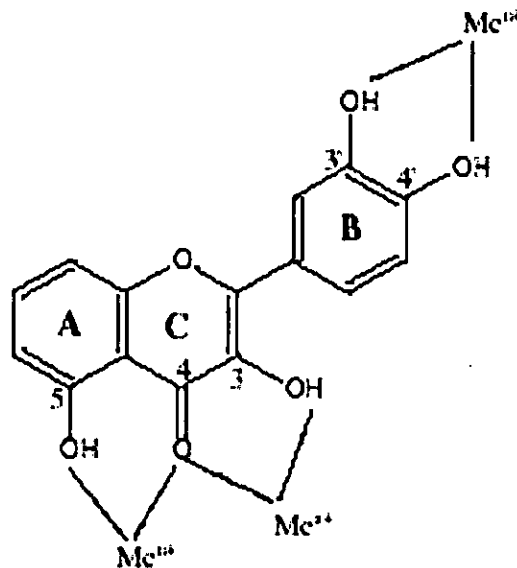


Schéma 12 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}).
(84)

b. Piégeage des radicaux libres

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études à fin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante:



Où $\text{R}\cdot$ représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxy (FL-O \cdot) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable comme le montre le schéma 13.

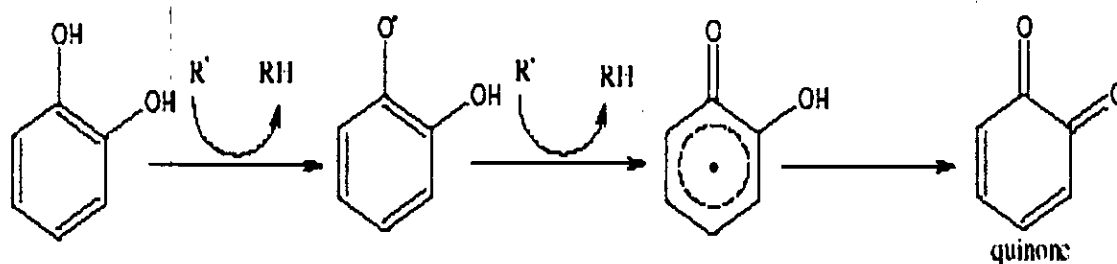


Schéma 13 : Piégeage des ROS (R^\bullet) par les flavonoïdes (84).

En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Nous constatons que la capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox du couple FL-O• / FL-OH mais aussi de la réactivité du radical flavonoxy. De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (84, 199, 200, 201).

Plusieurs flavonoïdes sont des inhibiteurs des voies enzymatiques et non enzymatiques de la peroxydation lipidique ; l'effet protecteur des flavonoïdes contre les dommages de la peroxydation a été bien établi, et semble dépendre de leurs structure et capacité d'agir et de pénétrer dans la bicouche lipidique (84, 108). La quercétine et autres flavonoïdes ayant un effet inhibiteur très remarquable sur la production de l'anion superoxyde dont le déterminant essentiel de cette inhibition est le groupement OH du cycle B de la molécule flavonoïdique. D'autre part, ils réagissent rapidement avec le radical $\cdot\text{OH}$ en raison de la grande réactivité de ce dernier avec les composés aromatiques (108). Mais, les flavonoïdes peuvent servir de prooxydants en présence des ions cuivriques et de ce fait, plusieurs sont postulés d'être un facteur mutagéniques. Leurs effets indésirables sont le résultat de l'activité prooxydante qu'antioxydante (189). Sur un autre plan, la différence qui existe entre les flavonoïdes dans la structure, la biodisponibilité et le métabolisme exige l'étude individuelle de chaque composé pour évaluer son propre potentiel biologique (176, 202).

En analysant tous les résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants:

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (84).

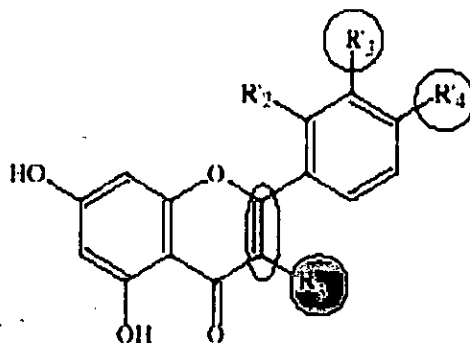


Schéma 14 : éléments essentiels pour l'activité antioxydantes des flavonoïdes (84).

II.5.7. La propolis comme source des flavonoïdes

Le monde animal est très concerné par les flavonoïdes ; on trouve par exemple la quercétine et la galangine dans la propolis des abeilles. Les abeilles ont été en existence pour plus de 125 millions d'années, et leur succès évolutionnaire leur a permis de devenir l'espèce éternelle qui peut exploiter pratiquement tous les habitats sur terre. Ce succès est en grande partie en raison de la chimie et les applications des produits spécifiques que les abeilles fabriquent ; miel, cire, venin, pollin, gelé royale et propolis (84, 203).

II.5.7.1. Définition

La propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques avec un aspect physique qui change considérablement selon plusieurs facteurs; quelques échantillons ont une texture friable et dure, alors que d'autres peuvent être élastiques et gommeux. Elle est recueillie par les abeilles sur certaines parties de végétaux essentiellement les bourgeons et les écorces. Le mot propolis dérive du grec : *pro* qui signifie en avant et de *polis*, la ville. L'interprétation de cette appellation est que la propolis se trouve à l'entrée de la ruche, on ait ainsi baptisée poétiquement cette substance se trouve juste à l'entrée de la ville des abeilles. La propolis est ramassée par l'abeille, mélangée avec de la cire et employée dans la construction et l'adaptation de la ruche pour construire principalement une véritable barrière de défense juste en arrière du trou de vol (204, 205, 206, 207, 208).

II.5.7.2. Origine de la propolis

De nombreuses investigations ont établi qu'en Europe centrale, ainsi qu'en Amérique de nord et les régions non tropicales d'Asie, la source principale de la propolis est l'exsudat des bourgeons de peuplier. Cependant, les arbres de peuplier ne peuvent pas se développer dans les régions

tropicales ce qui oblige les abeilles de remplacer la trouvaille d'autres sources de collection. C'est l'origine de la collection de la propolis qui explique l'odeur, la couleur, la composition chimique de la propolis (202, 209, 210).

II.5.7.3 Composition chimique

Au total, plus de 300 composés ont été identifiés dans les différents échantillons de la propolis. Les techniques modernes d'analyse ont permis d'apporter une idée assez précise de la composition qualitative et quantitative de la propolis. Elle est composée des : acides gras et acides phénoliques et ses esters, B stéroïdes, terpènes, flavonoïdes (pinocembrine, quercetine...), acides phénols, aldéhydes aromatiques et alcool. Globalement, elle est composée de 50% de résines et baumes, 30% de cires, 10% d'huiles essentielles, 5% de pollin et 5% de matières diverses. Cette composition varie essentiellement avec le site de collection (204, 211, 212, 213).

II.5.7.4. Activités biologiques

La propolis est un type de médicament qui a été utilisée très anciennement comme remède folklorique. Elle est largement utilisée dans l'hémisphère de nord en raison de ses propriétés médicales. La littérature indique que les flavonoïdes, les acides aromatiques et les diterpènes étaient les composés responsables des activités biologiques de la propolis et spécialement les flavonoïdes. Les préparations à base de la propolis possèdent un spectre très large d'activités pharmacologiques ; la propolis est utilisée comme substance antibactérienne et antifongique, antivirale, anticancéreuse, antioxydante, antiulcéreuse et hépatoprotectrice (214, 215, 216, 217, 218, 219).

MATERIEL
&
METHODES

MATERIEL ET METHODES

III-1- MATERIEL

III-1-1- Matériel végétal

III-1-1-1- Récolte de la propolis

La propolis est récoltée des ruches de la coopérative apicole de Kaous (JIJEL) par grattage et raclage de l'entrée des ruches et aussi des alvéoles. Elle provient de ruches dont les abeilles ont été élevées naturellement. Les conditions de stockage sont respectées : la propolis est conservée dans des récipients fermés hermétiquement et placés dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant son utilisation à fin de garder ses principes actifs intacts. Elle est ensuite découpée en petits morceaux puis lavée dans l'alcool absolu pendant 2 heures pour éliminer les impuretés, ensuite plongée dans l'alcool 95° pendant 15 jours.

III-1-1-2- préparation de l'extrait éthanolique et extraction des glycosides flavoniques de la propolis

Dans cette étape, nous avons procédé à l'extraction des substances bioactives de la propolis. Les solvants utilisés sont le méthanol et l'éthanol. La quantité de la propolis est additionnée de dix volumes de solvant (éthanol) de son poids (pour 1g de propolis nous avons ajouté 10 ml de solvant).

L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon le protocole décrit par BRUNETON (1996) en utilisant l'éthanol et le méthanol pour extraire les composés phénoliques parmi eux les flavonoïdes, l'éther de pétrole pour se débarrasser des cires et des graisses.

Les genines libres ou aglycones flavoniques sont extraits par l'éther diéthylique et les hétérosides flavoniques par l'acétate d'éthyle. Pour cela, la propolis est découpée en petits morceaux, lavée dans l'éthanol pendant deux heures pour éliminer les impuretés et laissée macérer pendant 15 jours dans l'éthanol 95% (1g de propolis pour 10ml d'éthanol).

Après filtration sur le coton, le filtrat est évaporé à 57 °C en utilisant un évaporateur rotatif (évaporateur Heidolph). Le résidu est repris dans le méthanol 70% et laissé à macération pendant une nuit. Après évaporation, l'extrait obtenu est appelé extrait brut (extrait éthanolique). A fin d'extraire les aglycones et les hétérosides flavoniques ; l'extrait brut (40g) est suspendu dans 1

litre de méthanol/eau (V/V) et la solution subit une série d'affrontement par trois solvants différents.

- a. *Affrontement par l'éther de pétrole* : nous avons ajouté 500 ml d'éther de pétrole à la phase hydroalcoolique. Après agitation énergétique et repos de 10 min dans une ampoule à décanter, deux phases sont obtenues : une phase organique en haut contenant les graisses et les cires et une phase hydroalcoolique en bas.
- b. *Affrontement par l'éther diéthylique* : sur la phase hydroalcoolique obtenue après affrontement par l'éther de pétrole, nous avons répété les mêmes opérations mais avec un autre solvant qui est l'éther diéthylique. Deux phases sont ainsi obtenues ; phase éther diéthylique en haut et phase hydroalcoolique en bas.
- c. *Affrontement par l'acétate d'éthyle* : sur la phase hydroalcoolique obtenue après affrontement par l'éther diéthylique, nous avons répété les mêmes opérations mais avec l'acétate d'éthyle. De même, deux phases sont apparues, une phase acétate d'éthyle contenant les glycosides flavoniques et une autre hydroalcoolique en bas qui subit trois autres affrontements par le même solvant pour extraire le maximum de substances bio-actives.

La phase acétate d'éthyle subit une évaporation à sec dans le rotavapeur à 45°C avec la pesée de l'extrait obtenu.

III-1-1-3- Analyse chimique des extraits de propolis

- **Chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait éthanolique de propolis**

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées.

Les produits flavoniques auxquels on attribue la majorité des effets biologiques de la propolis sont recherchés et séparés par chromatographie sur couche mince. Nous avons utilisé le gel de silice comme phase stationnaire et l'éthanol à 95% eau distillé (55/45 v/v) comme système

solvant. Les spots des produits séparés sont observés par UV à 254 et 336 nm et les rapports frontaux sont ensuite calculés selon la réaction suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

- **Chromatographie sur couche mince de la phase acétate d'éthyle de propolis (CCM des hétérosides flavoniques)**

L'acétate d'éthyle est le solvant préférentiel des hétérosides flavoniques. Pour la CCM de ce type de flavonoïdes, qui sont la forme glycosylées des aglycones flavoniques, nous avons utilisé le gel de silice comme phase stationnaire et le système (Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau (100:17:13) v/v) comme système solvant. Les spots sont observés par UV à 254 et 336 nm.

- **Hydrolyse acide des hétérosides flavoniques et chromatographie des sucres**

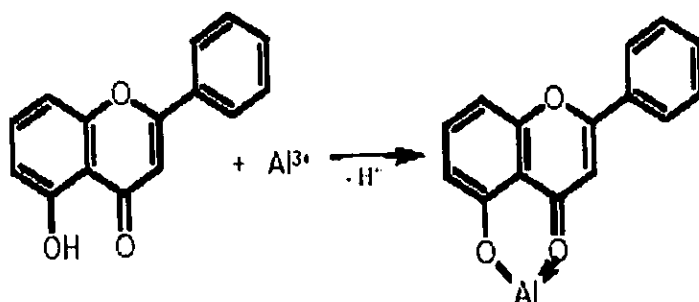
Pour la séparation de la partie sucre de la partie aglycone, une hydrolyse est effectuée sur 0.5 g de l'extrait acétate d'éthyle qui sont placés en présence de 100 ml de HCl 2 N froid. Les solutions sont ensuite placées au bain-marie à 100 C° pendant 60 min. par cette méthode, nous avons libéré les sucres et les aglycones flavoniques dans la phase aqueuse acide.

Pour la chromatographie des sucres, nous avons utilisé le gel de silice comme phase stationnaire toujours, le système BAW (Butanol/Acetic acid/ Water 4/1/5 v/v) comme phase mobile et la solution de molish comme révélateur des sucres.

- **Dosage différentiel des flavonoïdes**

Après l'hydrolyse acide, les aglycones sont extraits comme suit: la phase aqueuse acide est extraite 2 fois par l'éther éthylique. Les extraits obtenus, de couleur jaune, sont mis à évaporer, puis repris dans quelques millilitres d'éthanol 95°. Le dosage différentiel des flavonoïdes est effectué en se basant sur les propriétés chélatantes d'AlCl₃ à 2 % en solution dans l'éthanol 95°.

Le taux des flavonoïdes a été déterminé par la méthode de réactivité avec le AlCl₃ comme décrit par Boharune et al 1996 (220). Le principe de la réaction est la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes comme le montre la figure suivante :



Deux solutions sont nécessaires: la première avec l'éthanol 96°, la seconde dans l'éthanol 96° contenant AlCl_3 à 2%. Après 10 minutes d'incubation, on lit l'absorbance à 430 nm.

La teneur en aglycones exprimé comme la quercétine en (mg quercétine équivalent/g de l'extrait de propolis) est calculée selon la formule suivante:

$$C = (\text{DO}/\epsilon) \cdot M \cdot V \cdot (d/p)$$

Avec:

C : le taux des flavonoïdes en mg/g de propolis.

DO : densité optique.

M : Masse molaire de la quercétine (= 366 g/mole)

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de la quercétine (=23 000).

P : poids de l'extrait de la propolis en gamme.

d : Facteur de dilution.

• Préparation de différentes dilutions (concentrations) des extraits

Le dosage des flavonoïdes dans la solution mère aboutit à l'obtention d'une concentration de 370 mg/ml. Cette solution est considérée comme solution molaire, et à partir de laquelle, nous avons préparé les différentes concentrations molaires (10^{-2} M, 10^{-4} M, 10^{-6} M, et 10^{-8} M).

Pour la préparation de la concentration 10^{-1} M par exemple, nous avons pris 1 ml de la solution mère avec 9 ml de l'eau distillée.

- **La spectroscopie infrarouge (IR) de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis**

Les techniques de spectroscopie IR sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature des groupements fonctionnels d'une molécule ou d'un mélange de molécules. Nous avons passé nos extraits (extrait éthanolique et hétérosides flavoniques de propolis) par l'IR pour connaître globalement la nature des groupements fonctionnels qui existent dans les molécules des extraits en utilisant un appareil Shimadzu 8400S.

Les analyses ont été réalisées en milieu solide pour les hétérosides flavoniques, à partir d'une pastille contenant l'échantillon dilué dans 1 % de KBr et dans un milieu liquide pour l'extrait éthanolique de propolis. Dans ce dernier cas, une goutte de l'échantillon est mise sur le porte échantillon est passé directement par l'IR.

III-1-2-Matériel animal

III-1-2-1-Entretien des animaux

Notre étude a été réalisée sur des rats wistar albinos mâles (institut Pasteur d'Alger, Algérie) pesant environ 150 g. Les animaux sont repartis en plusieurs lots de 10 rats chacun. Ils ont libre accès d'eau et de nourriture. L'animalerie est maintenue à une température de 22° C et une photopériode de 12^H / 12^H. Les animaux ont été traités conformément aux principes et directives énoncés dans le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation.

III-1-2-2-Traitement des animaux

Notre étude sur le stress oxydant est divisée en deux grandes parties, l'étude in vitro et l'étude in vivo.

Evaluation de l'effet antioxydant de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis in vitro sur des mitochondries et des cellules hépatiques

Réalisée sur les mitochondries isolées et les cytosols des cellules hépatiques des rats n'ayant été rien administrés (des rats témoins). Dans ce type d'étude, la substance testée est mise en contact direct avec la mitochondrie ou le cytosol. Par cette étude, on peut savoir si les flavonoïdes sont doués de propriétés antioxydantes avant de subir le métabolisme entérohépatique.

L'étude in vivo

Cette étude est subdivisée en trois types de recherche :

- *Evaluation de l'effet antioxydant de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis in vivo à long terme* : puisqu'il n'y a pas dans la littérature des études faites sur l'effet à long terme des flavonoïdes de la propolis sur le stress oxydant cellulaire et mitochondrial, nous avons décidé de réaliser cette recherche qui a comme buts essentiels : l'évaluation de la tolérance de l'organisme à l'égard d'une administration prolongée par l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis ou d'autre terme d'évaluer la toxicité éventuelle des extraits après une période d'administration de deux mois et de voir si l'activité des flavonoïdes obtenue in vitro est gardée après métabolisation entérohépatique de ces derniers.
- *Evaluation de l'effet préventif de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis* : consacrée pour rechercher la capacité de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis à prévenir le stress oxydant induit par l'administration d'un anticancéreux, la doxorubicine à la dose de 10 mg/Kg. Dans ce type d'étude, l'administration de médicament est précédée par l'administration des extraits.
- *Evaluation de l'effet curatif de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis* : consacrée pour rechercher la capacité de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis à corriger le stress oxydant induit par l'administration d'un anticancéreux, la doxorubicine à 10 mg/Kg. L'administration de médicament est suivie par administration des extraits naturels.

Notre travail réalisé dans le laboratoire de phytopharmacologie à l'université de Jijel a demandé cinq (05) groupes d'animaux répartis en plusieurs lots de 10 rats chacun.

Groupe d'animaux témoins

Lot 1 (10 rats) : animaux témoins recevant 1 ml d'eau distillée par voie orale.

Lot 2 (10rats) : les animaux reçoivent par gavage gastrique 1 ml de la solution de la quercétine à la dose de 0.033 mg/Kg pendant deux mois. La quercétine est préparée dans l'eau distillée.

Groupe d'animaux recevant les extraits seuls (les rats de l'étude à long terme)

Lot 1 (10rats) : animaux recevant 1 ml d'extrait aqueux de la propolis par gavage gastrique à la dose quotidienne de 100 mg/Kg pendant deux mois.

Lot 2 (10 rats) : les animaux reçoivent 100 mg/Kg des glycosides flavoniques par voie orale pendant deux mois.

Groupe d'animaux prétraités par les extraits (l'effet préventif)

Lot 1 (10 rats) : les animaux sont prétraités par les flavonoïdes de l'extrait aqueux de la propolis à une dose quotidienne de 100 mg/Kg par voie orale pendant un mois, puis injectés par la doxorubicine (10 mg/Kg) par voie intraveineuse pendant 3 jours.

Lot 2(10 rats) : les animaux sont prétraités par l'extrait aqueux des hétérosides flavoniques de la propolis à une dose quotidienne de 100 mg/Kg par voie orale pendant un mois, puis injectés par la doxorubicine (10 mg/Kg) par voie intraveineuse pendant 3 jours.

Groupe d'animaux recevant le médicament puis les extraits (effet curatif)

Lot 1 (10 rats) : les rats de premier lot reçoivent par voie intraveineuse la doxorubicine à la dose de 10 mg/Kg pendant 3 jour. L'extrait de la propolis est administré à partir de 4^{ème} jour par voie orale a une dose quotidienne de 100 mg/Kg. L'administration est poursuivie jusqu' à un mois.

Lot 2 (10 rats): les rats de deuxième lot reçoivent par voie intraveineuse la doxorubicine à la dose de 10 mg/Kg pendant 3 jour. L'extrait des hétérosides flavonique de la propolis est administré à partir de 4^{ème} jour par voie orale à une dose quotidienne de 100 mg/Kg. l'administration est poursuivie jusqu' à un mois.

Groupe d'animaux recevant le médicament seul (10rats)

Les animaux de ce lot sont traités par la doxorubicine à la dose de 10 mg/Kg pendant 3 jours par voie intraveineuse.

III-1-2-3-Sacrifice des animaux et prélèvement de foie

A la fin des délais d'administrations (pour l'étude in vivo) et après anesthésie par l'éther, les animaux sont sacrifiés, le foie est prélevé et divisé en deux fractions ; la première (la plus grande) est plongée dans le TSE et utilisée pour la préparation de la suspension mitochondriale et

de la matrice mitochondriale qui servent pour le dosage des paramètres mitochondriaux (anion superoxyde, gonflement mitochondrial, malondialdéhyde (MDA), l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes comme la SOD et la CAT), et la seconde dans la solution du KCl et sert pour le dosage du MDA, du glutathion hépatique cytosolique et des enzymes antioxydantes cytosoliques.

III-2-METHODES

III-2-1-Préparation (extraction) des mitochondries hépatiques

La préparation des mitochondries se fait selon la méthode décrite par Rustin et al (221). Il s'agit d'une centrifugation différentielle en utilisant une centrifugeuse de type Sigma 6K15.

Après décapitation d'un rat de 250 g environ, 10g de foie sont prélevés, coupés, ensuite finement émincés dans le tampon 1 (250 mM Sucrose, 50 mM Tris, 5 mM EGTA, PH 7.2 à 4°C) ou TSE. Les particules coupées sont ensuite lavées deux fois dans le même tampon et déposées dans un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA) contenant 30 ml de TSE ce qui permet la libération des mitochondries. L'homogénat récupéré est centrifugé une première fois à 1770 rpm (rond par minute) pendant 10 minutes, permettant ainsi l'élimination des débris cellulaires (membranes, noyau...) contenus dans le culot. Le surnageant issu de cette centrifugation subit une deuxième centrifugation pendant 10 minutes à 9600 rpm à 4°C et le culot de mitochondries obtenu est suspendu dans 13 ml de TSE et centrifugé à 9600 rpm pendant 10 minutes. Ce dernier culot est resuspendu dans 15 ml du tampon 2 (250mM Sucrose, 50mM Tris, PH 7.2 à 4°C) et centrifugé 10 minutes à 9600 rpm. Le culot final est subdivisé en deux fractions : la première est reprise dans 200µl du tampon 2 () ou TS pour obtenir la suspension mitochondriale et la seconde dans la solution hypotonique (25mM KH_2PO_4 , 5mM MgCl_2 , PH 7,2) qui sert à l'étude des enzymes antioxydantes mitochondriales. La concentration de protéines est calculée en utilisant la méthode de Lowry (222). On peut résumer les étapes de l'extraction des mitochondries hépatiques dans le schéma suivant :

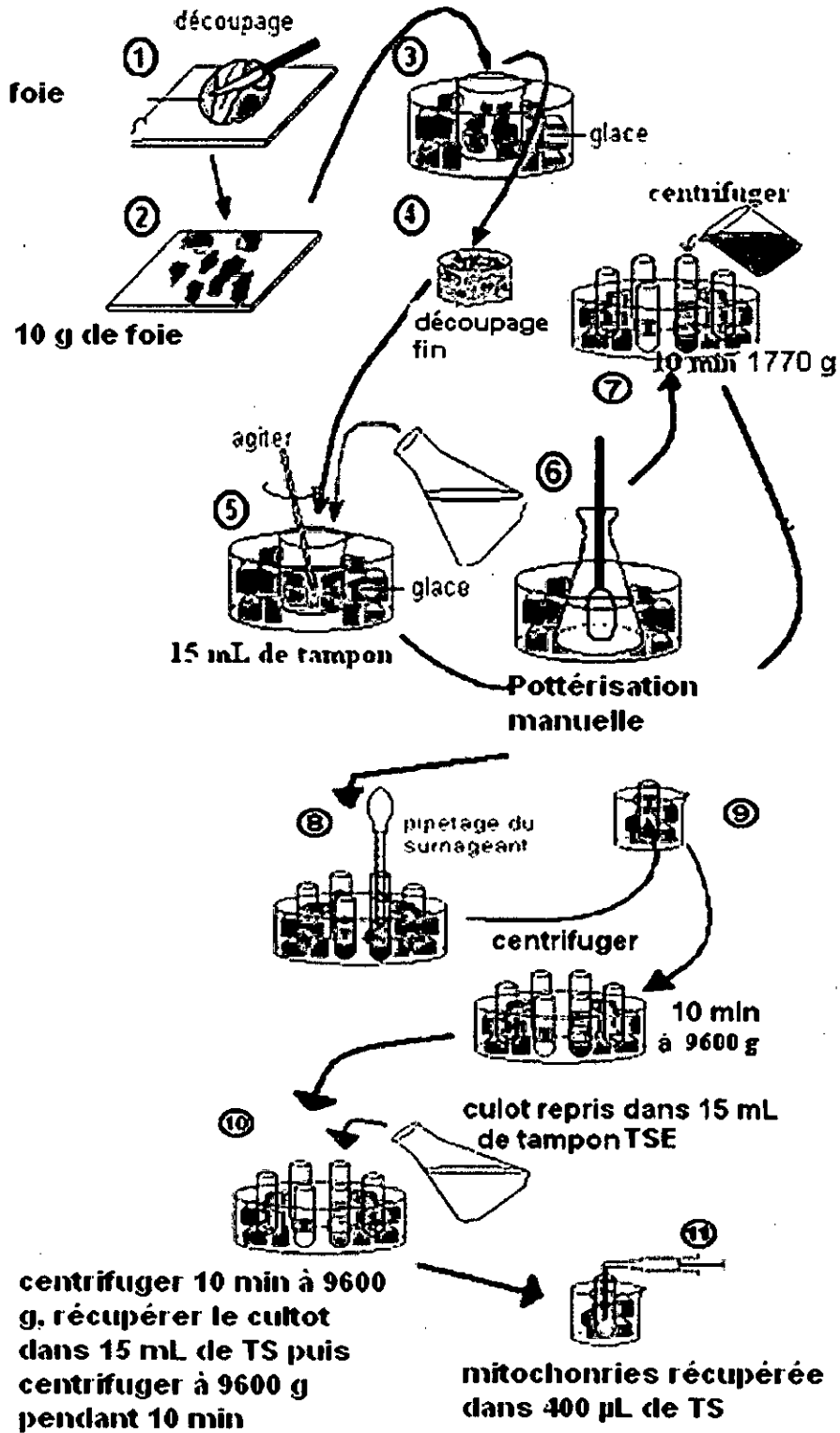


Schéma : protocole d'extraction des mitochondries hépatiques (221).

• **Extraction de la matrice mitochondriale**

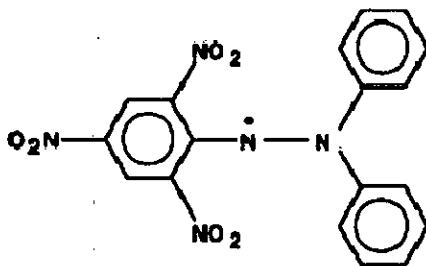
Un mélange de la solution hypotonique (25mM KH_2PO_4 , 5mM MgCl_2 , PH 7,2) et du culot (V/V) est congelé-décongelé de 6-8 fois avec potterisation accrue et répétée à fin d'éclater les mitochondries. Après centrifugation à 9600 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est utilisé comme source d'enzymes.

• **Extraction de la fraction cytosolique**

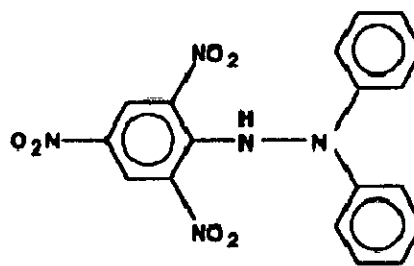
Pour extraire le cytosol des cellules hépatiques, nous avons suivi la méthode décrite en (223). Après sacrifice des rats, 1 g de foie est prélevé, plongé puis homogénéisé dans trois volumes de Kcl (1.17%). L'homogénat est centrifugé à 800 rpm pendant 15 minutes à 4°C en utilisant une centrifugeuse 6K15 à fin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant ainsi obtenu est centrifugé une deuxième fois à 9600 rpm pendant 45 min à 4°C toujours et le surnageant issu de cette dernière centrifugation est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques.

III-2-2-Mesure de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis

En vue d'évaluer l'effet scavenger des molécules antioxydantes, le test de DPPH (Diphényl-2-picryl- hydrazyl stable free radical) est utilisé. La capacité de piégeage des radicaux libres est fonction du pouvoir de réduire ce radical. Les molécules ayant cette propriété sont capables de réduire le radical DPPH (de couleur violette) en DPPH-H (de couleur jaune). Ce changement de couleur est traduit par décroissance de l'absorbance à 515 nm.



1: Diphénylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphénylpicrylhydrazine (nonradical)

La capacité à piéger les radicaux libres (effet scavenger) de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis est déterminée par l'utilisation de test du radical (DPPH)

comme il est décrit (224). Le test est effectué par mesure de la décroissance de l'absorbance à 515 nm d'une solution de DPPH 100 μ M (1.5 ml) préparée dans l'éthanol absolu en présence ou absence de 20 μ l de différentes concentrations de l'extrait éthanolique ou des hétérosides flavoniques de propolis au moyen d'un spectrophotomètre (Ultrospec 100 pro) pendant 5 minutes. L'effet est déterminé en % d'inhibition ou de dégradation de radical en prenant le 100% du control.

$$\% \text{ de réduction} = [A_N - A_D / A_N] \times 100$$

A_D : la DO de l'essai après 5 min.

A_N : la DO du témoin après 5 min.

III-2-3-Mesure de l'activité antilipoperoxydative

III-2-3-1-Dosage de MDA cytosolique

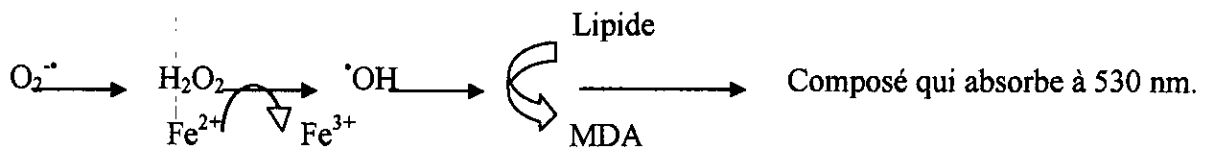
La peroxydation lipidique a été mesurée par l'essai d'acide thiobarbiturique TBA selon la méthode d' Okhawa et al 1979 (225). Le principe d'essai est le suivant : le MDA, un produit secondaire de la peroxydation lipidique, réagit avec deux molécules de TBA dans un milieu acide pour donner un pigment coloré en rose à 100°C et pH de 2-3 extractible par le butanol et la DO a été lue à 530 nm. Pour le dosage de MDA cytosolique, nous avons utilisé 1g de foie additionné à 3ml de la solution de KCl (1,15%) puis broyé par un homogénéiseur de DOUNCE. A 0.5ml de l'homogénat nous avons additionné 0,5ml d'acide trichloracétique 20% et 1ml d'acide thiobarbiturique 0,67%.

Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15minutes, refroidit puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant à l'aide d'un spectrophotomètre Ultrospec 100 pro. Le taux de MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions et les résultats sont exprimés en nmol/mg de protéines hépatiques. Le dosage de MDA cytosolique est réalisé chez les lots de rats de l'étude in vivo.

III-2-3-2-Dosage de MDA mitochondrial

Le dosage de MDA mitochondrial est effectué dans les deux types d'études tant in vitro qu'in vivo. La seule différence est que dans la première on ajoute aux mitochondries isolées le mélange $FeCl_2/FeCl_3$ et les différentes concentrations des extraits. La peroxydation lipidique des membranes mitochondriales in vitro est induite par le $FeCl_2/FeCl_3$ dont le principe est l'induction

de la réaction de Fenton et la formation du radical hydroxyle comme le montre la réaction suivante :



Pour le dosage de MDA mitochondrial, nous avons suivi la méthode décrite en (226). Les mitochondries hépatiques sont suspendues dans le NaCl 0,9‰ de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 mg/ml. Nous avons utilisé trois tubes ; le tube témoin contenant 800µl de la solution mitochondriale plus 100µl de NaCl, le tube blanc contenant 200µl de NaCl avec 800µl de la solution mitochondriale et le tube de mesure portant 800µl de la solution mitochondriale additionnée de 100µl de l'extrait à tester (les différentes concentrations de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis). Après incubation des tubes à 37°C pendant 10 minutes, nous avons ajouté dans chaque tube 100µl de la solution de fer (50µl de FeCl₂ 1mM/ 50µl de FeCl₃ 3mM) à l'exception du blanc. Après une deuxième incubation de 30 minutes à 37°C et centrifugation de 15 min (3000 rpm) à 20°C, 1ml du mélange (TBA 1%-NaOH 2N) est ajouté à 1 ml de surnageant. Finalement, le mélange est incubé pendant 30min à 97°C, refroidit, et la DO est lue à 530nm. Les concentrations de MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant le tetraméthoxypropane.

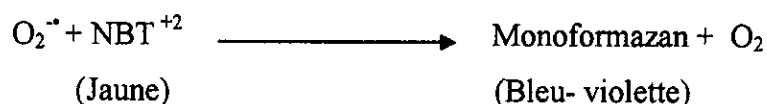
III-2-4-Mesure du gonflement mitochondrial

Les changements du statut de la perméabilité mitochondriale ont été évalués comme décrit précédemment (227). Le gonflement mitochondrial est estimé en mesurant le changement de l'absorbance de la suspension mitochondriale à 540nm au moyen d'un spectrophotomètre.

Dans un volume final de 1.8 ml du tampon respirant (250Mm Sucrose, 5Mm KH₂PO₄, pH 7.2), nous avons introduit 0,2 mg/ml de mitochondrie, 10.8µl de succinate à 6mM et 18µl de différentes concentrations de l'extrait à examiner successivement. Après une minute d'incubation, nous avons ajouté 2.25µl de CaCl₂ à 100µM pour induire le gonflement mitochondrial par ouverture de pore de transition de perméabilité. La décroissance de l'absorbance est suivie pendant 5 minutes à 540 nm et les DO sont prises d'une façon manuelle. Pour l'étude in vivo, la substance n'est pas ajoutée dans le milieu réactionnel et on doit ajouter ce volume (18 µL) au volume du tampon respirant.

III-2-5-Mesure de la production de l'anion superoxyde

Pour le dosage de la libération de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques, nous avons suivi la méthode précédemment décrite en (226). L'anion superoxyde est le radical le plus couramment généré par la mitochondrie. La génération de superoxyde a été évaluée en mesurant la réduction du nitrobluetetrazolium (NBT) en monoformazan qui absorbe à 560 nm selon la réaction suivante :



Dans un volume final de 1.2 ml de tampon respirant (250 mM Sucrose, 5mM KH₂PO₄, pH 7.2), nous avons introduit 16.5µl de la suspension mitochondriale, 1.2µl de la cyclosporine à 1µM, 12µl de NBT à 100 mM et enfin 12µl de l'extrait à tester à différentes concentrations. Après incubation pendant 1min nous avons additionné 7.2µl de succinate. La variation de l'absorbance est suivie à 560nm pendant 3 minutes.

III-2-6-Mesure de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes

III-2-6-1-Mesure de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale

L'activité de la catalase a été déterminée en adoptant la méthode de Clairbone (1985) comme décrit précédemment (228). Le principe est basé sur la disparition de H₂O₂ en présence de la catalase à 25°C selon la réaction suivante :



En bref, la cuve de mesure contient 1ml de tampon phosphate (0.1M, PH 7.2), 0.950 ml de peroxyde d'hydrogène (0.019M), 0, 025ml de la source enzymatique (la matrice mitochondriale ou le cytosol) et 0.025ml de différentes concentrations le l'extrait à tester.

La lecture de la DO est effectuée à 560nm chaque minute pendant deux minutes.

L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéines solen la relation suivante :

$$\text{UI/g de protéines} = \frac{2,303}{T} \log \frac{A_1}{A_2} / \text{g de protéines}$$

Sachant que :

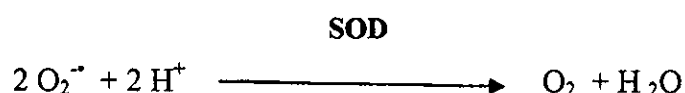
A₁ : absorbance au temps 0 min

A₂ : absorbance au temps 1 min

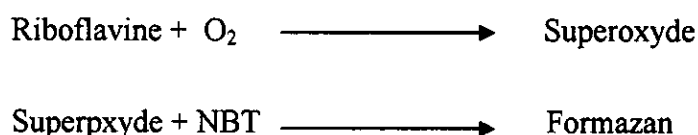
T : intervalle de temps en min

III-2-6-2-Mesure de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale

La SOD est une enzyme antioxydante très importante qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde O₂^{•-} en peroxyde d'hydrogène et oxygène selon la réaction suivante :



L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de Fridovich et Beauchamp (1971) (229). Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction de nitrobleu tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine, en présence d'un donneur d'électrons comme la méthionine, selon la réaction suivante :



La réduction du NBT par l'anion superoxyde en formazan a été suivie à 560 nm.

Le mélange réactionnel contient 2ml du milieu réactionnel (cyanide de sodium 10⁻² M, solution de NBT 1.76 × 10⁻⁴ M, EDTA 66×10⁻³ M et la riboflavine 2 × 10⁻⁶ M), 5ml de la source enzymatique (cytosol ou matrice mitochondriale) et 5µl de différentes concentrations des extraits à tester. Le mélange a été irradié avec une lampe de 15 watts pendant 10 min. l'absorbance a été mesurée à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI/g de protéine. Le control est préparé dans les mêmes conditions mais en absence de la source enzymatique.

Une unité d'activité de la SOD est définie en tant que la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50%.

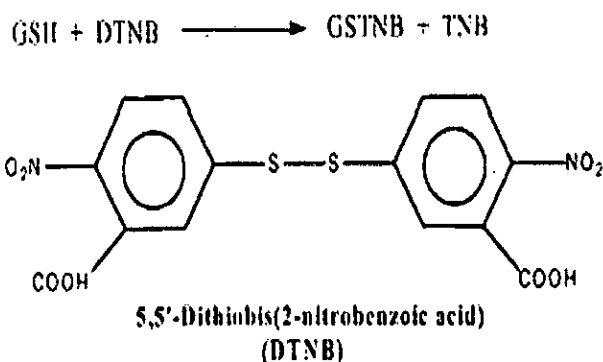
$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance du control} - \text{absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance du control}} \times 100$$

$$\text{SOD UI/g de protéines} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35$$

III-2-7-Dosage du glutathion hépatique

Le glutathion est le principal antioxydant propre à la cellule en se liant par son pôle SH aux métabolites toxiques. Le glutathion est un tripeptide composé de trois acides aminés : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Il est présent dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 0,5 à 10 mM et de l'ordre des μM dans le plasma (51).

Pour le dosage du GSH, nous avons utilisé la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) comme décrit précédemment par Anderson (230). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5' dithiodis 2 nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à PH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :



Pour cela, 1g de foie est homogénéisé avec trois volumes de l'acide trichloracétique TCA (5%) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. Homogénéisé et centrifugé à 2000 tours /minute, ensuite 50 μl du surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1M et PH 8). 20 μl du DTNB (0.01M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 5 minutes d'incubation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux de GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimées en millimole de glutathion par gramme de foie (m mole/g de foie).

III-3-Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par les médicaments à celles des groupes témoins d'une part, et d'autre part à celles traités par les flavonoïdes en utilisant le test t de Student.

ns ; différence non significative ; *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001.

RESULTATS
&
INTERPRETATION

IV. RESULTATS ET INTERPRETATION

IV-1-Résultats de l'étude chimique des extraits

IV-1-1-Les résultats chromatographiques

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, ces derniers subissent une chromatographie analytique sur couche mince (CCM). Les résultats de la CCM de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Comportement chromatographique sur couche mince de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis

Rf	Extrait éthanolique					Hétérosides flavoniques	
	0.51	0.60	0.70	0.82	0.89	0.56	0.76
Fluorescence	Jaune	Violette	violette	bleue	bleue	Violette	Violette

La CCM de l'extrait éthanolique de propolis en utilisant le système éthanol/eau comme phase mobile a permis d'identifier cinq (5) spots détectés sous la lampe UV entre 254-336. Les valeurs de Rf obtenus sont de 0.51, 0.60, 0.70, 0.82, 0.89 et la fluorescence des spots était jaune, violette, et bleue. Cette chromatographie nous a permis de révéler la présence de flavones et de flavonols dans la propolis.

Cependant, la CCM des hétérosides flavoniques dans le système acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/17/13 v/v) conduit à la détection de deux taches seulement de fluorescence violette.

D'autre coté, l'hydrolyse acide des hétérosides flavoniques et la chromatographie sur couche mince de la phase aqueuse acide avec détection par la solution de molish, un révélateur des sucres, conduit à l'apparition d'une seule spot d'un Rf de 0.21. Le Rf de cette tache correspond à celui du glucose. Le dosage des flavonoïdes donne une concentration de 356 mg/ml d'extrait de propolis.

IV-1-2- Spectroscopie IR des extraits

L'analyse IR de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis donne les spectres suivants :

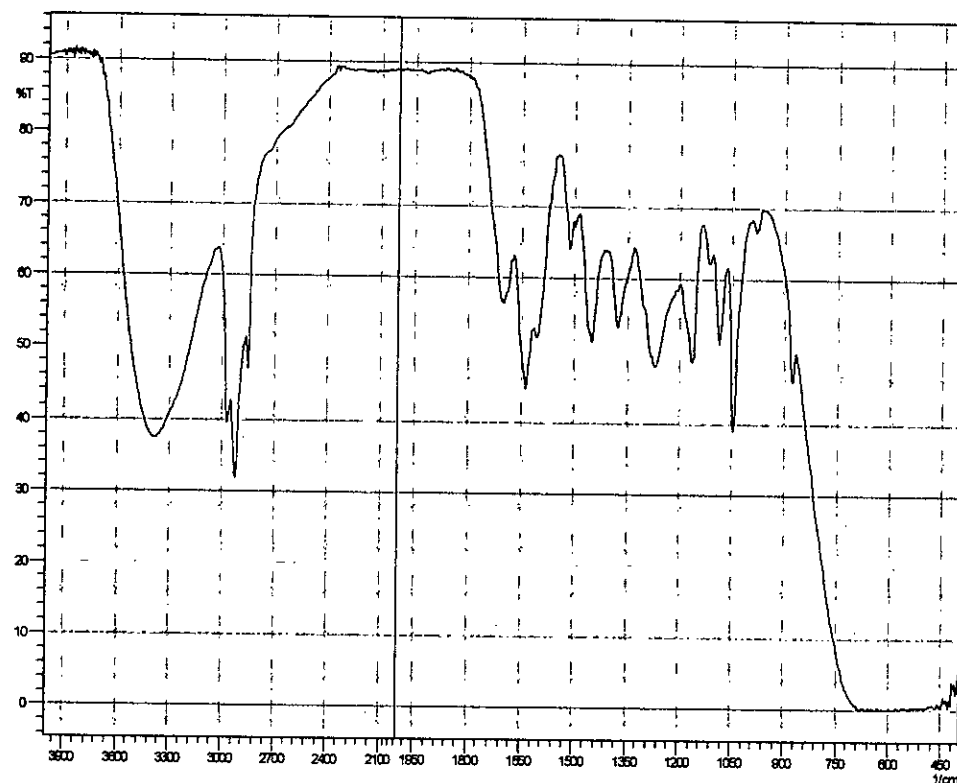


Fig 1 : Spectre infrarouge (IR) de propolis

- La vibration d'élongation de la fonction OH apparaît entre 3300-3400 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction CH aromatique apparaît à 3000 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction C=O apparaît à 1650 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction C-O apparaît à 1150 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction C-C aromatique apparaît entre 1200-1450 cm^{-1} .

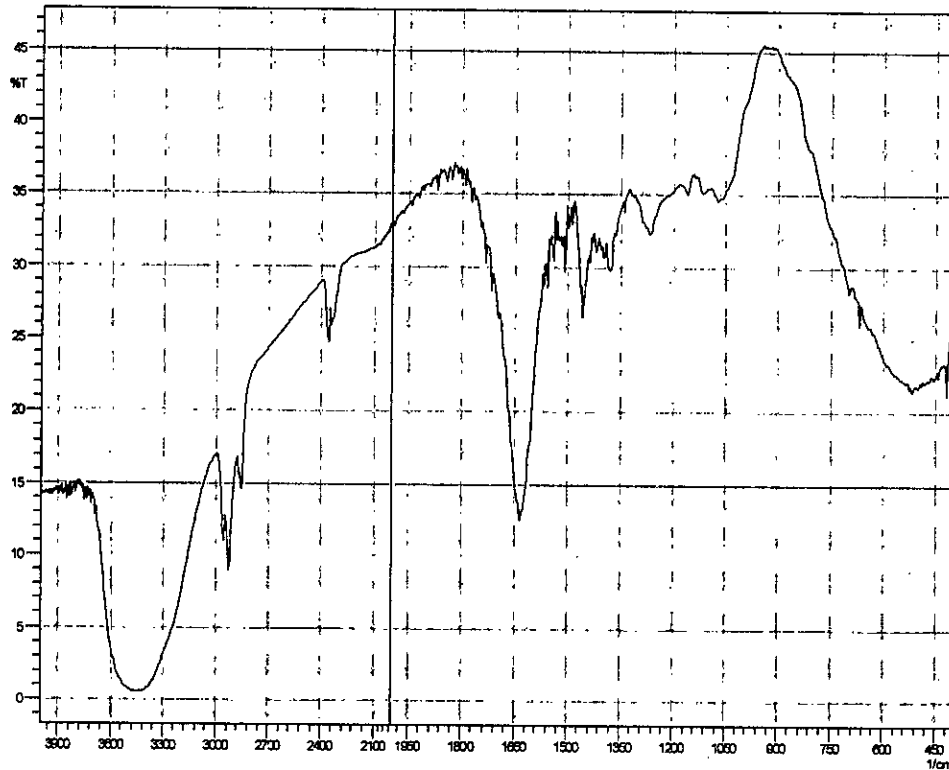


Fig 2 : Spectre infrarouge (IR) des hétérosides flavoniques

- La vibration d'élongation () de la fonction OH apparaît entre 3300-3400 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction CH aromatique apparaît à 3000 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de CH aliphatique apparaît à 2950 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction C=O apparaît à 1645 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction C-C aromatique apparaît entre 1350-1450 cm^{-1} .
- La vibration d'élongation de la fonction C-O apparaît entre 1050-1200 cm^{-1} .

IV.2. Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis sur les paramètres mitochondriales et cellulaires du stress oxydant in vitro

IV .2.1. Pouvoir scavenger de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis

Pour évaluer l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis, le test de DPPH^{*} (Diphényl-2- picryl- hydrazyl stable free radical) est effectué in vitro. Comme le montre les tableaux 3a, 3b et la figure 3, l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis possèdent un pouvoir capteur des radicaux libres très puissant. L'extrait éthanolique de la propolis est actif à des concentrations allant à 10^{-8} M avec maximum d'efficacité à 10^{-2} M (91.22% de réduction). Cette activité est beaucoup plus élevée par rapport à

celle de la vitamine E, l'antioxydant de référence qui réduit le radical DPPH* par 43.3 %. Par contre, les hétérosides flavoniques sont actifs à des concentrations molaires élevées allant de 10^{-4} M à 10^{-2} M. Il apparaît que l'activité des extraits est concentration dépendante.

Tableau 3a : Variation du pouvoir scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis (P) en fonction des Concentrations molaires

% de réduction	Concentration molaire (M)							
	Témoin	P 10^{-2}	P 10^{-3}	P 10^{-4}	P 10^{-5}	P 10^{-6}	P 10^{-7}	P 10^{-8}
	0%	91.22%	86.11%	85%	75%	56.88%	53.5%	25.77%

Tableau 3b : Variation du pouvoir scavenger des hétérosides flavoniques de la propolis (H) en fonction des concentrations molaires

% de réduction	Concentration molaire (M)							
	Témoin	H 10^{-2}	H 10^{-3}	H 10^{-4}	H 10^{-5}	H 10^{-6}	H 10^{-7}	H 10^{-8}
	0%	38.9%	13.2%	8.2%	5.45%	5.25%	1%	1%

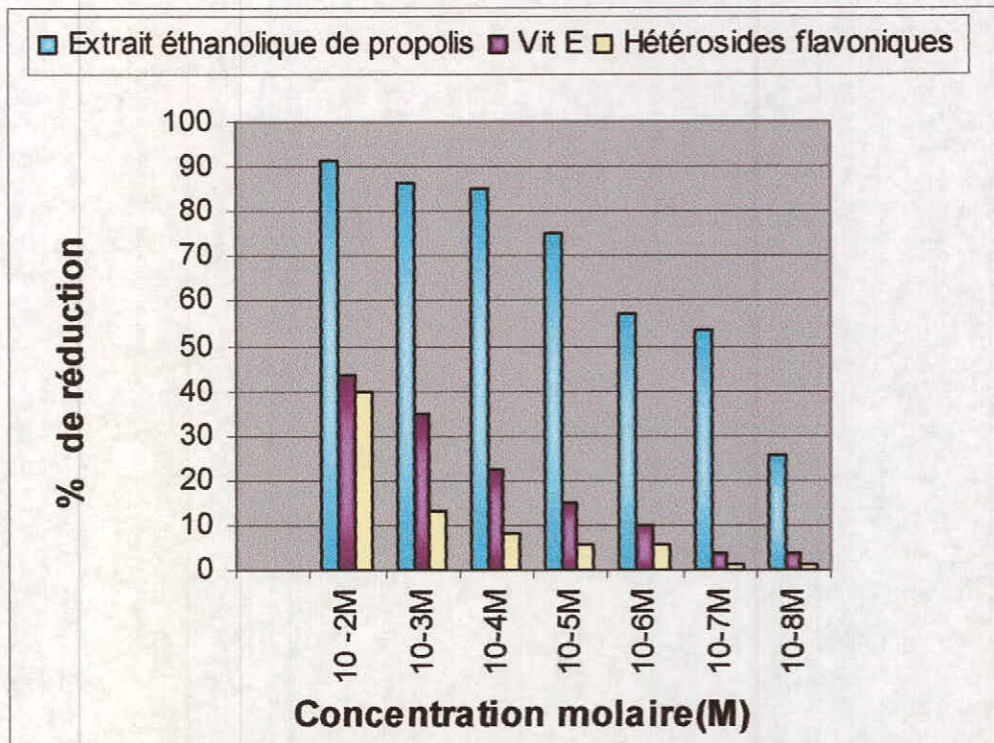


Figure 3 : Variation du pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis en fonction des concentrations molaires.

IV .2.2. Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques sur la production d'anion superoxyde

L'effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis sur la production d'anion superoxyde est réalisé sur des mitochondries hépatiques de rat.

Les tableaux 4a, 4b et la figure 4 montrent les variations de pourcentage de production d'anion superoxyde par les mitochondries en fonction des concentrations molaires des extraits. D'après les résultats, nous avons constaté un effet très remarquable de nos extraits sur la production de superoxyde dont l'activité est concentration dépendante (une production de 44.8% et 34.7% à 10^{-2} pour l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis successivement par rapport à 100% de témoin). Cette activité est conservée même à des concentrations molaires de 10^{-8} (35.6% de réduction et 16.6% avec les hétérosides flavoniques et l'extrait éthanolique successivement) avec un $P < 0.001$.

Si on compare l'activité inhibitrice de la production du superoxyde des deux extrait à 10^{-8} , on trouve que les hétérosides flavoniques ayant un effet plus puissant que celui de l'extrait éthanolique de la propolis (extrait brut).

Tableau 4a : Effet des hétérosides flavoniques de la propolis (H) à différentes concentrations sur la production du superoxyde par les mitochondries isolées de foie des rats.

	Concentration molaire (M)							
	Témoin	H 10^{-2}	H 10^{-3}	H 10^{-4}	H 10^{-5}	H 10^{-6}	H 10^{-7}	H 10^{-8}
% de production	100%	34.7%	39%	40%	55.6%	56.6	60.8%	64.4%

Tableau 4b : Effet de l'extrait éthanolique de la propolis (P) à différentes concentrations sur la production du superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat.

	Concentration molaire (M)							
	Témoin	P 10^{-2}	P 10^{-3}	P 10^{-4}	P 10^{-5}	P 10^{-6}	P 10^{-7}	P 10^{-8}
% de production	100%	44.8%	48%	69.2%	70.8%	72%	82.8%	83.4%

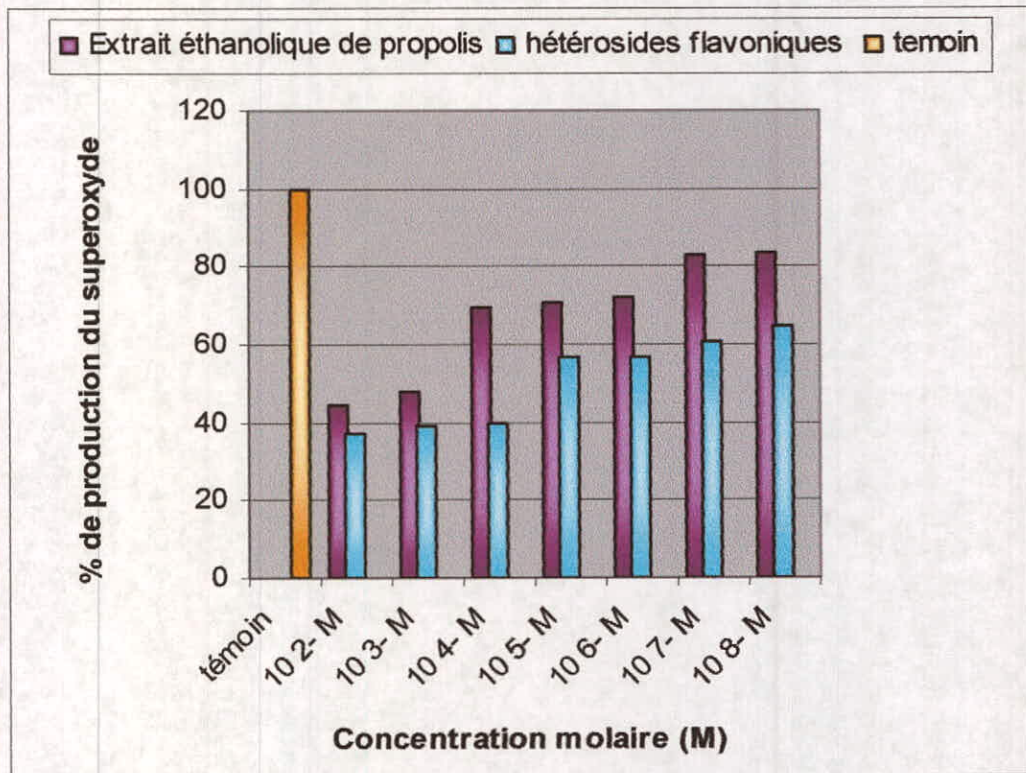


Figure 4 : Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sur la production de superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat.

IV .2.3. Variation des taux de malondialdéhyde (MDA) mitochondrial

La peroxydation lipidique est l'un des plus anciens effets connus des radicaux libres et la plus facile à mesurer. Le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité de la méthode de dosage. L'incubation des mitochondries hépatiques de rat avec l'extrait éthanolique ou les hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations conduit à une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) des taux de MDA issu de la peroxydation lipidique des membranes mitochondriales induite par $FeCl_2/FeCl_3$ comme le montre les tableaux 5a, 5b et la figure 5. Les extraits sont actifs à des concentrations allant à 10^{-8} ; avec un $p < 0.01$ à 10^{-6} pour les deux extraits et $p < 0.05$ pour les hétérosides flavoniques à 10^{-7} et 10^{-8} avec activité maximale à la concentration de 10^{-2} M; l'extrait éthanolique réduit la production de MDA par 79.2 % et les glycosides flavoniques par 74.8 %. Les extraits sont aussi actifs à faibles concentrations (10^{-8}) où la production du malondialdéhyde est réduite par 33.7 % et 39.4 %. Une corrélation a été observée entre le pouvoir scavenger des extraits et leurs effets sur la production de superoxyde et de MDA.

Tableau 5a : Variation des taux de MDA mitochondrial hépatique en nmole/mg de protéines en présence De l'extrait éthanolique de la propolis à différentes concentrations.

	Concentration molaire (M)							
	Témoin	P10 ⁻²	P10 ⁻³	P10 ⁻⁴	P10 ⁻⁵	P10 ⁻⁶	P10 ⁻⁷	P10 ⁻⁸
MDA (n mole /mg de protéines)	25.01 ± 9.31	5.2 ± 1.07 ^{***}	5.79 ± 0.99 ^{***}	9.31 ± 2.97 ^{***}	9.07 ± 2.11 ^{***}	11.05 ± 7.01 ^{***}	16.54 ± 4.36 ^{**}	16.58 ± 10.70 ^{ns}

Tableau 5b: Variation des taux de MDA mitochondrial hépatique en nmole/mg de protéines en présence des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations.

	Concentration molaire (M)							
	Témoin	H10 ⁻²	H10 ⁻³	H10 ⁻⁴	H10 ⁻⁵	H10 ⁻⁶	H10 ⁻⁷	H10 ⁻⁸
MDA (n mole /mg de protéines)	25.01 ± 9.31	6.30 ± 0.9 ^{***}	6.63 ± 0.96 ^{***}	9.23 ± 1.45 ^{***}	11.47 ± 3.50 ^{***}	13.15 ± 3.8 ^{***}	13.4 ± 3.79 ^{**}	15.15 ± 3.95 ^{**}

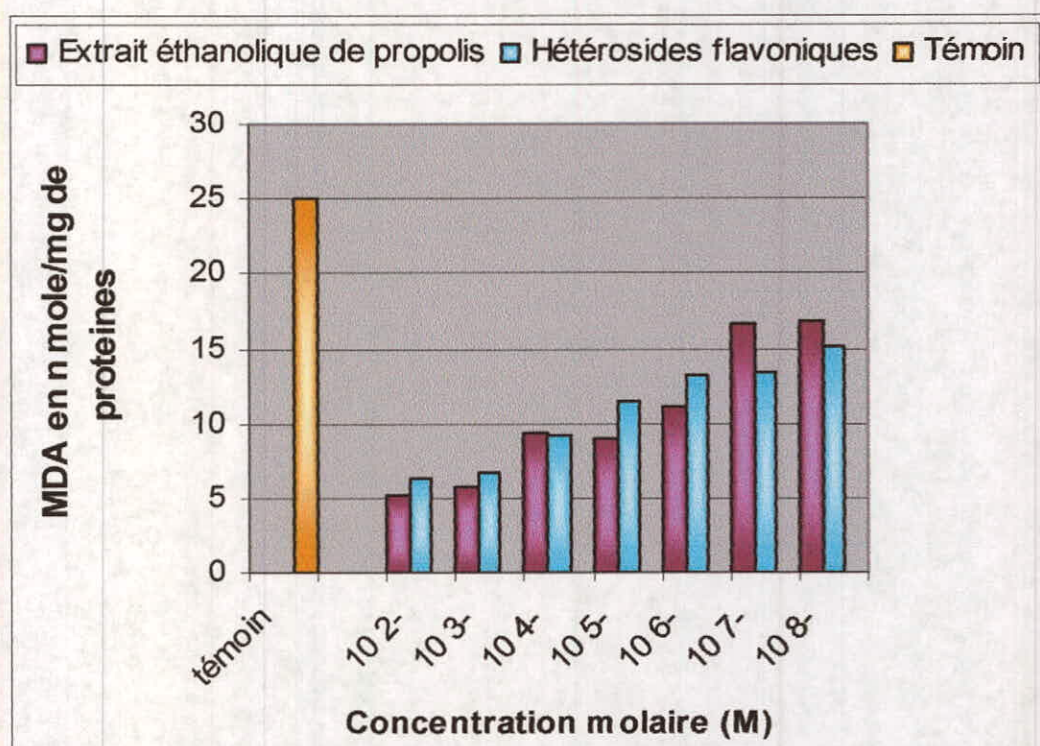


Figure 5 : Variation des concentrations du MDA mitochondrial hépatique en fonction de différentes concentrations de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis.

IV .2. 4. Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis sur le gonflement mitochondrial

Le gonflement mitochondrial correspond à une diminution progressive de l'absorbance de la suspension mitochondriale à 540 nm.

La relation entre la concentration molaire des extraits et l'inhibition ou l'induction de l'ouverture de pore de perméabilité membranaire mitochondrial (MMPT) est démontrée dans la figure 6 et les tableaux 6a et 6b.

Tableau 6a : Effet de l'extrait éthanolique de la propolis à différentes concentrations sur le gonflement (mitochondrial swelling) des mitochondries hépatiques de rat.

	Concentration molaire (M)				
	Témoin	P10 ⁻²	P10 ⁻⁴	P10 ⁻⁶	P10 ⁻⁸
Densité Optique (DO)	-0.067±0.02	-0.013±0.003	-0.036±0.008	-0.030±0.005	-0.050±0.005
	-0.103±0.03	-0.035±0.007	-0.051±0.007	-0.061±0.002	-0.070±0.003
	-0.155±0.06	-0.046±0.008	-0.060±0.008	0.078±0.003	-0.104±0.005
	-0.197±0.08	-0.054±0.005	-0.075±0.004	-0.096±0.007	-0.133±0.002
	-0.219±0.06	-0.064±0.006	-0.096±0.002	-0.116±0.007	-0.149±0.003
	-0.269±0.05	-0.086±0.002	-0.114±0.001	-0.141±0.006	-0.173±0.002
% de réduction du gonflement	0%	68.03% ***	57.6% ***	47.6% ***	35.7% ***

Tableau 6b : Effet des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sur le gonflement des mitochondries hépatiques de rat.

	Concentration molaire (M)				
	Témoin	H 10 ⁻²	H 10 ⁻⁴	H 10 ⁻⁶	H 10 ⁻⁸
Densité optique (DO)	-0.067±0.02	-0.010±0.0025	-0.018±0.009	-0.02±0.005	-0.028±0.007
	-0.103±0.03	-0.024±0.0063	-0.030±0.009	-0.054±0.016	-0.088±0.008
	-0.155±0.06	-0.045±0.0024	-0.051±0.007	-0.080±0.003	-0.119±0.001
	-0.197±0.08	-0.054±0.008	-0.063±0.005	-0.107±0.002	-.140±0.012
	-0.219±0.06	-0.072±0.0071	-0.078±0.001	-0.118±0.005	-0.161±0.014
	-0.269±0.05	-0.082±0.0069	-0.092±0.009	-0.127±0.006	-0.201±0.020
% de réduction du gonflement	0%	69.5% ***	65.8% ***	52.7% ***	25.3% ***

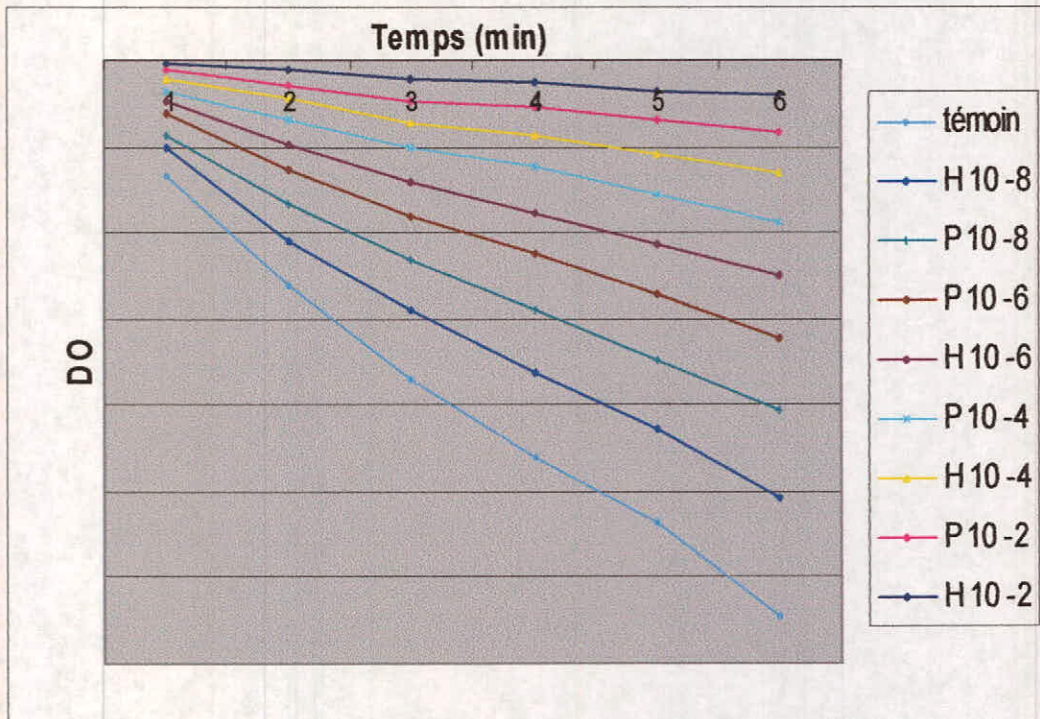


Figure 6 : Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis à différentes concentrations sur le gonflement des mitochondries hépatiques de rat.

L'incubation des mitochondries hépatiques de rat dans le tampon respirant en présence du succinate (6mM) comme substrat de complexe II suivie par addition de $100\mu\text{M}$ de CaCl_2 aboutit à une diminution accrue de la DO à 540 nm chez le lot témoin.

Cette diminution de la densité optique traduit une réduction de volume de la matrice mitochondriale ou d'autre terme une inhibition de l'ouverture de pore de transition membranaire. Par contre, en présence de l'extrait éthanolique ou des hétérosides flavoniques de propolis, la diminution de volume matriciel était très modérée surtout à la concentration de 10^{-2} M qui présente le maximum d'efficacité (-0.086 ± 0.002 et -0.082 ± 0.0069 successivement contre -0.269 ± 0.053 de témoin). Il est clair donc que l'amplitude du gonflement mitochondrial est inhibée par 68.03 % et 69.5 % respectivement avec l'extrait brut et les glycosides flavoniques de la propolis à 10^{-2} M alors qu'à 10^{-8} M, elle est de 35.7 % et 25.3 %. Le pouvoir antiapoptotique des extraits (extrait éthanolique de la propolis et les hétérosides flavoniques) est conservé même à des concentrations molaires faibles telle 10^{-8} (réduction successive de gonflement mitochondrial par 35.7% et 25.3%) avec un $p < 0.001$ pour les deux extraits.

IV.2.5. L'activité enzymatique des enzymes antioxydantes

La mesure de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes nous permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires des pathologies médiées par le stress oxydant.

IV .2.5.1. L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale et cytosolique

Les résultats de l'effet de l'extrait brut et des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatiques in vitro sont enregistrés dans les figures 7, 8 et les tableaux 7 et 8.

Tableau 7: Effet de l'extrait éthanolique de la propolis à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale.

	Concentration molaire (M)				
	Témoin	P10 ⁻²	P10 ⁻⁴	P10 ⁻⁶	P10 ⁻⁸
SOD cytosolique (UI/g de protéines)	1924.48 ± 920.10	2454.2 ± 1173.7 ns	2212.41 ± 929.3 ns	1915.1 ± 853.2 ns	1742.29 ± 1050.73 ns
SOD mitochondriale (UI/ g de protéines)	881.46 ± 32.90	1763.7 ± 1020.2 *	1175 ± 923.5 ns	1044.12 ± 827.06 ns	790 ± 230.1ns

Tableau 8: Effet des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale.

	Concentration molaire (M)				
	Témoin	H10 ⁻²	H10 ⁻⁴	H10 ⁻⁶	H10 ⁻⁸
SOD cytosolique (UI/g de protéines)	1924.48 ± 920.10 ns	2201.15 ± 904.73 ns	2182 ± 1020.1ns	1955.39 ± 892.3 ns	1950.35 ± 601.2 ns
SOD mitochondriale (UI/g de protéines)	881.46 ± 32.90	1523.7 ± 980 *	1305.27 ± 1030 ns	776.15 ± 190.3 ns	729.02 ± 50.2 ns

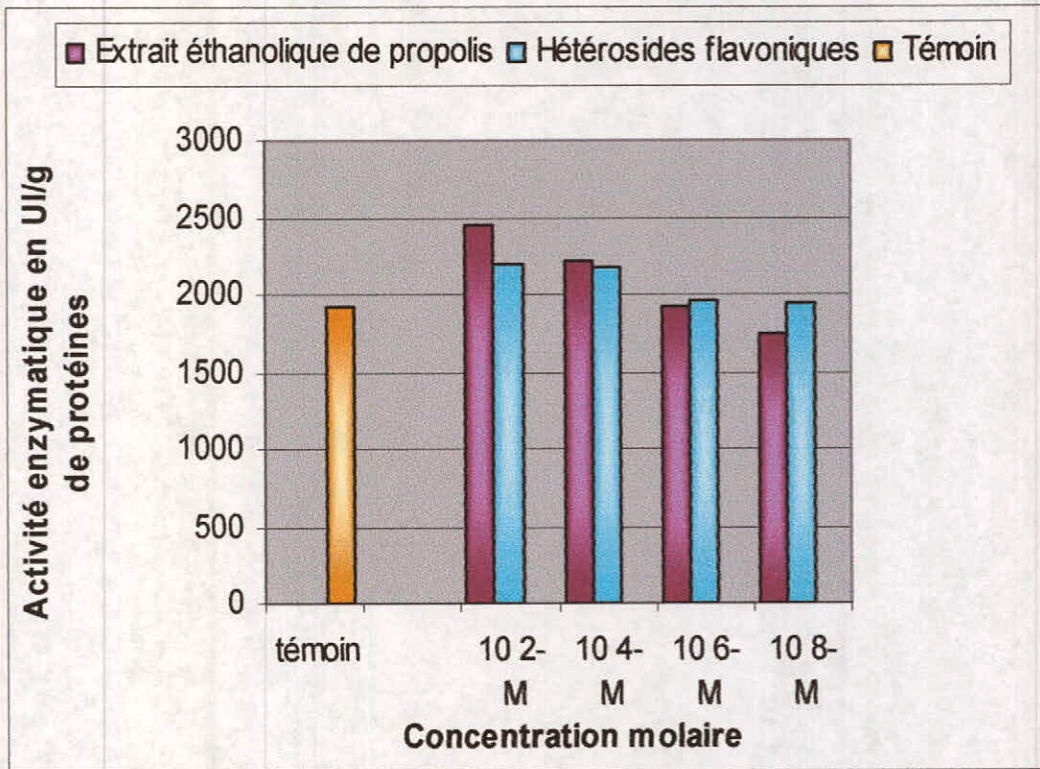


Figure 7: Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique.

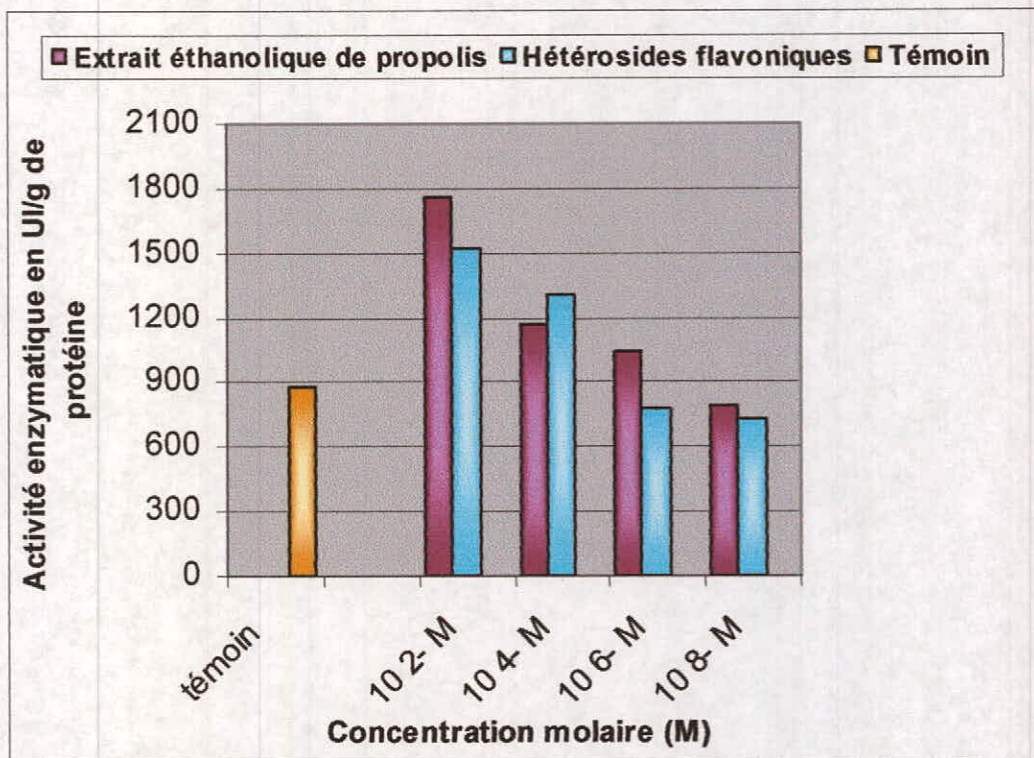


Figure 8: Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale.

A partir des résultats, nous avons constaté que l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) cytosolique augmente d'une façon non significative en présence des extraits à la concentration de 10^{-2} M et 10^{-4} M, alors qu'à 10^{-6} M et 10^{-8} M, les extraits ne montrent aucun effet sur cette activité enzymatique.

Cependant à la concentration de 10^{-2} M, les extraits étaient actifs sur la SOD mitochondriale ($p < 0.05$) avec perte d'activité aux autres concentrations.

IV .2.5.2. L'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique et mitochondriale

Les résultats de traitement des mitochondries hépatiques de rat par l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sont regroupés dans les tableaux 9, 10 et les figures 9 et 10.

En ce qui concerne la catalase mitochondriale, son activité augmente de manière hautement significative à 10^{-2} M (2278.4 ± 103.45 UI/g de protéines et 1479.23 ± 104.23 UI/g de protéines avec l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques successivement contre 1088.18 ± 92.75 UI/g de protéines de témoin) et 10^{-4} M alors qu'aux autres concentrations elle demeure autour de celle de témoin. Mais ce n'est pas le cas avec la catalase cytosolique où les extraits étaient inactifs même à 10^{-2} M (3994.05 ± 1173.76 UI/g de protéines et 3963.5 ± 1003.11 UI/g de protéines contre 3666.1 ± 1023 UI/g de protéines de control).

Tableau 9 : Effet des hétérosides flavoniques de la propolis (H) à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale.

	Concentration molaire (M)				
	Témoin	H10 ⁻²	H10 ⁻⁴	H10 ⁻⁶	H10 ⁻⁸
CAT cytosolique (UI/g de protéines)	3666.1 ± 1000	3963.5 ± 1003.1 ns	3436.1 ± 791.3 ns	3511.39 ± 1801.2 ns	2675.45 ± 1102.3 ns
CAT mitochondriale (UI/g de protéines)	1088.2 ± 92.75	1479.23 ± 104.23***	1383.02 ± 43.23*	1300.6 ± 813.14 ns	1066.29 ± 589.01ns

Tableau 10 : Effet de l'extrait éthanolique de la propolis (P) à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale

	Concentration molaire (M)				
	Témoin	P10 ⁻²	P10 ⁻⁴	P10 ⁻⁶	P10 ⁻⁸
CAT cytosolique (UI/g de protéines)	3666.1 ± 1000	3994.05 ± 1173.7 ns	3612.72 ± 929.13 ns	3610.15 ± 853.2 ns	2568.42 ± 1358.2 ns
CAT mitochondriale (UI/g de protéines)	1088.2 ± 92.75	2278.4 ± 103.45***	1777.31 ± 90.45***	1308.8 ± 713.12 ns	1071.8 ± 503.42 ns

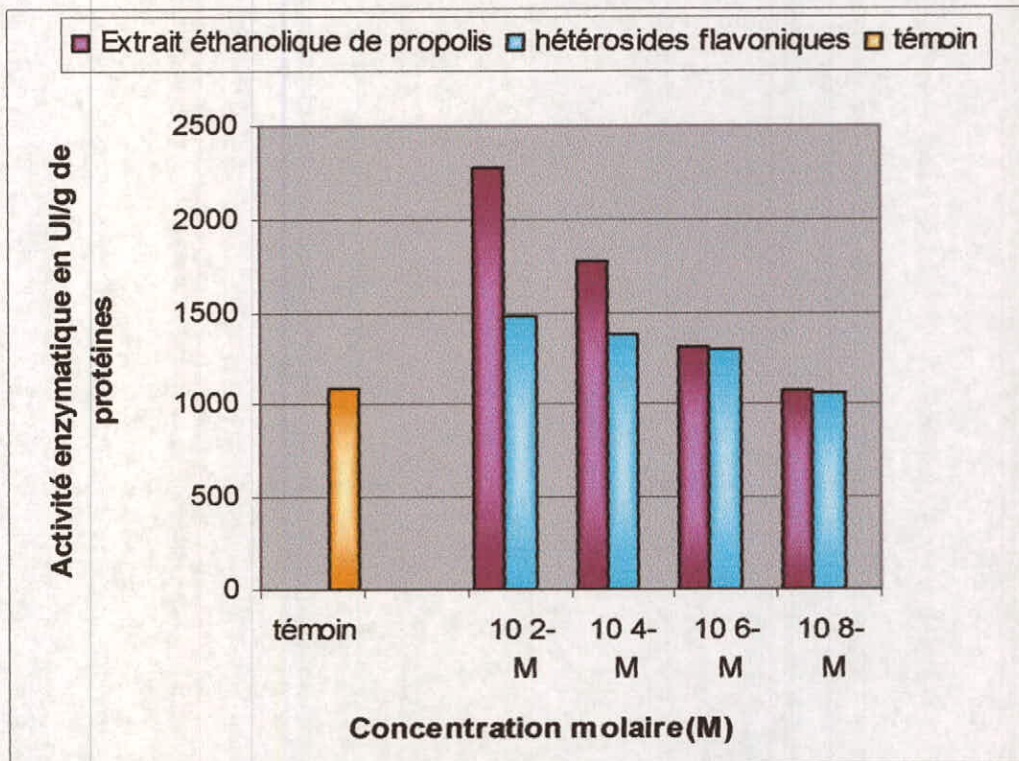


Figure 9 : Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique.

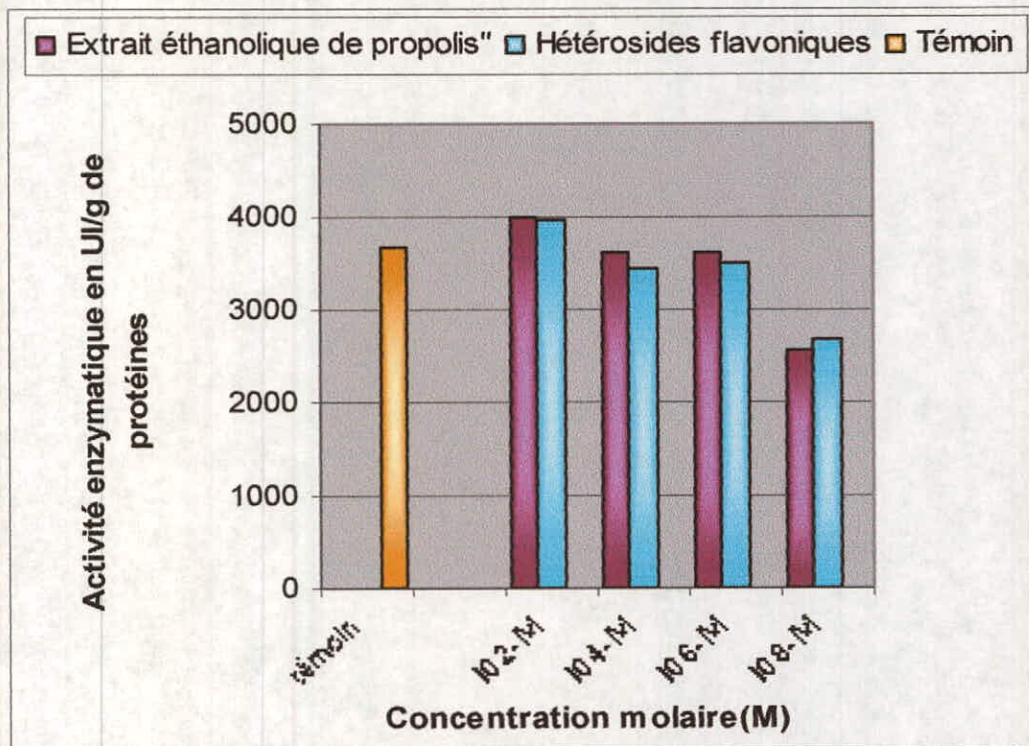


Figure 10 : Effet de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique.

IV .3. Effet à long terme de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de propolis administrés à 100 mg/Kg pendant deux mois sur les paramètres mitochondriaux et cellulaire de stress oxydant

Après confirmation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et des glycosides flavoniques constitutifs de la propolis in vitro qu' était concentration dépendante, nous avons décidé de faire une étude à long terme pour évaluer d'une part la tolérance de l'organisme vis-à-vis d'un traitement prolongé par nos extraits et d'autre part de connaître si l'activité pharmacologiques des flavonoïdes et des hétérosides flavoniques de la propolis revient à eux même, à leurs métabolites terminaux ou à les deux.

IV .3.1. La production de l'anion superoxyde

La mesure de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries présente une importance spéciale dans l'étude de stress oxydant parceque cette production constitue l'événement primaire et essentiel dans l'induction d'un stress oxydant.

La figure 11 et le tableau 11 montrent l'effet de l'extrait brut (extrait éthanolique), des glycosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg et la quercétine à 0.033 mg/Kg comme molécule de référence administrés pendant deux mois sur la production de superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat. Les pourcentages de production obtenus (7,7%, 6,8% et 9,7% successivement avec la propolis, les glycosides flavoniques et la quercétine contre le 100% de témoin) évoquent une activité très hautement significative des extraits testés sur la production de l'anion superoxyde par la mitochondrie hépatiques ($p < 0.001$).

A partir des résultats, l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques réduisent la production de superoxyde par 92.3% et 93.2% respectivement par rapport à 90.3% de la quercétine.

Tableau 11 : Effet de l'extrait éthanolique , des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur la production du superoxyde par des mitochondries hépatiques de rat.

	Témoin	Extrait brut de la propolis 100 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Quercetine 0.033 mg/Kg
Densité optique (DO)	0.095 ± 0.018	0.078± 0.009	0.058±0.003	0.016±0.012
	0.190 ± 0.039	0.061± 0.002	0.048± 0.002	0.030±0.002
	0.260 ±0.06	0.051± 0.006	0.044±0.003	0.037±0.003
	0.330 ± 0.08	0.043±0.013	0.040±0.004	0.039± 0.002
	0.450 ±0.09	0.035±0.003	0.031± 0.005	0.044± 0.006
Pourcentage de production	100%	7.7 % ^{***}	6.8 % ^{***}	9.7 % ^{***}

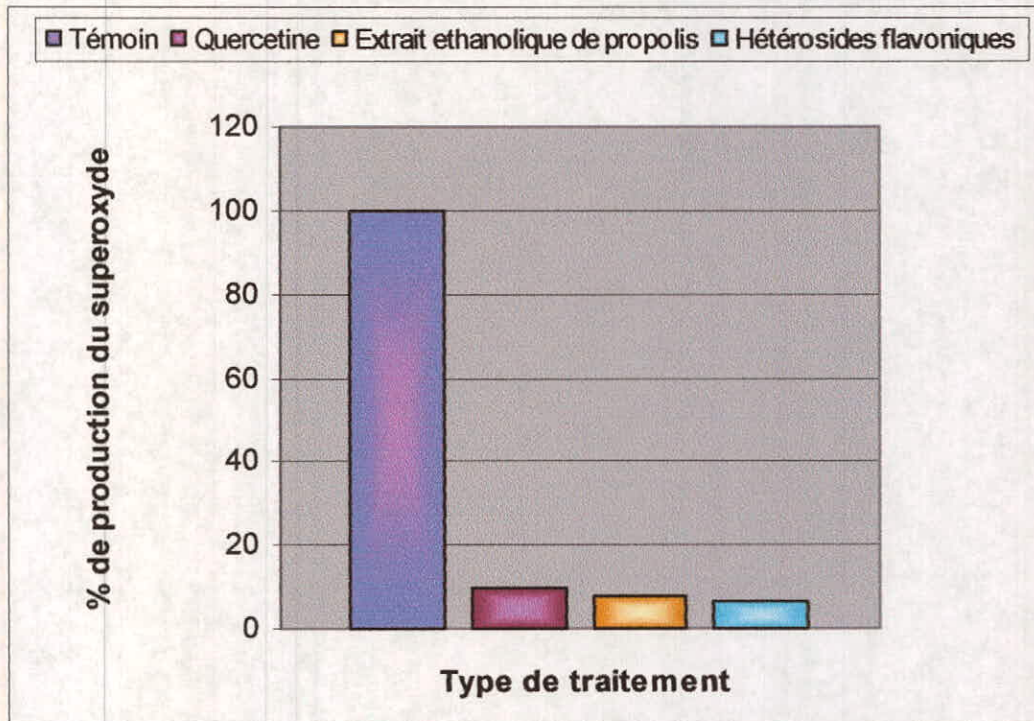


Figure 11 : Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur la production du superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat.

IV .3.2. Evolution des taux de MDA cytosolique et mitochondrial

Les variations des taux de MDA cytosolique et mitochondriale après traitement des rats par l'extrait éthanolique, les hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine comme molécule de référence à 0.033 mg/Kg pendant deux mois sont rassemblés dans le tableau 12 et les figures 12 et 13. Les taux de MDA cytosolique diminuent d'une manière très remarquable ($p < 0.001$) chez les rats traités par les flavonoïdes (10.86 ± 0.21 nmole/g de foie et 9.45 ± 1.6 nmole/g de foie avec l'extrait flavonique de la propolis et les glycosides flavoniques successivement contre 34 ± 1.4 nmole/g de foie de témoins). Le même constat est observé avec le MDA mitochondrial (5.76 ± 0.38 nmole/mg de protéines et 5.57 ± 0.5 nmole/mg de protéines contre 25 ± 4.31 nmole/mg de protéines de témoin). Il est aussi constaté que cette activité est beaucoup plus élevée que celle de la quercétine (17.22 ± 1.08 nmole/g de foie contre 34 ± 1.4 nmole/g de foie de MDA cytosolique chez les témoins et 11.63 ± 0.48 nmole/g de foie contre 25 ± 4.23 nmole/mg de protéines pour celui mitochondrial). Le traitement par l'extrait éthanolique de la propolis, les hétérosides flavoniques et la quercétine conduit donc à une production de 31.94%, 27.7% et 50.6% de malondialdéhyde cytosolique respectivement par rapport au 100% de témoin. D'autre part, les flavonoïdes et les hétérosides flavoniques de la propolis diminuent

la production de malondialdéhyde mitochondrial par 77%, 77.8% successivement contre 53.5% de la quercétine.

Tableau 12 : Variation des concentrations en MDA cytosolique hépatique après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à la dose de 100 mg / Kg et la quercétine à la dose de 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois

	Témoin	Flavonoides de la propolis 100 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Quercétine 0.033 mg/Kg
MDA cytosolique (n mole/ g de tissu)	34 ± 1.4	10.86 ± 0.21 ^{***}	9.45 ± 1.6 ^{***}	17.22 ± 1.08 ^{***}
MDA mitochondrial (n mole/ mg de protéines)	25 ± 4.31	5.76 ± 0.38 ^{***}	5.57 ± 0.5 ^{***}	11.63 ± 0.48 ^{***}

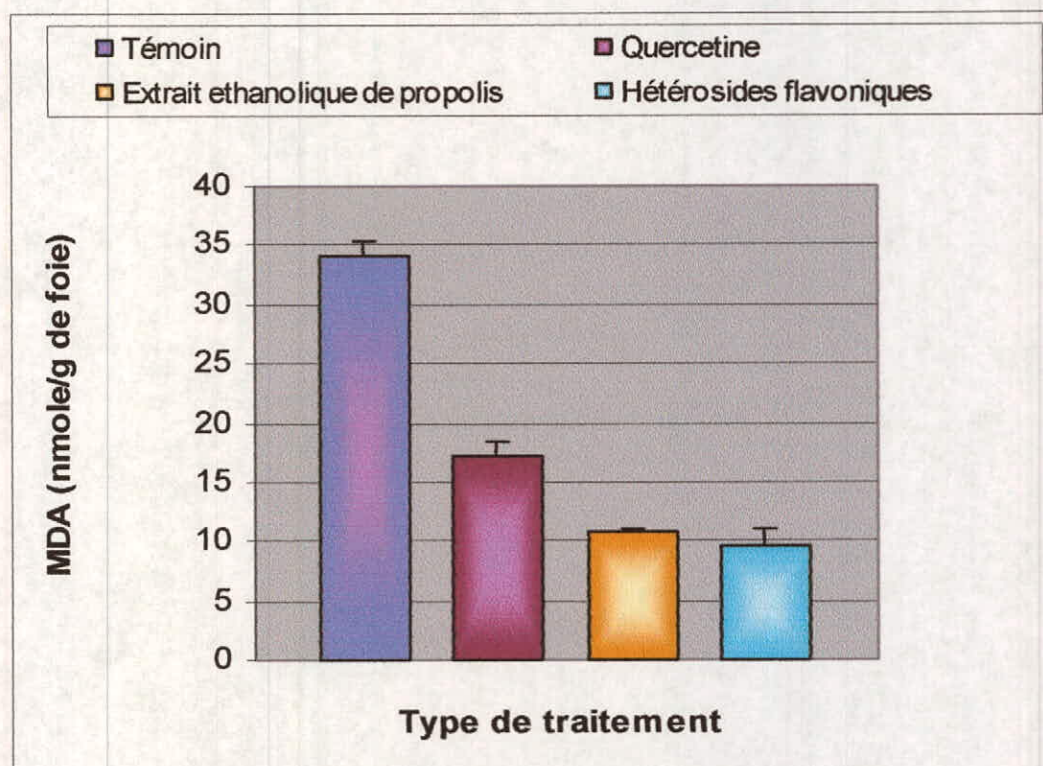


Figure 12 : Variation des concentrations en MDA cytosolique hépatique après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à la dose de 100 mg / Kg et la quercétine à la dose de 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois

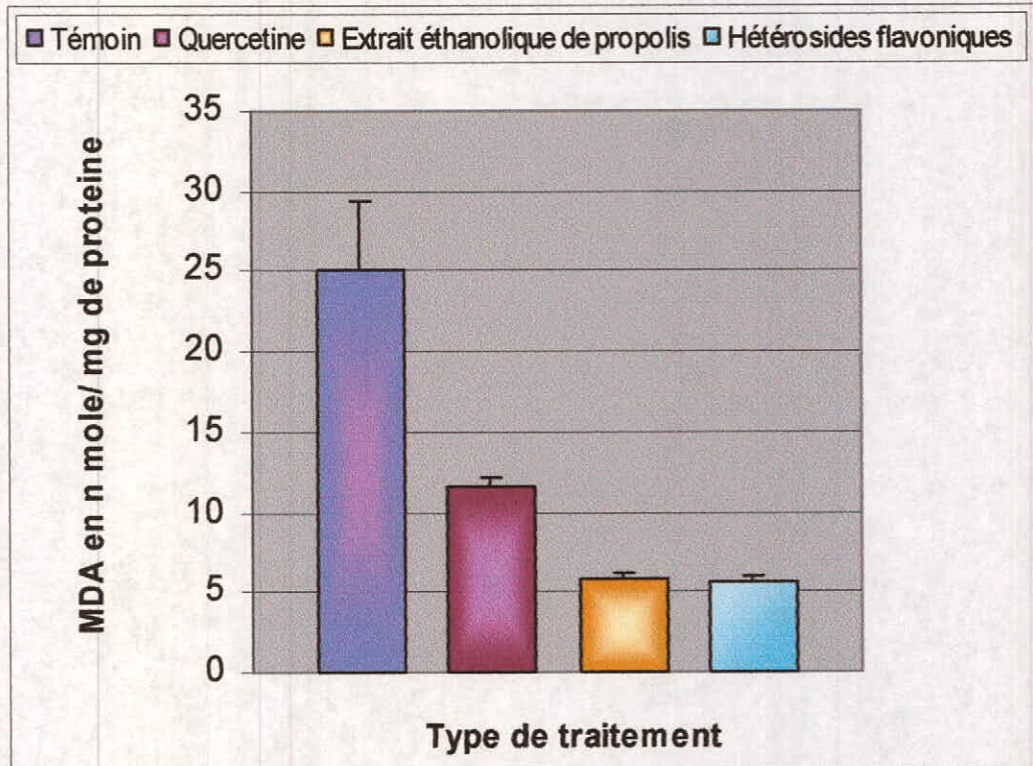


Figure 13: Variation des concentrations en MDA mitochondrial hépatique après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à la dose de 100 mg / Kg et la quercétine à la dose de 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois

IV.3.3. Variation des taux de glutathion du tissu hépatique

L'évolution des taux de glutathion intracellulaire hépatique à la suite d'administration de l'extrait brut, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg et la quercétine comme molécule de référence à 0.033 mg/Kg pendant deux mois sont enregistrés dans le tableau 13 et la figure 14. Nous constatons chez les rats traités par les extraits et la quercétine une augmentation très considérable des taux de glutathion par rapport à ceux des témoins (1.75 ± 0.13 mmole/g de foie, 1.57 ± 0.07 mmole/g de foie et 1.43 ± 0.13 nmole/g de foie pour la propolis, les hétérosides et la quercétine successivement contre 0.95 ± 0.22 mmole/g de foie pour le témoin). Le taux de glutathion des cellules hépatiques augmente par 1.8 et 1.6 après traitement par l'extrait brut et les glycosides flavoniques respectivement.

Tableau 13: Variation des concentrations en glutathion cytosolique hépatique après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à la dose de 100 mg / Kg et la quercétine à la dose de 0.033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois.

	Témoin	Flavonoïdes de la Propolis 100 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Quercétine 0.033 mg/Kg
Glutathion cytosolique (m mole/g de tissu)	0.95 ± 0.22	1.75 ± 0.13 ^{***}	1.57 ± 0.07 ^{***}	1.43 ± 0.13 ^{***}

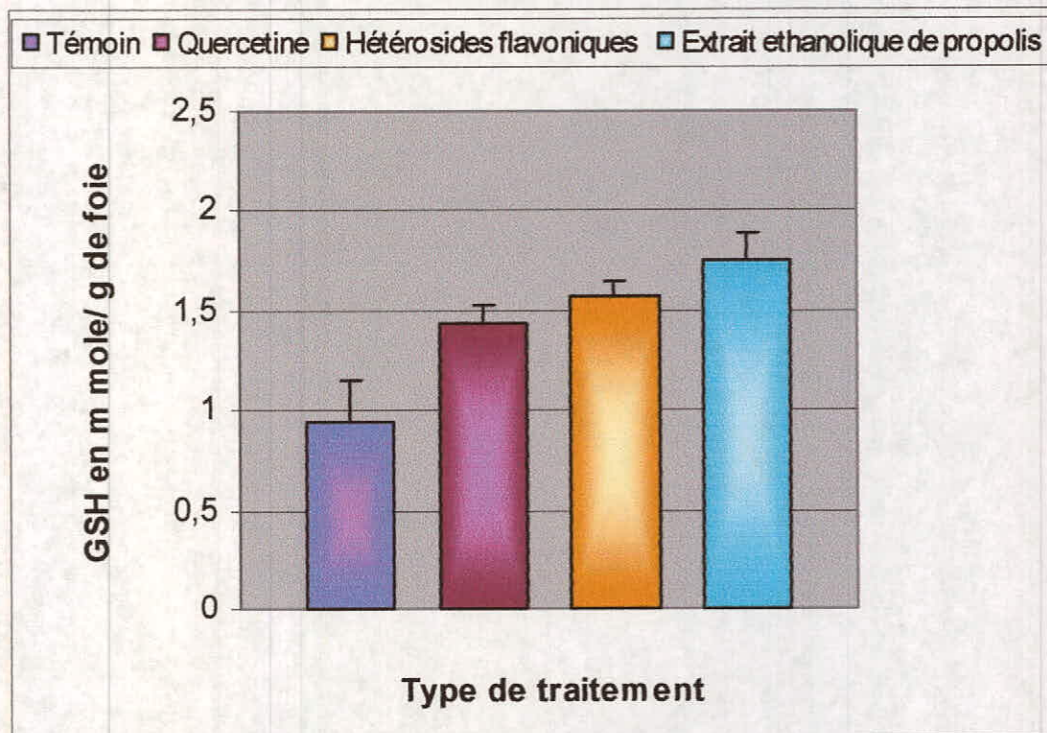


Figure 14 : Variation des concentrations en glutathion cytosolique hépatique après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à la dose de 100 mg / Kg et la quercétine à la dose de 0.033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois.

IV .3.4. Le gonflement mitochondrial (mitochondrial swelling)

Les résultats enregistrés dans le tableau 14 et la figure 15 expriment clairement l'effet antiapoptotique de l'extrait éthanolique de la propolis et des glycosides flavoniques à 100 mg/Kg en utilisant la quercétine comme molécule de référence à 0.033 mg/Kg. Nos extraits possèdent une grande activité inhibitrice ($p < 0.001$) de l'ouverture de pore géant traduite par la diminution du volume de la matrice ou la densité de la matrice des mitochondries hépatiques de rats traités par les extraits en comparaison avec ceux des témoins.

D'après les résultats ainsi obtenus, l'extrait brut ainsi que les hétérosides flavoniques de la propolis inhibent le gonflement mitochondrial par 69.2 % et 62.8 % successivement. On peut remarquer que les deux extraits ayant une activité antiapoptotique importante.

Si on compare l'effet obtenu avec les hétérosides flavoniques avec celui obtenu avec l'extrait éthanolique, on trouve que la différence est négligeable.

Tableau 14 : Effet de l'extrait éthanolique , des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur le gonflement (mitochondrial swelling) des mitochondries hépatiques de rat.

	Témoin	Extrait brut de la propolis 100 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg
Densité optique (DO)	-0.067 ± 0.003	0.005 ± 0.002	-0.011 ± 0.001
	-0.103 ± 0.007	-0.014 ± 0.002	-0.025 ± 0.002
	-0.155 ± 0.090	-0.033 ± 0.001	-0.039 ± 0.002
	-0.197 ± 0.080	-0.042 ± 0.020	-0.054 ± 0.003
	-0.219 ± 0.069	-0.064 ± 0.003	-0.780 ± 0.003
	-0.269 ± 0.053	-0.083 ± .0400	-0.100 ± 0.004
% de réduction du gonflement	0%	69.2 % ^{***}	62.8 % ^{***}

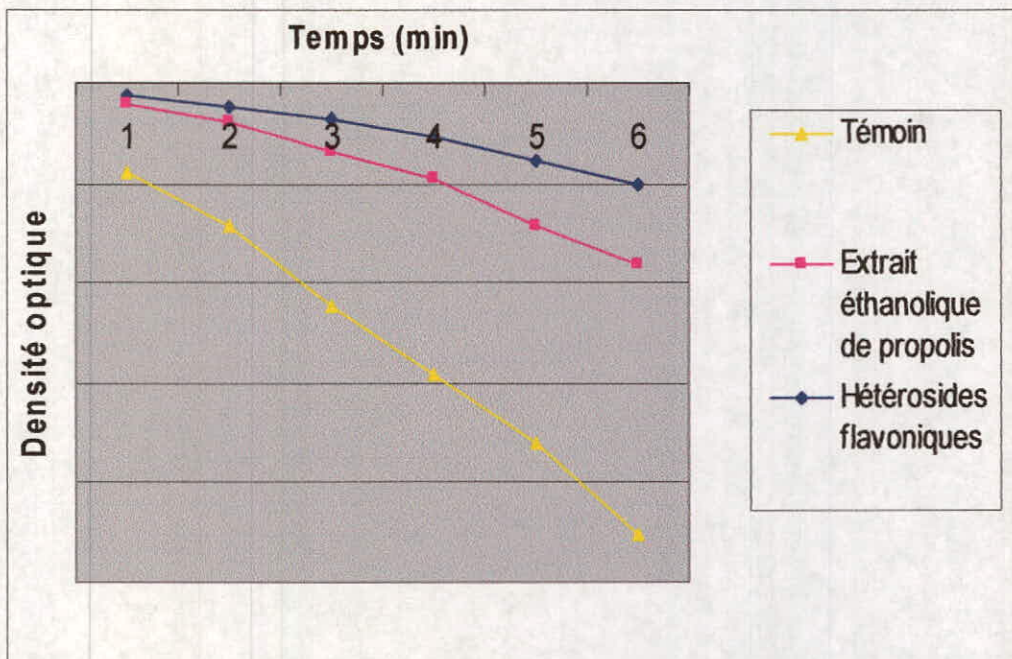


figure 15 : Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur le gonflement (mitochondrial swelling) des mitochondries hépatiques de rat.

IV.3.5. L'activité enzymatique des enzymes antioxydantes

IV .3.5.1. L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase

A partir des résultats représentés dans le tableau 15, la figure 16 et la figure 17, on constate que l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale augmente très sensiblement chez les rats traités par les extraits en comparaison avec celle des témoins et des traités par la quercétine.

Concernant l'activité enzymatique de la SOD cytosolique, elle atteint son maximum avec la propolis (3854.56 ± 821.2 UI/g de protéines contre 1924.5 ± 920.1 UI/g de protéines chez les témoins et 3808.16 ± 720 UI/g de protéines avec la quercétine). Cependant, elle atteint son maximum avec la quercétine (3103.57 ± 1803.2 UI/g de protéines contre 1544.11 ± 920.23 UI/g de protéines de témoin) pour la SOD mitochondriale. Les flavonoïdes et les glycosides flavoniques de la propolis aboutissent à une augmentation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique (Cu/Zn-SOD) et mitochondriale (Mn-SOD) par le double. C'est presque le même degré d'effet obtenu avec la molécule de référence dont la différence était non significative. En résumé, l'extrait éthanolique augmente l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique par 2 fois, alors que les glycosides flavoniques par 1.8 fois. Concernant l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale, son activité augmente par 1.97 et 1.94 fois respectivement en présence des extraits d'une façon hautement significative.

Tableau 15 : Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale et cytosolique hépatiques.

	Témoin	Extrait brut de propolis 100 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100mg/Kg	Quercétine 0.033 mg/Kg
SOD cytosolique (UI/g de tissu)	1924 ± 920.1	3854.56±1121.2 ^{***}	3501.12 ±700 ^{***}	3808.16 ±720 ^{***}
SOD mitochondriale (UI/ g de protéines)	1544.11± 1021	3057.4 ± 1021 ^{**}	3003.12 ± 723 ^{**}	3103.57±1803 [*]

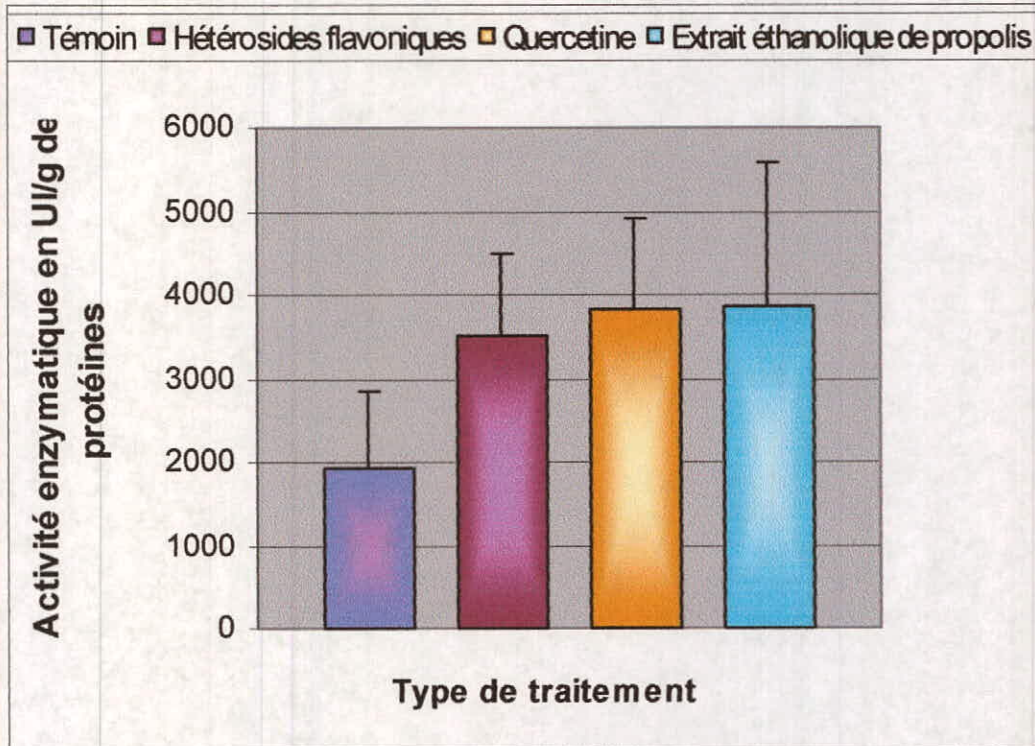


Figure 16 : Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique hépatiques.

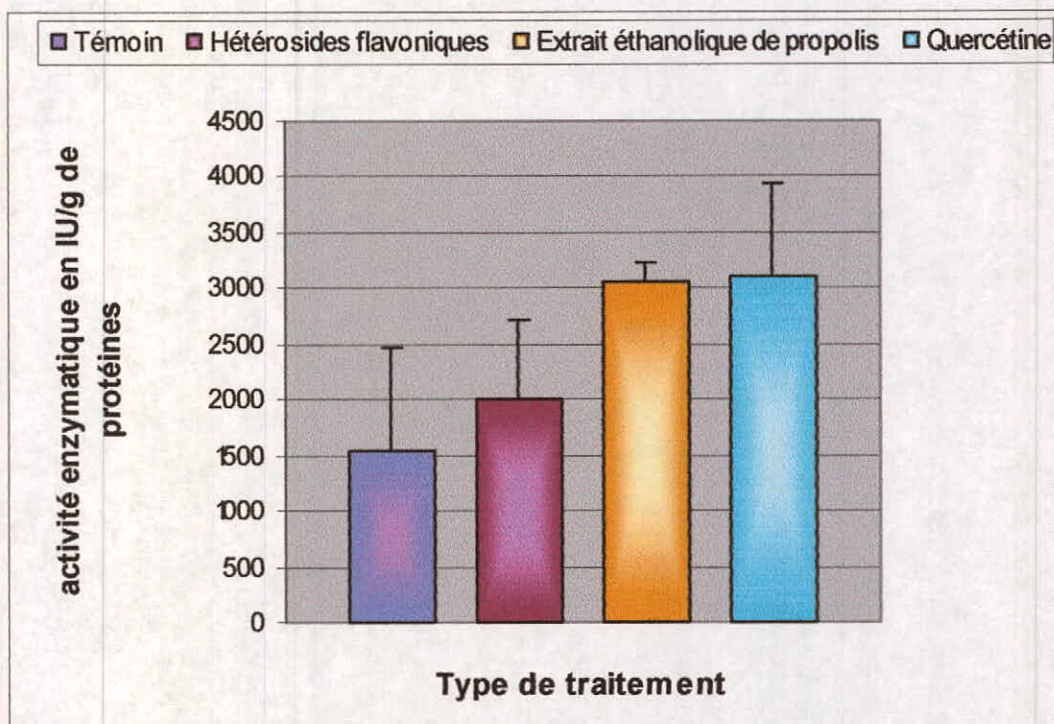


Figure 17 : Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale hépatiques.

IV .3.5.2 La catalase cytosolique et mitochondriale

L'extrait éthanolique de la propolis administré à la dose de 100 mg/Kg provoque une activation très significative de la catalase cytosolique (4989.89 ± 1103.3 UI/g de protéines contre 3666.1 ± 1029 UI/g de protéines chez les témoins et 4803.19 ± 1201 UI/g de protéines avec la molécule de référence) alors que les hétérosides flavoniques n'expriment aucun effet sur cette dernière. En effet, l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale est affectée - qui tend vers l'activation- seulement par l'extrait éthanolique de propolis (3466.4 ± 903.21 UI/g de protéines contre 2583.51 ± 1030.2 UI/g de protéines de témoin). (Tableau 16, figure18 et la figure 19)

Tableau 16: Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatiques.

	Témoin	Extrait éthanolique 100 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100mg/Kg	Quercétine 0.033 mg/Kg
CAT cytosolique (UI/g de tissu)	3666.1 ± 1029	$4989.89 \pm 1103^{**}$	4319.3 ± 980.7^{ns}	$4803.2 \pm 1201^*$
CAT mitochondriale (UI/g de protéines)	2583.5 ± 870	$3466.4 \pm 903.2^*$	2601.15 ± 799.2^{ns}	2751.51 ± 797^{ns}

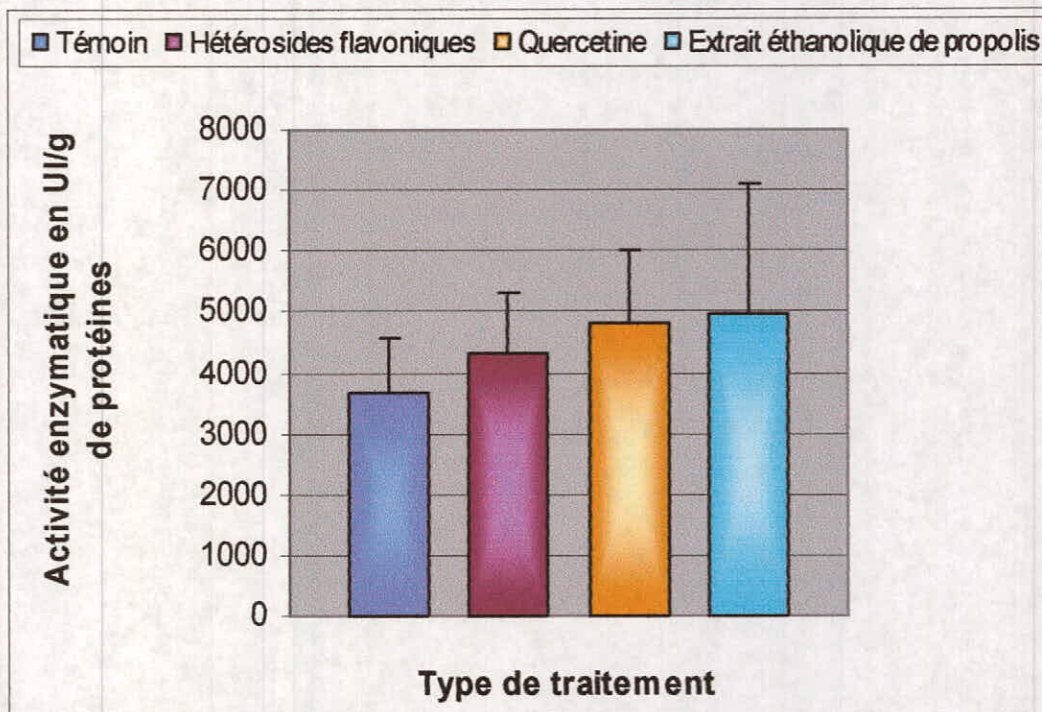


Figure 18 : Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique.

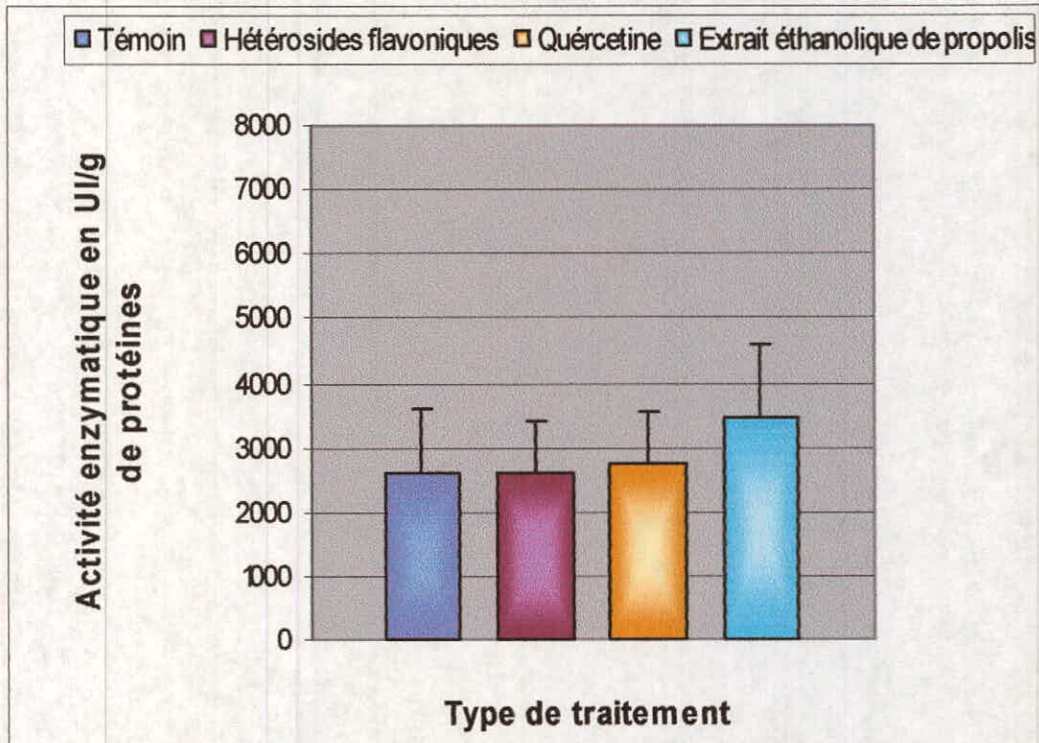


Figure 19 : Effet de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0,033 mg/Kg par voie orale pendant deux mois sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatiques.

IV .4. Effet préventif de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg sur le stress oxydant mitochondrial et cellulaire induit par la doxorubicine administrée à 10 mg/Kg

IV .4.1. La production de l'anion superoxyde

Les résultats de traitement des rats par la doxorubicine seul à 10 mg/Kg pendant trois jours ou en association aux flavonoïdes de la propolis, des hétérosides flavoniques à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg pendant un mois sont interprétés dans le tableau 17 et la figure 20.

Le traitement médicamenteux seul provoque une augmentation importante de la production d'anion (127% contre 100% de témoin) avec un $p < 0.001$. Par contre, dans les groupes d'animaux prétraités par l'extrait éthanolique et les glycosides flavoniques de la propolis, nous avons remarqué que la production de l'anion superoxyde diminue brutalement par rapport au groupe traité par la doxorubicine à 10 mg/Kg (18.2%, 21.3% avec l'extrait éthanolique de la propolis et les hétérosides flavoniques successivement contre 127% de médicament).

Nous avons extraire aussi que l'effet inhibiteur des flavonoïdes des extraits sur la production de superoxyde atteint le point où l'administration de ces derniers réduit cette production à un niveau

beaucoup plus bas que celui observé chez les témoins et les prétraités par la quercétine (production de 18.2%, 21.3% avec la propolis et les hétérosides flavoniques successivement contre 100% du médicament et 36.2% de la quercétine). Cela signifie que nos extraits ayant un effet préventif très puissant vis-à-vis de la production des radicaux libres dans l'organisme.

Tableau 17: Effet préventif de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg et la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur le stress oxydant induit par la doxorubicine administrée à 10 mg/Kg par voie intraveineuse (IV) pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Extrait éthanolique de Propolis 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Quercétine 0.033 mg/Kg +doxorubicine 10 mg/Kg
Densité optique (DO)	0.095± 0.01	0.101± 0.018	0.053±0.0061	0.046± 0.005	0.066± 0.006
	0.190± 0.03	0.260±0.02	0.061±0.0053	0.063 ±0.005	0.075± 0.005
	0.260±0.06	0.363± 0.009	0.069±0.0042	0.083±0.006	0.086± 0.06
	0.330± 0.08	0.440± 0.045	0.077±0.0052	0.077± 0.004	0.098± 0.04
	0.450±0.09	0.570± 0.07	0.082±0.059	0.096±0.007	0.106 ±0.08
% de production	100%	127 %###	18.2 %***	21.3 %***	23.5 %***

: Signification entre le lot traité par la doxorubicine et le lot témoin.

*** : Signification entre les lots traités par les extraits et le lot traité par le médicament.

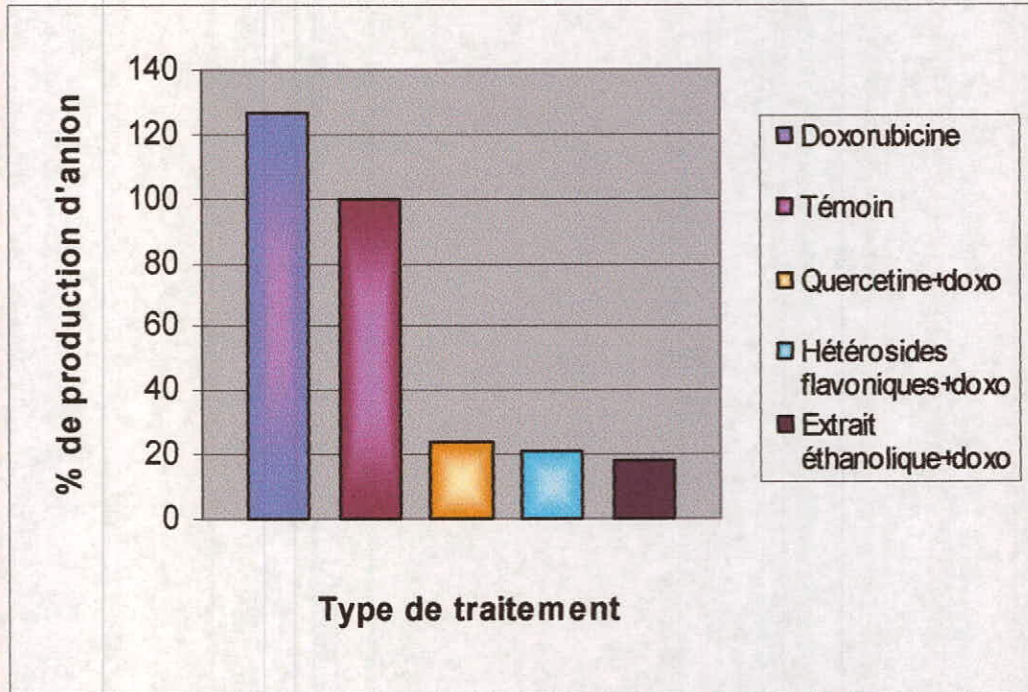


Figure 20: Variation de pourcentage de production de superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat après administration de l'extrait éthanolique de propolis, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg et la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois suivie par administration de la doxorubicine à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours

IV .4.2. Variation des concentrations de malondialdéhyde cytosolique et mitochondriale

Les résultats sont rapportés dans le tableau 18 et les figures 21 et 22.

La doxorubicine seule à 10 mg/Kg entraîne une augmentation des taux de MDA par rapport au témoin aussi bien pour le MDA cytosolique que mitochondrial ; le MDA cytosolique est de 46.73 ± 4.42 nmole/g de foie contre 34 ± 1.4 nmole/g de foie chez le lot témoin alors que celui mitochondrial est de 31.14 ± 4.8 nmole/mg de protéines contre 25 ± 4.31 nmole/mg de protéines de témoin. Par contre, l'administration de l'extrait éthanolique de la propolis et des hétérosides flavoniques à 100 mg/Kg pendant un mois puis le médicament à 10 mg/Kg conduit à une diminution très intense des taux de MDA cytosolique. Cet effet atteint le niveau où les extraits réduisent les taux de MDA à un point plus bas que ceux de lot témoin (18.26 ± 2.7 nmole/g de foie, 16.3 ± 1.08 nmole/g de foie avec la propolis et les glycosides flavoniques respectivement contre 34 ± 1.4 nmole/g de foie de témoin et 19.2 ± 1.2 nmole/g de foie de la quercétine). D'autre part, le MDA mitochondrial évolue dans le même sens ce qui prouve une peroxydation lipidique très légère des membranes mitochondriales et les résultats obtenus sont 14.72 ± 1.17 nmole/mg de protéines et 13 ± 0.5 nmole/mg de protéines avec la propolis et les hétérosides flavoniques successivement par rapport à 25 ± 4.31 nmole/mg de protéines de témoin et 17 ± 0.5 nmole/mg de protéines avec la quercétine. Il s'agit donc d'une production

successive de 53.7% et 47.9% de MDA cytosolique avec l'extrait brut et les glycosides flavoniques contre 100% de témoin alors que celle mitochondriale est évaluée de 58.8% et 52%.

Tableau 18: Variation des taux de MDA cytosolique et mitochondrial après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg et la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois suivie par administration de la doxorubicine à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV Pendant trois jours.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Extrait éthanolique de propolis 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Quercétine 0.33 mg/ Kg +doxorubici ne 10 mg/Kg
MDA cytosolique (n mole/g de tissu)	34 ± 1.4	46.73 ± 4.4 ^{***}	18.26 ± 2.7 ^{***}	16.3 ± 1.08 ^{***}	19.3 ± 1.2 ^{***}
MDA mitochondrial (n mole /mg de protéines)	25 ± 4.31	31.14 ± 2.8 ^{###}	14.72 ± 1.17 ^{***}	13 ± 0.5 ^{***}	17 ± 0.5 ^{***}

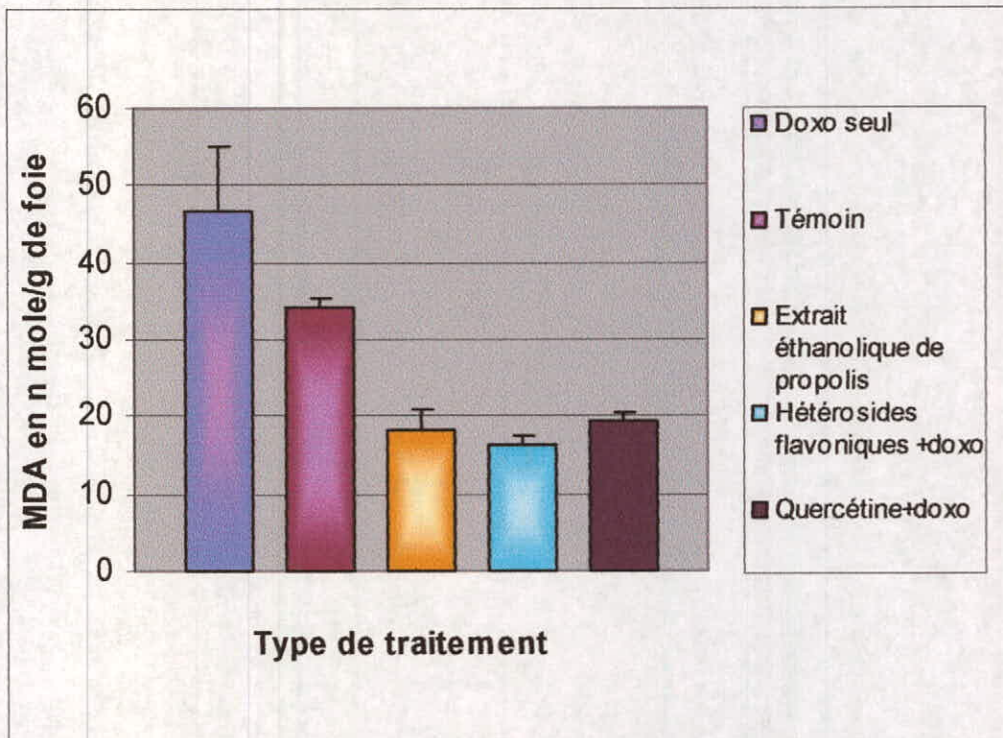


Figure 21: variation des taux de MDA cytosolique après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg et la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois suivie par administration de la doxorubicine à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours.

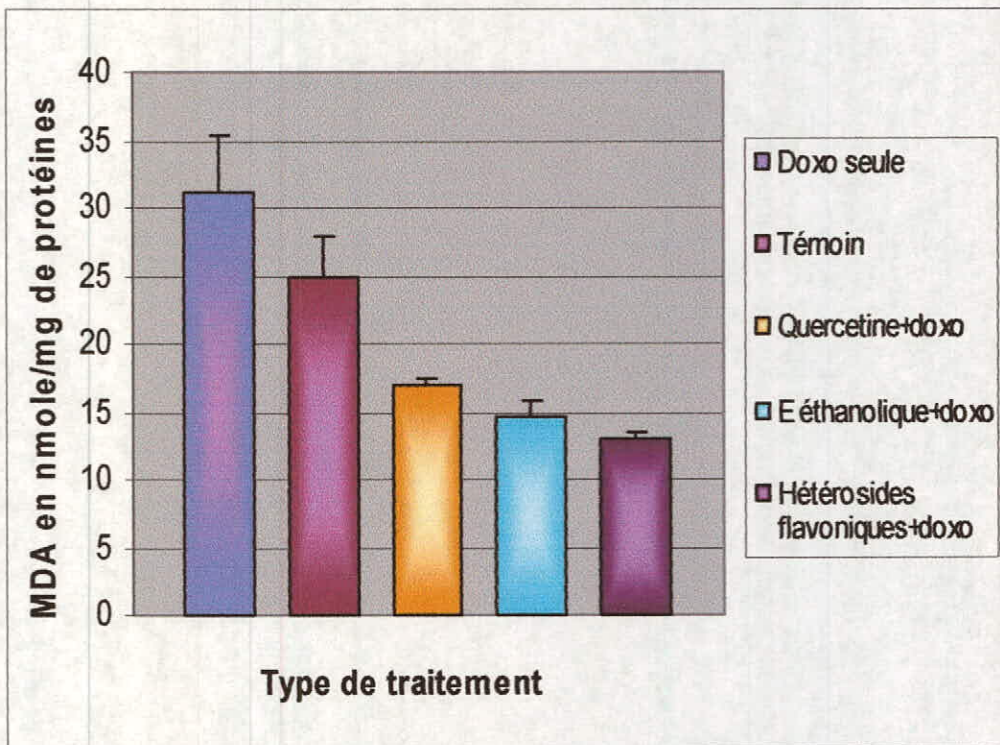


Figure 22: variation des taux de MDA mitochondrial après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercetine à 0.033 mg/Kg par voie orale.

IV .4.3. Le taux de glutathion cytosolique hépatique

Après dosage de glutathion intracellulaire hépatique chez les rats traités par la doxorubicine seule ou en association aux extraits, nous avons observé que le médicament seul induit une baisse de glutathion dans les cellules (0.73 ± 0.09 mmole/g de foie par rapport à 0.95 ± 0.2 mmole/g de foie chez témoin) ce qui correspond à une diminution de 23.2 %. Cependant l'administration des extraits suivie par la doxorubicine augmente plutôt les taux de glutathion intracellulaire. Cette augmentation est évaluée par 25.3%, 42.3%, et 35.8% avec l'extrait éthanolique, les glycosides flavoniques de propolis et la quercétine respectivement par rapport au témoin. Les résultats sont rapportés dans le tableau 19 et la figure 23.

Tableau 19 : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou précédée par l'administration de l'extrait brut, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur le taux de glutathion cytosolique hépatique.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Flavonoïdes de la propolis 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Quercétine 0.33 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg
Glutathion (m mole/g de tissu)	0.95 ± 0.22	0.73 ± 0.09 ^{###}	1.19 ± 0.007 ^{***}	1.35 ± 0.05 ^{***}	1.29 ± 0.06 ^{***}

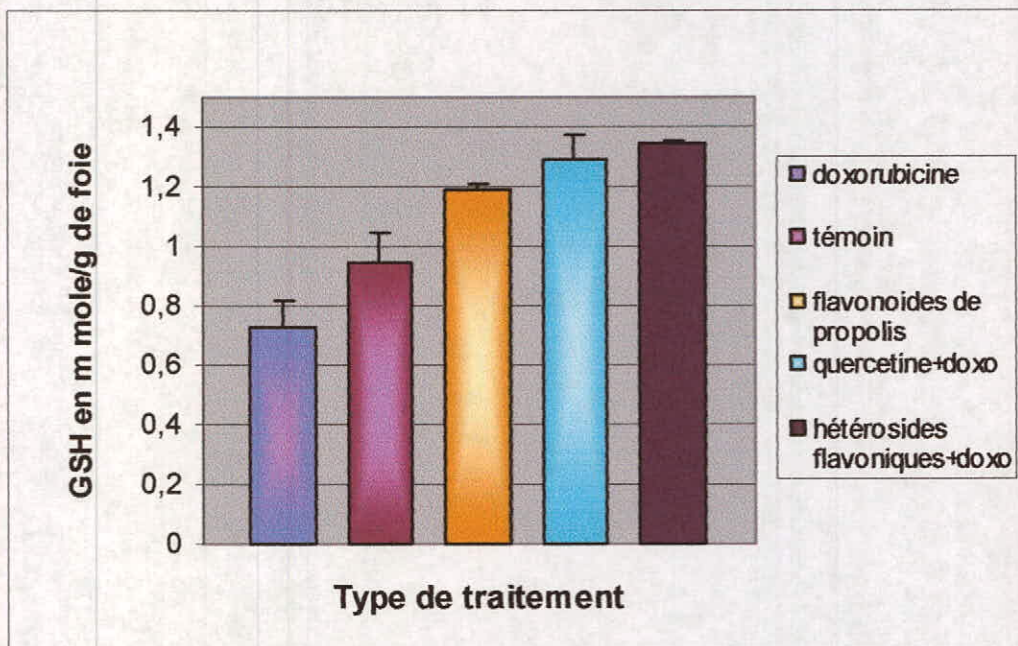


Figure 23 : : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou précédée par l'administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur le taux de glutathion cytosolique hépatique.

IV .4.5. L'activité enzymatique des enzymes antioxydantes

V .4.5.1. L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase SOD est parallèlement affectée par les flavonoïdes des extraits étudiés. Cette affection s'oriente vers l'activation de l'enzyme avec maximum d'activité avec les hétérosides flavoniques (2404.07 ± 1002 UI/g de protéines contre 1544 ± 931.2 UI/g de protéines de témoin). Par ailleurs, cette activité est réduite chez les rats traités par le médicament seul. Les résultats de dosage enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale à la suite d'un traitement par la doxorubicine seule à 10 mg/Kg ou associée aux flavonoïdes sont enregistrés dans le tableau 20 et la figure 24.

Tableau 20: Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Flavonoides de la Propolis 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Quercetine 0.033 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg
SOD mitochondrial (UI/g de protéines)	1544.11 ± 1021	1257 ±1000 [#]	2122.55 ± 780.1 [*]	2401.07 ±1002 [*]	2157.8 ± 620.3 [*]

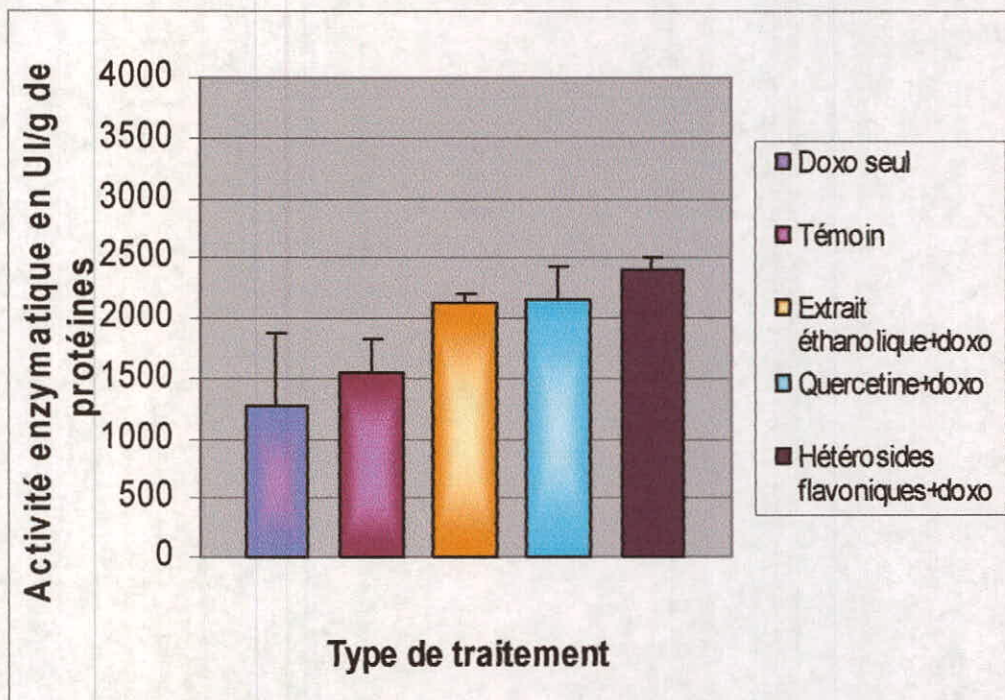


Figure 24: Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondrial après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait flavonique de propolis, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

IV .4.5.2. L'activité enzymatique de la catalase mitochondriale

Les résultats obtenus après traitement des rats par la doxorubicine seule à 10 mg/Kg et son association à l'extrait éthanolique et des glycosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg en comparaison avec la quercétine à 0.033 mg/Kg comme molécule de référence sont regroupés dans le tableau 21 et la figure 25.

Tableau 21 : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou précédée par l'administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Extrait éthanolique de Propolis 100 mg/Kg+ doxorubicine 10 mg/Kg	Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg	Quercétine 0.033 mg/Kg + doxorubicine 10 mg/Kg
CAT mitochondriale (UI/g de protéines)	2583.5 ± 870	874.8 ±1003 ^{###}	2831.7 ±1007 ^{***}	2991.3 ±1150 ^{***}	2968.4 ±1010 ^{***}

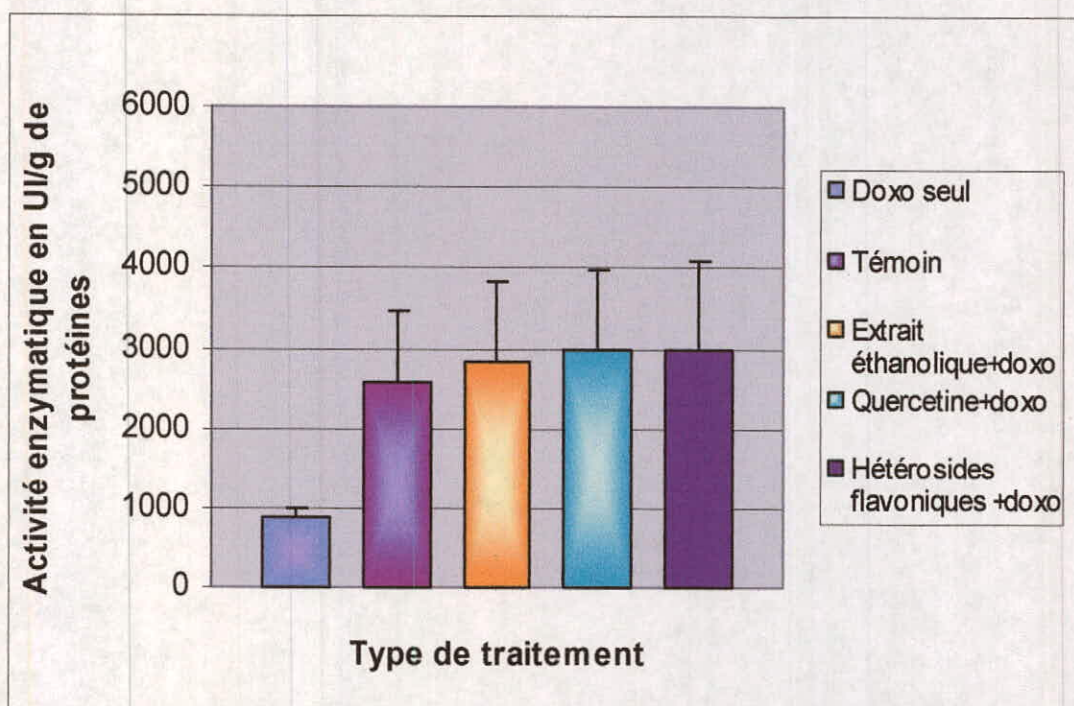


Figure 25: Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou précédée par l'administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique.

D'après les résultats, nous avons remarqué une activité puissante ($p < 0.001$) de nos extraits ainsi que la quercétine sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT) mitochondriale.

Il est constaté que l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale chez les rats prétraités par l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis augmente par 3.2 et 3.4 fois par rapport à celle enregistrée chez les rats traités par la doxorubicine. Cet effet reflète une stimulation de l'élimination des radicaux libres produits après administration du médicament.

En effet le traitement médicamenteux seul inhibe ou diminue l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale. Cet effet inhibiteur est traduit par réduction de l'activité enzymatique de l'enzyme. Si on compare l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale chez les rats traités par le médicament avec celle exprimées chez les témoins, on trouve que cette inhibition est très forte (874.83 ± 103 UI/g de protéines contre 2583.51 ± 870 UI /g de protéines).

IV .5. Effet curatif de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg sur le stress mitochondrial et cellulaire induit par la doxorubicine à 10 mg/Kg

IV .5.1. La production de l'anion superoxyde

A partir des résultats rapportés dans le tableau 22 et la figure 26, la production de l'anion superoxyde est modifiée sous l'effet d'un traitement par la doxorubicine seul (10 mg/Kg) ou associée aux glycosides flavoniques, l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/Kg ou à la quercétine à 0.033 mg/Kg pendant un mois.

Nous avons enregistré une réduction extraordinaire de la libération de superoxyde par les mitochondries hépatique, reflétée par les pourcentages de production ainsi obtenus après le dosage. L'extrait brut et les glycosides flavoniques de la propolis réduisent la production de superoxyde par 92% et 92.3% respectivement, alors que la quercétine par 63.8% ; il s'agit donc d'un effet remarquable de nos extraits par rapport à la molécule de référence.

Alors que le traitement médicamenteux seul aboutit à une augmentation très hautement significative de la production de superoxyde (127% contre 100% de témoin).

Tableau 22 : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou suivie par administration de l'extrait brut, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur la production de superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + extrait brut de propolis 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + quercétine 0.033 mg/Kg
Densité optique (DO)	0.095 ± .018	0.101 ± 0.018	0.014 ± 0	0.077±0.032	0.094±0.01
	0.190 ± .039	0.260 ± 0.02	0.019 ± 0.007	0.055±0.033	0.131±0.02
	0.260 ± 0.06	0.363 ± 0.009	0.023 ± 0.01	0.039±0.019	0.149±0.032
	0.330 ± 0.08	0.440 ± 0.045	0.031 ± 0.006	0.031±0.025	0.159±0.036
	0.450 ± 0.09	0.570 ± 0.07	0.032 ± 0.007	0.035±0.022	0.163 ± 0.04
Pourcentage de production	100%	127% ^{###}	7.11% ^{***}	7.7 % ^{***}	36.2 % ^{***}

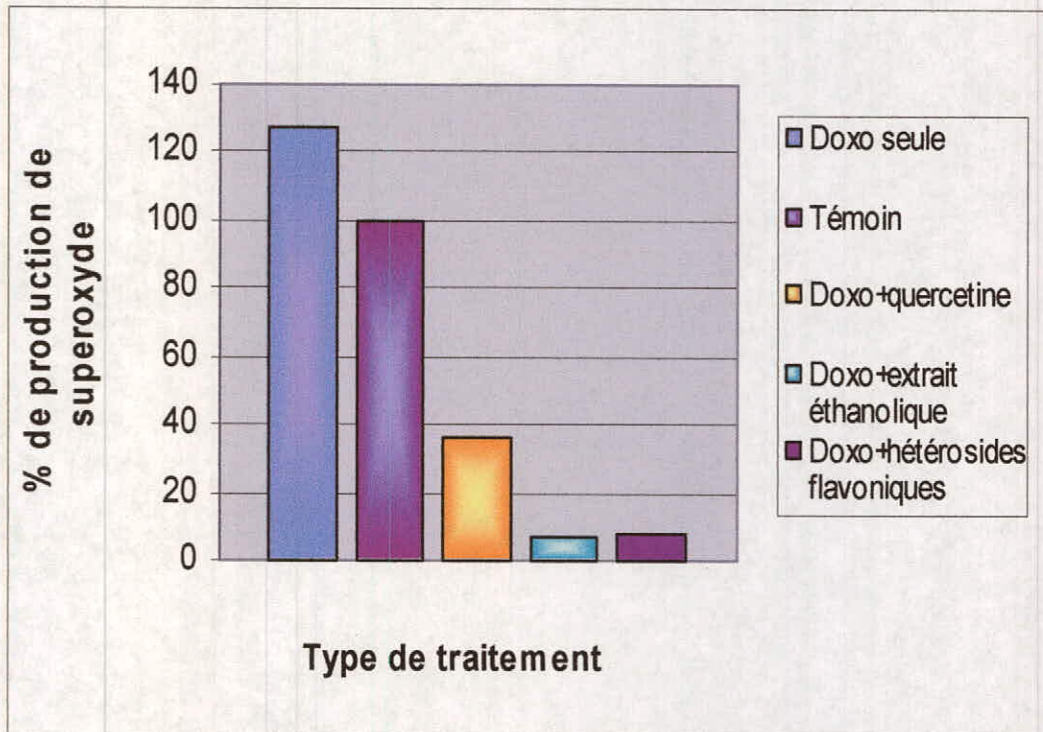


Figure 26 : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou suivie par administration de l'extrait brut, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercetine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur la production de superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat.

IV .5.2. Les taux de malondialdéhyde cytosolique et mitochondrial

L'effet curatif de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg et de la quercetine à 0.033 mg/Kg pendant un mois après administration de la doxorubicine à 10 mg/Kg pendant trois jours sont rapportés dans le tableau 23 et les figures 27 et 28.

Tableau 23 : Variation des concentration en MDA hépatique mitochondrial et cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + extrait brut de propolis 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + quercetine 0.033 mg/Kg
MDA cytosolique (n mole/g de tissu)	34 ± 1.4	46.73 ± 4.4 ^{***}	20.1±5.4 ^{***}	16.39 ± 2.7 ^{***}	18.36±2.17 ^{***}
MDA mitochondrial (n mole/mg de protéines)	25± 4.31	31.14 ± 2.8 ^{###}	10.43±0.54 ^{***}	9.56 ± 0.21 ^{***}	14.9 ± 1.08 ^{***}

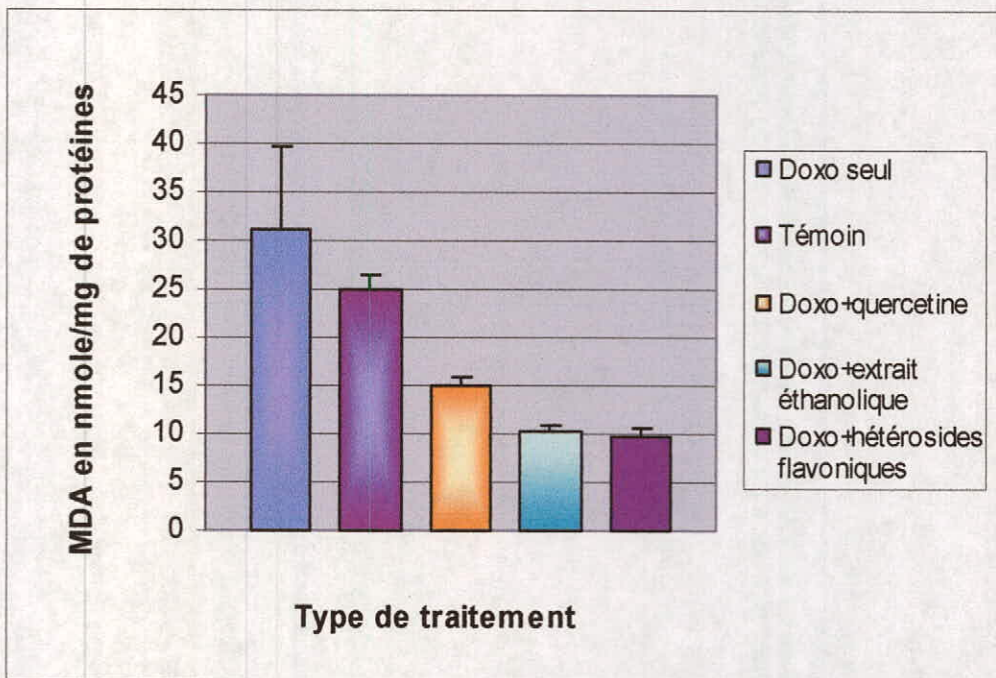


Figure 27: Variation des concentration en MDA hépatique mitochondrial après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

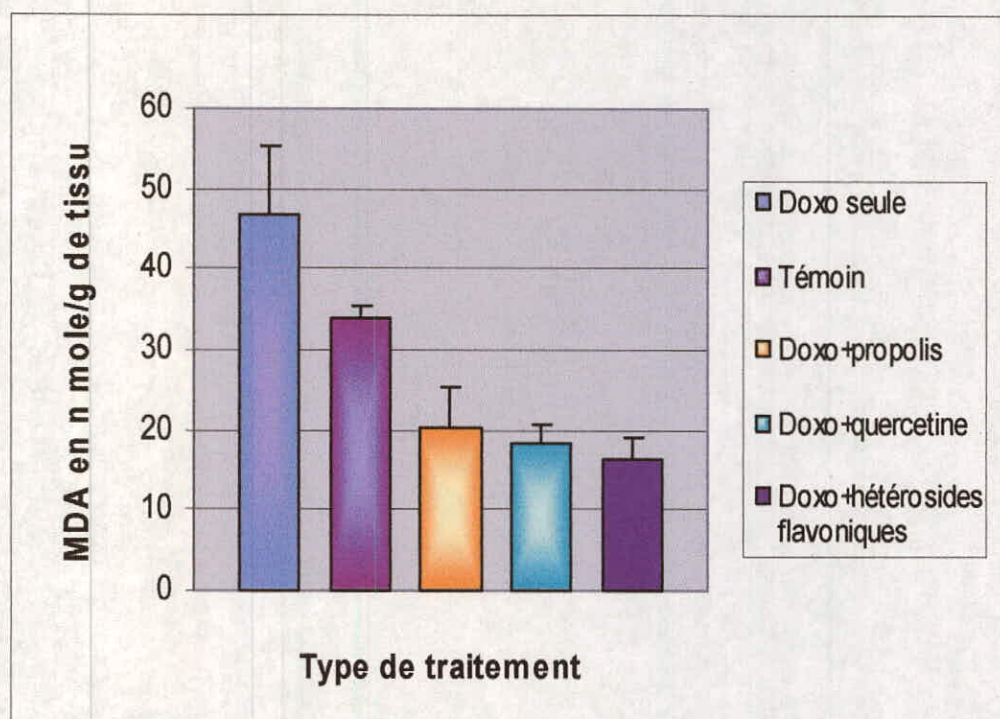


Figure 28: Variation des concentration en MDA hépatique cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

D'après les résultats, l'administration quotidienne de la doxorubicine à 10 mg/Kg entraîne une augmentation intense des taux de MDA cytosolique (46.73 ± 4.4 nmole/g de foie contre 34 ± 1.4 nmole/g de foie de témoin) et mitochondrial (31.14 ± 2.8 nmole/mg de protéines contre 25 ± 4.31 nmole/mg de protéine chez les témoins).

Cependant, le traitement par le médicament suivi par l'administration des extraits conduit à une diminution très importante ($p < 0.001$) des taux de malondialdéhyde cytosolique (20.1 ± 5.4 nmole/g de foie, 16.39 ± 2.7 nmole/g de foie avec l'extrait éthanolique de la propolis et ses glycosides flavoniques respectivement contre 46.73 ± 4.4 nmole/g de foie avec la doxorubicine et 15.92 ± 2.7 nmole/g de foie de la quercétine) et mitochondrial (10.43 ± 0.54 nmole/mg de protéine, 9.56 ± 0.21 nmole/mg de protéine contre 31.14 ± 2.8 nmole/mg de protéine chez les rats traités par le médicament et 14.9 ± 1.08 nmole/mg de protéine avec la molécule de référence).

Il s'agit donc d'une réduction dans la production de malondialdéhyde de 40.9 %, 52.1%, avec l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis respectivement par rapport au témoin. Cet effet prouve clairement la correction de stress oxydant induit par la doxorubicine.

IV .5.3. Le taux de glutathion cytosolique hépatique

Le contenu des cellules hépatiques en glutathion à la suite d'un traitement par la doxorubicine à 10 mg/Kg pendant trois jours suivi par administration de l'extrait éthanolique ou des glycosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg en utilisant la quercétine comme molécule de référence à la dose de 0.033 mg/Kg pendant un mois est enregistré dans le tableau 24 et la figure 29.

Le traitement médicamenteux seul provoque une diminution des taux de glutathion intracellulaire cytosolique par rapport au témoin. Par contre, l'association de médicament aux flavonoïdes augmente de manière très hautement significative les concentrations de glutathion dans les cellules hépatiques (1.12 ± 0.05 mmole/g de foie et 1.01 ± 0.09 mmole/g de foie avec la propolis et les hétérosides flavoniques successivement contre 0.73 ± 0.09 mmole/g de foie avec le médicament et 1.05 ± 0.03 mmole/g de foie avec la quercétine).

Les résultats obtenus montrent clairement l'effet cytotoxique de la doxorubicine ainsi que la capacité de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis à corriger les effets délétères issus d'un traitement par les médicaments anticancéreux.

Tableau 24 : Variation des concentrations en glutathion hépatique cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + extrait brut de la propolis 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + quercétine 0.033 mg/Kg
Glutathion (m mole/g de tissu)	0.95±0.22	0.73±0.09 ^{###}	1.12±0.05 ^{***}	1.01±0.09 ^{***}	1.05± 0.03 ^{***}

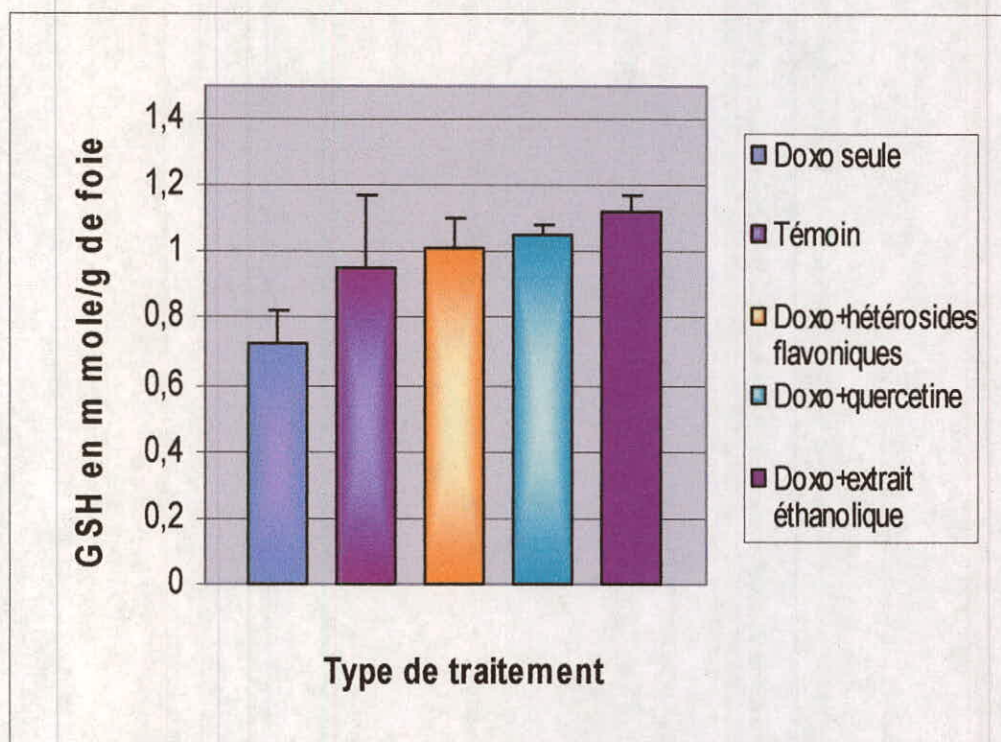


Figure 29: Variation des concentrations en glutathion hépatique cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg par voie intraveineuse IV pendant trois jours ou suivie par administration des flavonoïdes, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercetine à 0. 033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

IV .5.4. L'activité enzymatique des enzymes antioxydantes

IV.5.4.1. L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale

En comparant avec la quercétine qui active la superoxyde dismutase mitochondriale (2392.99 ± 793.1 UI/g de protéine par rapport à 1544 ± 931.2 UI/g de protéine de témoin), l'extrait brut et les glycosides flavoniques de la propolis possèdent à leur tour un effet activateur significatif sur l'enzyme.

Paradoxalement, la doxorubicine à 10 mg/Kg inhibe de manière significative la superoxyde dismutase mitochondriale (1257 ± 1002.5 UI/g de protéine contre 1544 ± 951.2 UI/g de protéine chez le lot témoin). La doxorubicine à 10 mg/Kg réduit l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase par 18.6% alors que l'extrait brut et les hétérosides flavoniques augmentent leur activité par 33.26% et 28.4% par rapport au témoin. Les résultats sont enregistrés dans le tableau 25 et la figure 30.

Tableau 25 : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + extrait éthanolique de propolis 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + quercétine 0.33 mg/Kg
SOD mitochondrial (UI/g de protéines)	1544.11 ± 1021	1257 ±1002.3 [#]	2057.86 ±119 [*]	1983.3 ±203.2 [*]	2392.9 ±793.5 [*]

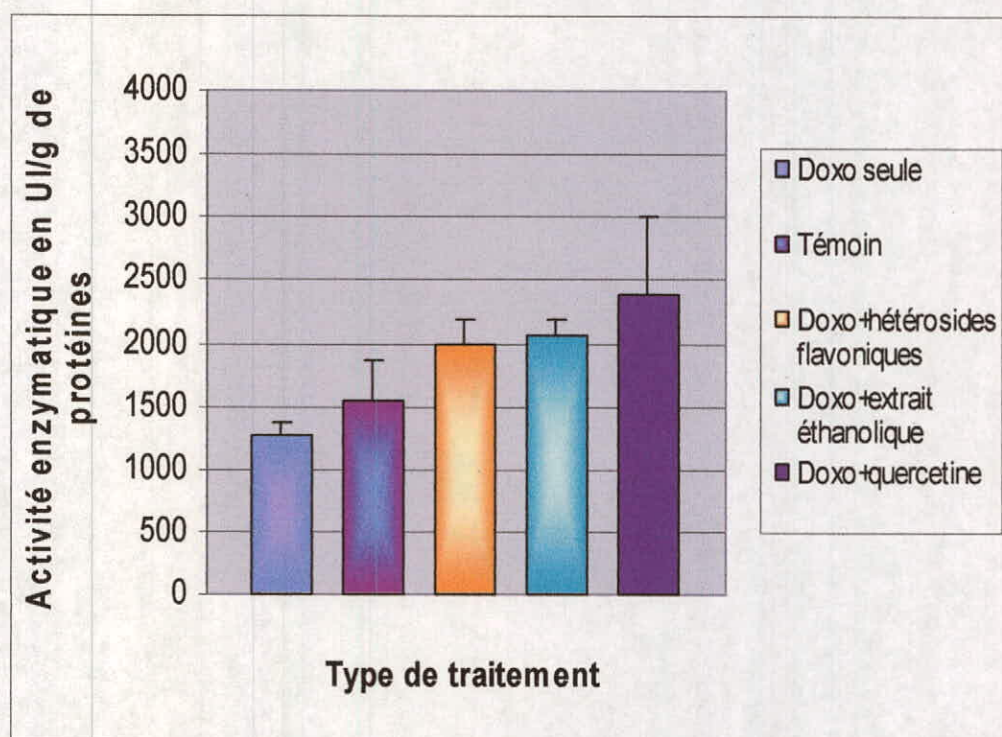


Figure 30: Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase mitochondriale

IV .5.4.2. L'activité enzymatique de la catalase mitochondriale

Les résultats interprétés dans le tableau 26 et la figure 31 montrent les variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale après traitement des rats par l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg avec la quercétine à 0.033 mg/Kg comme molécule de référence précédé par l'administration de la doxorubicine à 10 mg/Kg ou cette dernière toute seule. Il est constaté que les extraits influent par augmentation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale.

Cette stimulation très hautement significative est notée aussi bien avec l'extrait éthanolique et les glycosides flavoniques qu'avec la molécule de référence (2688.52 ± 1020.11 UI/g de protéines, 2640.85 ± 980.1 UI/g de protéines, 2601.38 ± 650 UI/g de protéines avec la propolis, les hétérosides flavoniques et la quercetine respectivement contre 874.8 ± 903 UI/g de protéines avec le médicament). A partir des résultats ainsi obtenus, l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale augmente après administration de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis et la quercétine par 3 fois, ce qui évoque l'absence de différences d'effet curatif entre nos extraits et la molécule de référence sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale.

Tableau 26 : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0. 033 mg/Kg par voie orale sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale

	Témoin	Doxorubicine 10 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + propolis 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + Hétérosides flavoniques 100 mg/Kg	Doxorubicine 10 mg/Kg + quercetine 0.33 mg/Kg
CAT mitochondrial (UI/g de protéines)	2583 ±870	874.8 ±903 ^{###}	2688.5 ±1020 ^{***}	2640.8 ±980 ^{***}	2601.3 ± 650 ^{***}

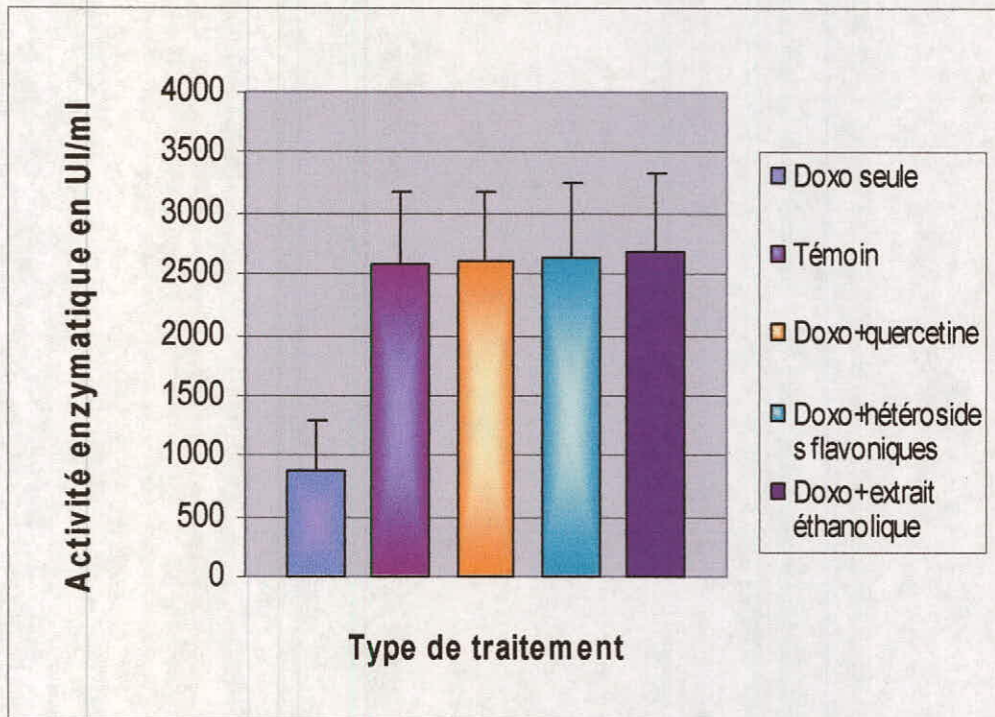


Figure 31 : Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg ou suivie par administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg ou la quercétine à 0.033 mg/Kg par voie orale sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale

DISCUSSION

V. DISCUSSION

En addition à la synthèse d'ATP, la mitochondrie constitue la source majeure de la production cellulaire des espèces réactives de l'oxygène, et de ce fait elle a fait l'objet de nombreuses études. Ces radicaux libres oxygénés sont impliqués dans de nombreuses pathologies et sont responsables notamment des maladies neurodégénératives, athérosclérose, inflammation, diabète, vieillissement et cancer (231, 232, 233, 234, 235). Plusieurs produits naturels tels que les flavonoïdes, les terpénoïdes et les stéroïdes ont suscité ces dernières années l'attention considérable due à leurs propriétés pharmacologiques diverses comprenant l'activité antioxydante et hépatoprotectrice (236, 237). Par cette activité antioxydante intéressante, ils sont capables d'atténuer le développement des tumeurs et des maladies inflammatoires. Les antioxydants jouent un rôle important dans l'inhibition et le piégeage des radicaux libres, en exprimant ainsi leurs capacités à être pharmacologiquement bénéfiques dans la prévention et le traitement de telles pathologies (238). Il a été démontré que les flavonoïdes de la propolis expriment un spectre large d'activités biologiques ; effet antibactérien, antiinflammatoire, anticancerigène, hépatoprotecteur, antivirale, spasmolytique, et antioxydant (239).

Les résultats obtenus sur l'effet antioxydant des flavonoïdes de la propolis sont extraits à partir des études *in vitro* et *in vivo* à court terme, et jusqu'à présent, il n'existent pas dans la littérature des études faites sur l'effet antioxydant de la propolis ni à moyen ni à long terme.

Notre travail est consacré en premier lieu à la recherche de la conservation de l'activité antioxydante des flavonoïdes de la propolis à la suite d'une administration prolongée c'est-à-dire la recherche d'une intolérance probable à l'égard de ce type de traitement, et en deuxième lieu la comparaison de l'effet *in vitro* avec celui *in vivo* des flavonoïdes d'une part et d'autre part la comparaison de l'activité antioxydante de l'extrait brut avec celle des glycosides flavoniques. On va essayer de présenter l'interaction des flavonoïdes comme molécules biologiques actives avec les cellules et les mitochondries hépatiques, la discussion de leur effet antioxydant contre le stress oxydant induit par le métabolisme de la doxorubicine et de faire sortir un mécanisme d'action générale tant pour la doxorubicine que pour les composés phénoliques en générale.

Récemment, il a été montré que la doxorubicine provoque l'apoptose des cellules cardiaques en culture chez le rat. Il est généralement proposé que le stress oxydant soit un facteur important dans la stimulation de la cardiotoxicité induite par la doxorubicine. Cependant, les mécanismes

précis par lesquels ce médicament conduit au stress oxydant et l'apoptose ne sont pas été définitivement identifiés (240, 241, 242). Il est aujourd'hui admis que la mitochondrie joue un rôle important dans la formation des radicaux libres issus de l'action toxique des médicaments. Sur cet organite sub-cellulaire, on pense aussi que les anticancéreux agissent par le même mécanisme après leur transformation en métabolites réactifs (243, 244). On pense que la mitochondrie est la cible primaire de l'action toxique de la doxorubicine; les électrons célibataires sont captés par la doxorubicine provoquant ainsi la formation des radicaux superoxydes par auto-oxydation de son semiquinone (245, 246).

En convention, la chaîne respiratoire altérée peut produire plus de superoxyde selon le degré d'insuffisance, l'excès de production peut dépasser les capacités de la superoxyde dismutase et par conséquent le déclenchement de l'apoptose par ces superoxydes ou leurs dérivées (247).

Dans notre étude, nous avons trouvé que l'extrait éthanolique, et les hétérosides flavoniques de la propolis peuvent effectivement diminuer et très clairement la quantité des anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dans la matrice mitochondriale. Cet effet peut être attribué à l'inhibition directe de la production de $O_2^{\cdot-}$ par interaction probable avec le complexe III considéré comme le site essentiel de la production des ROS dans la mitochondrie comme il peut être le résultat de pouvoir scavenger. In vitro, cette activité était dose-dépendante avec maximum d'efficacité à fortes concentrations tel 10^{-2} M où la production de superoxyde est réduite par 65.3% et 55.2% avec les hétérosides flavoniques et l'extrait éthanolique de la propolis respectivement. D'autre part, l'administration d'une dose quotidienne unique de 100 mg/Kg des flavonoïdes (de l'extrait brut et les hétérosides flavoniques) de la propolis ou la quercétine à 0.033 mg/Kg, précédée ou suivie par administration de la doxorubicine à 10 mg/Kg conduit à une réduction très importante de la libération de superoxyde par les mitochondries hépatiques. Si on compare les résultats de l'étude in vitro avec ceux de l'étude in vivo (à long terme, préventive et curative), on peut remarquer nettement que l'administration des flavonoïdes réduit le taux de superoxyde de manière plus importante que leur exposition directe aux mitochondries isolées. Dans l'étude in vitro, l'étape de métabolisme des flavonoïdes est éliminée, et à partir de là on suggère que les métabolites des flavonoïdes issus de leur biotransformation entérohépatique après administration par voie orale peuvent avoir un pouvoir antioxydant plus fort que celui des molécules mères.

Ces dernières années, plusieurs études ont prouvé que la quercétine et d'autres flavonoïdes subissent des conversions métaboliques pendant leur absorption dans les cellules épithéliales

intestinales avant d'atteindre le foie et la circulation générale (248, 249). L'administration de l'extrait éthanolique de la propolis d'Uruguay aux rats suivie d'une analyse chromatographique du sang aboutit à l'identification de sept types de flavonoïdes qui étaient la spécimen, pinobanksin 5-methylether, pinobanksin, kaempferol, chrysine, pinosebrine et galangin. Ces molécules sont identifiées aussi bien dans le sang que dans les urines après traitement par la bêta- glucuronidase/sulfatase. Ces résultats suggèrent que les flavonoïdes de la propolis sont métabolisés après administration par voie orale avant d'être libérés dans la circulation sanguine pour être distribués dans les tissus (250).

Nos résultats sont en parfaite corrélation avec ceux de la littérature ; Le trans -resveratrol, un flavonoïde identifié dans les raisins, prévient la formation de $O_2^{\cdot -}$ dans les cellules cérébrales. Cet effet est dû de l'inhibition partielle du complexe III et plus précisément de cycle décyubiquinone (34). On pense que le mécanisme d'action de la propolis est similaire à celui de trans -resveratrol mais on ne sait pas si le site d'action est le même.

En hypothèse, les flavonoïdes ou les hétérosides flavoniques de la propolis peuvent interagir avec le cycle Q pour inhiber la formation de radical ubisemiquinone ; ils peuvent capter le premier électron cédé par le cytochrome b₅₆₂ à l'ubiquinol ou additionner un électron au radical ubisemiquinone après départ d'un autre de l'ubiquinol au centre Fe-S en inhibant la formation du même radical.

La diminution des radicaux $O_2^{\cdot -}$ dans la matrice mitochondriale peut être aussi expliquée par le pouvoir scavenger des flavonoïdes et des polyphénols en général. Dans le but d'évaluer l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et des glycosides flavoniques de la propolis, nous avons utilisé une méthode basée sur la réduction du radical 1,1 diphényle 2- picrylhydrazyl (DPPH[•]) et les résultats obtenus à propos de l'extrait éthanolique sont en accord avec ceux déjà publiés (217, 251, 252). Corroborant, les propriétés antiradicalaires de la quercétine sont dirigées contre les radicaux hydroxyles $\cdot OH$ et superoxydes $O_2^{\cdot -}$ qui sont des espèces impliquées dans le déclenchement de la peroxydation lipidique (253).

L'effet piègeur de l'extrait éthanolique de la propolis était plus élevé que celui de la vitamine E et des hétérosides flavoniques. Ces derniers qui sont des formes glycosylées des aglycones, dont lesquels un ou plusieurs groupements hydroxyles sont occupés, ont présenté un pouvoir de dégradation des radicaux DPPH de 38.9% à la concentration de 10^{-2} M alors que celui de l'extrait éthanolique de la propolis était de 91.22% à la même concentration et de la vitamine E de 43.4% . Nos résultats sont en partie en contradiction avec ceux de Maria et al 2000 ; Maria et al ont fait la comparaison de l'effet scavenger de la propolis collectée de

différentes régions de l'Argentine, et ont rapporté que l'extrait éthanolique de la propolis exprime d'une part un pouvoir scavenger remarquable qui reste d'autre part faible devant celui de la quercétine (213). La composition chimique de la propolis varie essentiellement avec la région de collection et par conséquent l'activité biologique. On peut expliquer nos résultats par la présence probable de nouvelles molécules dans la propolis algérienne (la propolis de Kaous) et qui participent à la modification de cet effet. Chen et al ont rapporté que les flavonoïdes ayant un pouvoir antioxydant très remarquable. Puisque la propolis contient des niveaux élevés en flavonoïdes, on pense que ces molécules biologiquement actives peuvent être responsables de cet effet antioxydant (254).

Nous avons trouvé que l'extrait éthanolique de la propolis, les hétérosides flavoniques ainsi que la quercétine peuvent prévenir et protéger les cellules et les mitochondries hépatiques des effets radicalaires. Cela est expliqué par le fait qu'ils peuvent soit inhiber la libération des radicaux oxygénés ou la chélation de ces derniers après leur formation par le métabolisme de la doxorubicine. Alors, ils présentent à la fois un effet préventif aussi bien que curatif. Plusieurs composés phénoliques comme la curcumine, la quercétine, le resveratrol ont montré déjà leurs capacités protectrices au cours de l'ischémie-réperfusion rénale, hépatique et cardiaque. L'inhibition des effets radicalaires a comme conséquence majeure l'empêchement de la peroxydation lipidique, protéique et nucléaire (226, 255).

On connaît bien que le maintien de l'intégrité de la chaîne de transfert des électrons dans la mitochondrie, par inhibition de la peroxydation lipidique et protéique, permet de limiter au maximum les fuites électroniques et la formation des ROS (256, 257, 258). La peroxydation lipidique est un processus auto-catalytique qui est une cause commune de la mort cellulaire. Par conséquent, l'inhibition de cette lipoperoxydation a été employée comme index important de l'activité antioxydante (259). Le malondialdéhyde MDA est l'un des produits finals de la peroxydation lipidique qui est intensivement étudié et les flavonoïdes ont été montrés pour réduire de manière significative son niveau dans la cellule (260). D'après ce que nous avons obtenu, le traitement des rats ou des mitochondries hépatiques par les flavonoïdes atténue l'augmentation des taux de MDA induite par la doxorubicine *in vivo* ou le $FeCl_2 / FeCl_3$ *in vitro* respectivement. Cela est dû à la protection des membranes cellulaires et mitochondriales de la peroxydation lipidique par les radicaux oxygénés et la captation des radicaux hydroxyles et alcoxyles.

La peroxydation lipidique *In vitro* dans un homogénat de foie peut procéder d'une manière non enzymatique. Le processus est induit par l'ascorbate en présence de Fe^{+2}/Fe^{+3} , et il a été signalé que Fe^{+2} et l'acide ascorbique ont stimulé la peroxydation lipidique (238). Selon les résultats obtenus, l'extrait éthanolique et les glycosides flavoniques de la propolis inhibent la peroxydation lipidique induite par le Fe^{+2} .

Ces dernières années, l'attention a été concentrée sur le rôle de la métabolisation des produits chimiques en métabolites fortement réactifs qui lancent la toxicité cellulaire. Beaucoup de composés, y compris les médicaments utiles, peuvent endommager les cellules par l'activation métabolique du produit chimique aux composés fortement réactifs tel que les radicaux libres (238). Ces métabolites réactifs jouent un rôle crucial dans la pathogénie et les dommages tissulaires. Certes, les conséquences des attaques des biomolécules par ces radicaux, comme la peroxydation des lipides, peuvent être le résultat des altérations des membranes biologiques (104). Le métabolisme de la doxorubicine par les cytochromes P450 génère des métabolites réactifs, ces derniers vont attaquer les membranes cellulaires et mitochondriales. La conséquence est la destruction de la microarchitecture membranaire, la peroxydation lipidique et l'augmentation des niveaux de malondialdéhyde.

Les résultats de notre étude sont conformes aux travaux de Cengarle et al (1998). Cengarle et al ont étudié la capacité antilipopéroxydative dans les systèmes lipidiques et ont rapporté que l'extrait de propolis exprime une capacité antilipopéroxydative puissante qu'était meilleure que celle de la vitamine E l'antioxydant de référence (261). L'acide caféique, un composé de la propolis, possède à la fois un effet antilipoperoxydatif et un autre piègeur des ROS en exprimant ainsi une activité antioxydante importante (262, 263, 264).

L'effet protecteur des flavonoïdes vis-à-vis de la peroxydation lipidique des membranes est bien établi, et dépend de la structure moléculaire et la capacité d'interagir et de pénétrer dans la bicouche lipidique (265, 266). Dans le même sens, ce pouvoir protecteur est en relation directe avec l'orientation des flavonoïdes dans les biomembranes et par conséquent avec les coefficients de répartition dans les phases lipidiques (201, 197). Ainsi, la quercétine avec un coefficient de répartition de 2.8 constitue un bloqueur des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (253).

L'activité antilipoperoxydative de la quercétine dépend de sa capacité à chélater les ions Fe^{++} . En fait, plusieurs lignes d'évidence indiquent que la peroxydation de lipides négociée par les espèces oxygénées est strictement contingente à la disponibilité d'iron. Il y a trois

domaines possibles complexant des métaux qui peuvent agir l'un sur l'autre avec ces ions ; Par la liaison d'hydrogène entre les groupements 3', 4'-dihydroxy localisé sur l'anneau B, entre le groupe 3-hydroxy et 4-carbonyl dans l'anneau C et entre le groupe 5-hydroxy et 4-carbonyl sur l'anneau C (253, 267, 268).

L'analyse chimique de la propolis de Kaous a montré qu'elle est composée essentiellement de diosmine et de quercétine. Ces composés présentent les trois éléments de structure nécessaire pour l'activité antiradicalaire : une structure cathecol sur le cycle B, une double liaison 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo, et des hydroxyles en position 3 et 5 qui permettent une activité maximale. De ce fait, ces composés sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxydes particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique (269).

Certains des effets néfastes bien connus de la génération excessive de ROS dans les systèmes biologiques incluent la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation des acides nucléiques, des carbohydrates et l'oxydation des groupements sulfhydryle et d'autres groupements susceptibles des protéines (27, 271). Ces radicaux libres oxygénés attaquent ainsi les membranes mitochondriales qui sont particulièrement exposées à leurs effets dangereux, en aboutissant à l'altération des fonctions mitochondriales par peroxydation (lipidique et protéique) et/ ou l'ouverture de pore de transition membranaire (272). La mitochondrie a un rôle important dans le déclenchement de processus apoptotique. Au cours de ce type de mort cellulaire un ensemble d'événements successifs a eu lieu en commençant par la perturbation de la respiration mitochondriale, changement du potentiel membranaire mitochondrial où serait impliqué le pore de transition (PTP), un découplage de la respiration et une inhibition de la synthèse d'ATP, un développement d'une assymétrie membranaire suivie d'une libération de facteurs apoptotiques tel que le cytochrome c et les espèces réactives de l'oxygène (130).

Dans notre étude nous avons exploré le rôle des flavonoïdes et des polyphénols en général comme antioxydant dans la prévention de l'ouverture de pore de transition (effet sur le gonflement mitochondrial) évalué par le changement de la perméabilité membranaire (MMPT). L'induction de la MMPT par les prooxydants peut être potentialisée par le calcium Ca^{++} (273). Nos résultats montrent que le MMPT induite par le $CaCl_2$ à 100 μM est atténuée en présence des principes actifs des deux extraits. Cela est obtenu aussi bien dans l'étude *in vitro* qu'*in vivo* à long terme. Dans l'étude *in vitro*, l'effet était toujours concentration dépendant avec maximum d'activité à 10^{-2} M où l'inhibition de gonflement mitochondrial atteint 68.03% et 69.5 % avec l'extrait brut et les glycosides flavoniques respectivement. *In vivo*, l'administration de

l'extrait éthanolique et des glycosides flavoniques à 100 mg/Kg aboutit à une inhibition aussi importante de l'amplitude de gonflement mitochondrial (69.2 % et 62.8 % successivement). Dans la mitochondrie, la MMPT et la génération des ROS est significativement atténuée par une variété d'antioxydants. Ainsi, la vitamine E et la cyclosporine A (CsA) ont été trouvées pour réduire la perméabilité membranaire mitochondriale (136).

Les agents prooxydants sont capables d'induire la perméabilité mitochondriale probablement par augmentation de la respiration mitochondriale contrôlée par l'activité des déshydrogénases de la chaîne respiratoire qui sont à leurs tours régulées par le taux de calcium libre dans la matrice (274). L'excès de calcium dans la matrice mitochondriale est l'un des facteurs les plus communs d'induire la génération des radicaux libres oxygénés. La concentration intramitochondriale élevée en calcium empêche le transport des électrons dans la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative, ou active les principaux enzymes responsables de la génération des espèces réactives de l'oxygène (275).

Alternativement, les prooxydants par diminution des capacités de défense cellulaires (glutathion...) favorisent l'oxydation des groupements thiols du pore en aboutissant à leur ouverture. Finalement, il est également proposé que le stress oxydant stimule la libération de calcium matriciel qui peut être encore pris par les mitochondries et que le calcium excessif puisse être responsable de la MMPT. Donc, l'oxydation des groupements thiols a comme principale conséquence l'ouverture de PTP (276).

Les travaux effectués par Bhaumik et al (1999) et Kuo et al (1996) ont proposé un mécanisme d'action de la curcumine comme molécule antioxydante dans l'induction de l'apoptose des cellules tumorales. Ils ont suggéré que le mécanisme moléculaire d'induire ce type de mort cellulaire est basé sur le fait que la curcumine réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} , qui à son tour réagit avec le H_2O_2 et augmente la vitesse de production des radicaux hydroxyles $\cdot OH$. Ce radical hautement réactif en présence de calcium oxyde les groupements thiol de pore en aboutissant à leur ouverture. C'est le mécanisme par lequel la curcumine agit comme molécule antiproliférative (277, 278, 279).

On pense que le mécanisme d'action des flavonoides de la propolis sur le gonflement mitochondrial est similaire à celui proposé par Xin-Jian et al (2005) pour l'acide salvianique ; cette molécule extraite de *Salvia miltorrhiza* Bunge, a été montré pour empêcher le gonflement mitochondrial par l'intermédiaire de réduire l'oxydation des groupements thiols des ANT de pore de transition de perméabilité (280). On peut proposer aussi que les principes actifs de la propolis

ainsi que ses glycosides flavoniques entrent en compétition avec le calcium en empêchant par la suite leur fixation sur son site au niveau du pore de transition de perméabilité et par conséquent l'inhibition du gonflement et d'apoptose.

Lorsque l'équilibre entre les niveaux intracellulaires des prooxydants et d'antioxydants est perturbé, les radicaux libres sont produits en excès, accumulés dans la cellule qui devient devant un stress oxydant certain. Pour se protéger des effets toxiques de ces radicaux, les cellules ont développé une variété de mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques. Les systèmes cellulaires et mitochondriaux de défense contre les différents types de stress incluent essentiellement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le glutathion peroxydase GPx, des molécules antioxydantes d'origine exogène comme la vitamine E, les flavonoïdes et celles d'origine endogène tel que le glutathion (281, 282).

D'après les résultats de notre recherche, l'addition de l'extrait éthanolique ou des glycosides flavoniques de la propolis à des mitochondries isolées de rat augmente à fortes concentrations l'activité enzymatique de la SOD et la catalase mitochondriaux. L'explication probable de cet effet *in vitro* est l'activation de l'enzyme par les principes actifs des extraits. *In vivo*, le traitement médicamenteux seul réduit nettement l'activité enzymatique des deux enzymes. Ceci peut être dû à l'inhibition des enzymes par les métabolites réactifs de la doxorubicine ou à leur destruction par peroxydation protéique. Cela est en contradiction avec les résultats obtenus par APRIL et al (2002), qui ont noté une augmentation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase et la catalase des cellules cardiaques après traitement par la doxorubicine à la dose de 20 mg/Kg pendant 4 jours (283).

Face au stress oxydant, la SOD se comportera de deux manières différentes. Dans un premier temps, l'organisme réagira lors d'un stress oxydant modéré en surexprimant la SOD. Si le stress devient intense et produit de façon massive les espèces radicalaires toxiques, la SOD sera détruite (284, 285). Il est d'intérêt particulier de noter que la dismutation de superoxyde prévient la formation de $\cdot\text{OH}$ et par conséquent la défense contre la toxicité de l'oxygène. L'activité de l'élimination des ROS est efficace seulement si elle est suivie par l'action de la catalase. Il est donc logique d'obtenir une augmentation de l'activité enzymatique de la SOD associée à celle de la catalase (259).

Effectivement, nous avons trouvé que l'administration des flavonoïdes des extraits seuls à long terme ou en association à la doxorubicine augmente l'activité enzymatique des deux

enzymes antioxydantes. Il est pensé que cette augmentation est considérée comme réponse adaptative des enzymes à une production modérée des métabolites réactifs.

En s'appuyant sur une autre hypothèse, l'augmentation de cette activité enzymatique peut être la conséquence d'une induction de la synthèse protéique. Dans un travail réalisé par PAUL BROOKES et al, la quercétine a montrée ses capacités protectrices lors de l'ischémie réperfusion cardiaque. Ils ont trouvé que le traitement par la quercétine augmente l'activité enzymatique de la SOD et ont proposé que cela revienne à sa capacité d'induire la synthèse protéique de l'enzyme par action au niveau génétique. Il est largement rapporté que l'expression des gènes qui codent la superoxyde dismutase répond au différents types de stress incluent les espèces réactives de l'oxygène (286, 287, 288).

ANTOLIN et al ont prouvé que la mélatonine, qui présente un effet antioxydant comparable à celui de l'acide caféique phényl ester (CAPE), augmente le niveau des RNA_m de la SOD mais, il est inconnu si le CAPE a probablement un effet sur la synthèse des RNA_m des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase et la catalase (289).

A l'addition des enzymes, la cellule dispose pour sa protection du glutathion. C'est le principal antioxydant propre à la cellule en se liant par son pôle SH aux métabolites toxiques. On admet aussi aujourd'hui que la formation de métabolites réactifs consomme du glutathion quand elle est importante et que cela aboutit à une déplétion du glutathion ce qui a pour principale conséquence la peroxydation lipidique et une oxydation des groupes thiols des protéines (290, 291). Par contre, on peut éviter ces effets par l'apport de substances pouvant piéger les radicaux libres. Ces substances sont des polyphénols obtenus soit par synthèse chimique comme les dérivés semi-synthétiques de la curcumine soit par voies extractives à partir de plantes médicinales. Ces substances sont regroupées sous le terme d'antioxydants. De nombreux travaux scientifiques ont démontré leurs origines, leurs effets biologiques et pharmacologiques (182, 201, 292). Les polyphénols sont utilisés dans les affections vasculaires, bactériennes, inflammation, ulcère et même dans la prévention des cancers comme l'ont rapportés de nombreux travaux (226, 293).

Les taux de glutathion enregistrés chez les rats traités par la doxorubicine sont inférieurs à ceux des témoins. Cette diminution est le résultat de la consommation de glutathion par les métabolites réactifs toxiques. En addition, l'augmentation de la peroxydation lipidique chez ces rats peut être due à l'insuffisance de systèmes de protection antioxydants essentiellement le glutathion qui est aussi épuisé par le peroxyde d'hydrogène (294). En effet, l'épuisement de GSH augmente la sensibilité des cellules à de diverses agressions. Le concept d'un seuil de glutathion-

SH pour la détoxification de médicaments a été discuté par Jollow. Par exemple, les dommages hépatiques à la suite d'une consommation d'alcool ou de médicaments comme l'acétaminophen, des dommages de poumon par le tabagisme et des cellules de muscle par l'activité physique intense, tous sont connus pour être corrélés avec le bas niveau de GSH dans les cellules (238, 295, 296).

Par contre, nous avons enregistré une augmentation des taux de glutathion dans les groupes d'animaux recevant les flavonoïdes avant et après le traitement médicamenteux. L'augmentation des taux de glutathion dans les cellules hépatiques après administration de l'extrait éthanolique, des hétérosides flavoniques de la propolis et la quercétine prouve l'effet préventif et curatif des flavonoïdes contre la toxicité induite par les médicaments anticancéreux.

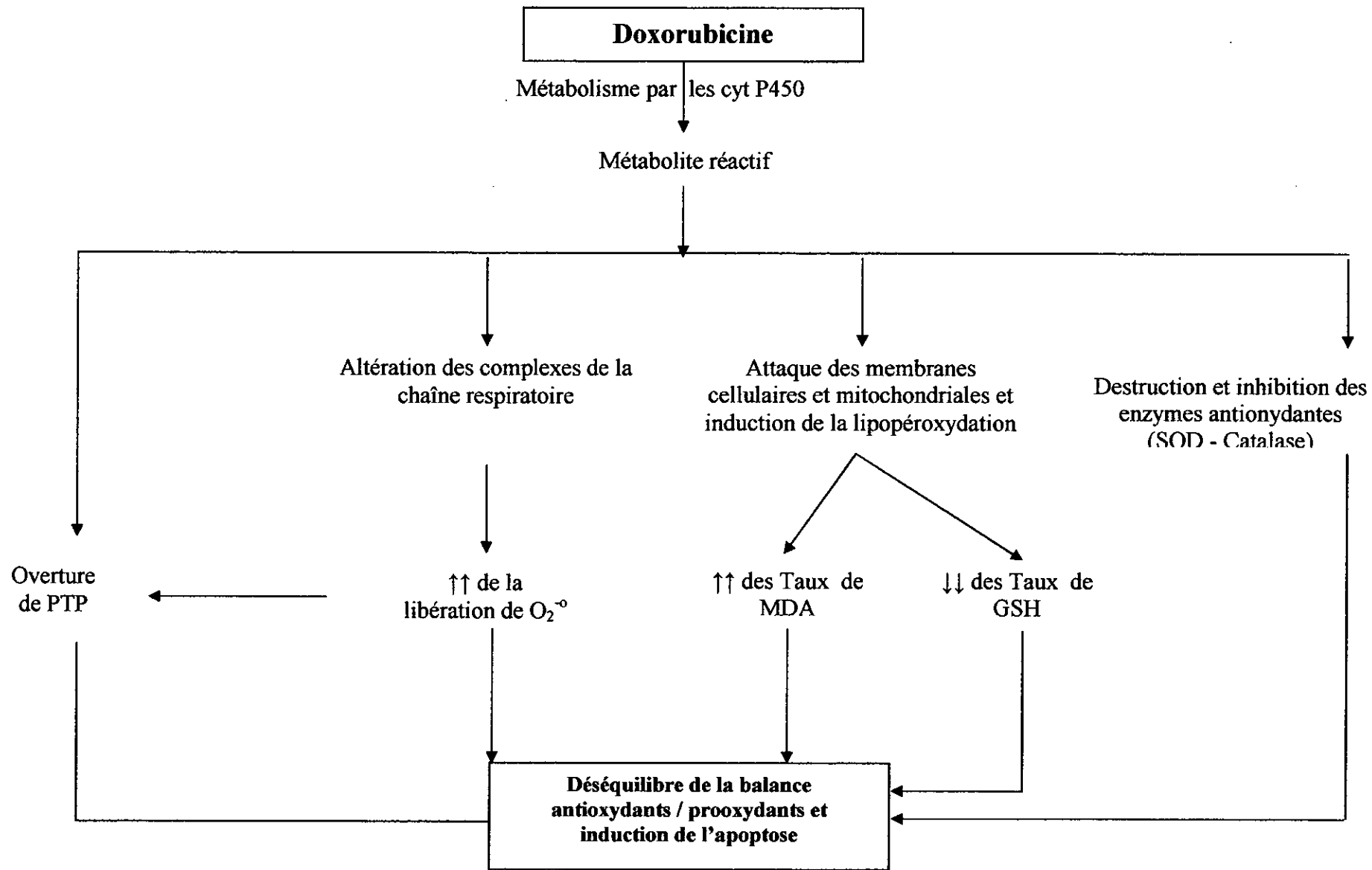
On peut expliquer cette augmentation soit par l'action des flavonoïdes au niveau génétique pour induire la synthèse de cette protéine ou sur l'une des étapes de sa biosynthèse soit par l'effet scavenger des flavonoïdes c'est-à-dire au lieu que les métabolites réactifs toxiques se fixent et consomment le glutathion ils vont être captés par les flavonoïdes.

Les radicaux libres sont capables de réduire l'activité enzymatique de certains antioxydants endogènes tel que l'alpha tocophérol, le glutathion, la superoxyde dismutase, et la catalase. De ce fait ils sont responsables, en partie du stress oxydant (297, 298). Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs activités antioxydantes. Ils sont des piègeurs des radicaux libres, des chélateurs des ions métalliques et également des inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation des radicaux libres (201, 299, 300). Nos résultats confirment ces données et sont, en grande partie, similaires à ceux rapportés par KASHIF et al (2004) : ils ont trouvé que l'exposition des rats au stress diminue l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT, réduit le taux de glutathion mais, augmente celui de malondialdéhyde (MDA) par rapport au témoins. Par contre, le traitement par les antioxydants (vitamine E, C, et A) avant ou après l'exposition au stress augmente plutôt l'activité enzymatique de la SOD, de la CAT et le contenu cellulaire en glutathion et réduit dans l'autre côté les taux de MDA (301). Nos résultats et les résultats précédemment obtenus confirment l'effet anti-oxydant des flavonoïdes (302, 303, 304).

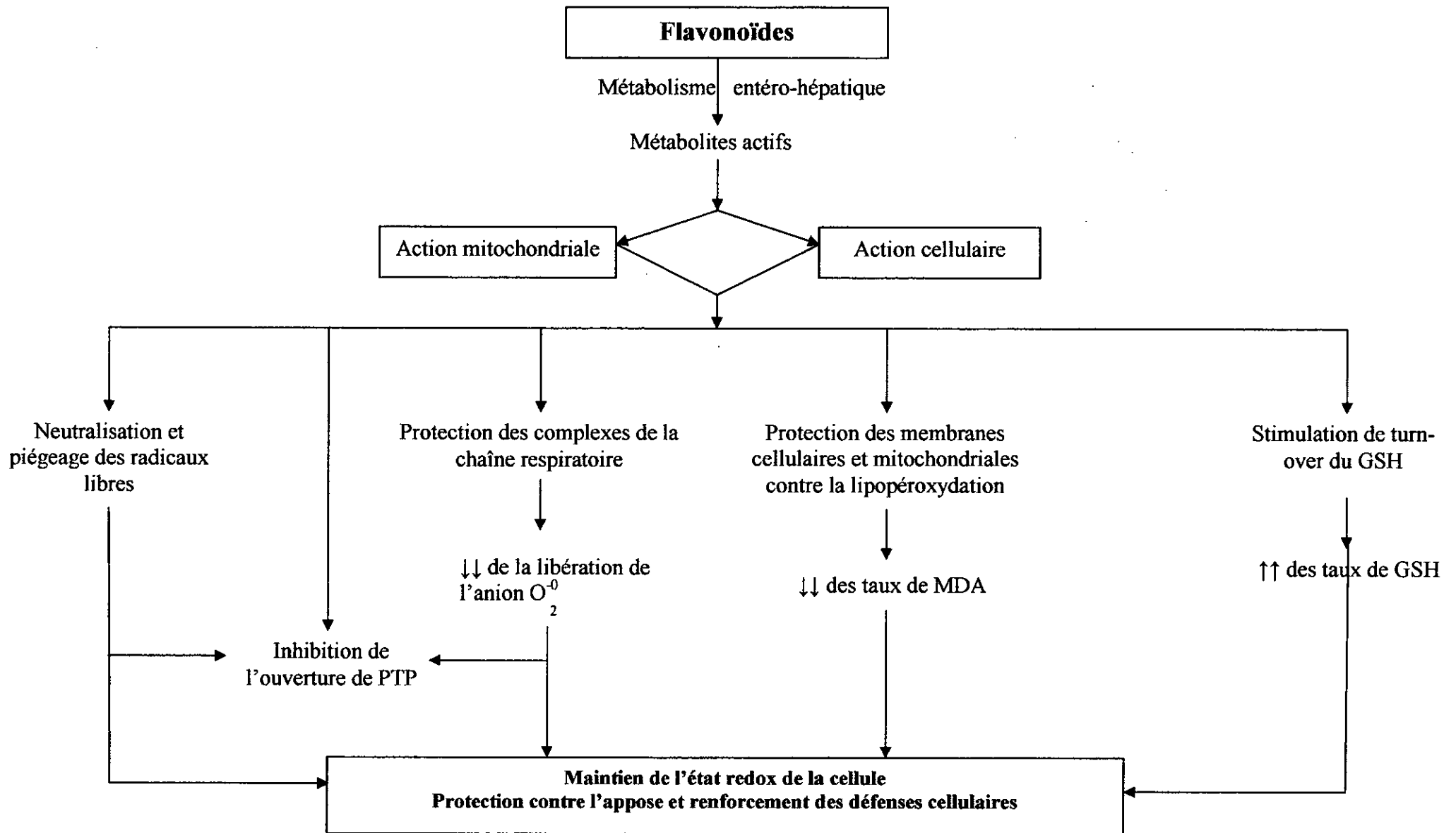
Le mécanisme d'action proposé pour l'effet pro-oxydant de la doxorubicine et l'effet anti-oxydant des flavonoïdes et des polyphénols en général de la propolis :

Notre étude nous a permis de proposer un mécanisme général par lequel la doxorubicine, l'extrait éthanolique et les glycosides flavoniques de la propolis interviennent respectivement dans l'induction, la prévention et la correction de stress oxydant. L'administration de la doxorubicine aboutit à la formation des métabolites réactifs essentiellement par les cyt P450 dans les microsomes. Ces derniers vont attaquer et peroxyder les membranes cellulaires et mitochondriales en conduisant à la libération massive de MDA, à l'altération de la chaîne de transfert des électrons qui sous cet état produit plus de ROS comme ils consomment le GSH et détruisent les enzymes antioxydantes tels que la SOD et la CAT. L'excès de ROS ainsi résultant conduit au stress et l'oxydation des groupements sulfidryles de pore de transition et par conséquent l'ouverture de ce dernier et la libération des facteurs proapoptotiques et par la suite l'apoptose qui se transforme en nécrose si la situation persiste.

L'administration des flavonoïdes conduit à la protection des membranes cellulaires et mitochondriales des effets radicalaires en réduisant de ce fait les taux de MDA. Cette protection est assurée soit par atténuation ou inhibition de la peroxydation lipidique par interruption des réactions en chaîne soit par captation des métabolites réactifs et des radicaux oxygénés qui provoquent cette peroxydation lipidique. La diminution des taux de radicaux libres, de malondialdéhyde, et des produits de la peroxydation lipidique protège le glutathion cellulaire et mitochondrial dont la synthèse protéique peut être induite par les flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent aussi agir directement sur les complexes de la chaîne respiratoire essentiellement le complexe III en limitant ainsi la libération des espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie. Les enzymes antioxydantes constituent une autre cible principale des flavonoïdes ; il est probable que ces molécules naturelles agissent soit par activation ou stimulation de l'enzyme soit par action au niveau génétique où ils induisent la synthèse protéique en augmentant ainsi l'activité enzymatique de ces enzymes. Le maintien de la balance pro-oxydants/antioxydants en faveur des antioxydants atténue l'oxydation des groupements sulfidryles de pore géant, l'ouverture de ce dernier et par conséquent l'apoptose.



Mécanisme proposé pour l'hépatotoxicité de la doxorubicine



Mécanisme de protection de la cellule hépatique par les flavonoïdes contre le stress

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

VI. CONCLUSION :

La mitochondrie constitue à la fois un site de production de radicaux libres oxygénés et de toxicité des médicaments anticancéreux aussi bien qu'une cible primaire des effets délétères de ces derniers. La protection des fonctions mitochondriales et des systèmes antioxydants tant que mitochondriaux que cellulaires par les molécules naturelles comme les flavonoïdes semble constituer une stratégie très intéressante dans la prévention de plusieurs pathologies graves.

Il ressort de notre travail qui vise à évaluer les capacités antioxydantes de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis que :

- Les rats expriment une bonne tolérance au traitement prolongé par l'extrait éthanolique et les glycosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg qui, n'induisent aucun signe de toxicité mais plutôt renforcent la protection de l'organisme contre les ROS produites à l'état physiologique.
- L'extrait éthanolique de la propolis possède un pouvoir antioxydant puissant. Cet effet était concentration - dépendant et plus important que celui de la quercétine reconnu pour leur effet scavenger remarquable, ce qui justifie l'utilisation de la propolis comme antioxydant naturel intéressant. Alors que, les hétérosides flavoniques sont des piègeurs faibles de radicaux libres.
- L'extrait éthanolique de la propolis ainsi que les glycosides flavoniques limitent aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* les effets délétères des ROS. Cette protection est reflétée par l'augmentation des taux de glutathion, de l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT, et la diminution des taux de MDA, effets inverses de la doxorubicine.
- En fin, cette étude a permis de mettre l'accent sur l'efficacité préventive et curative de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/Kg. Cela par inhibition et correction du stress oxydant induit par la doxorubicine administrée à 10 mg/Kg.

Les flavonoïdes, composés naturels largement répandus dans les légumes et les fruits, sont reconnus pour leurs activités antioxydantes. Les résultats obtenus ont permis de proposer des mécanismes par lesquels les flavonoïdes et les polyphénols en général expriment ces propriétés antioxydantes:

- Ils sont des piègeurs puissants des radicaux libres oxygénés, effet confirmé par le teste au DPPH.
- Ils inhibent la production des radicaux superoxydes par la mitochondrie essentiellement par le complexe III en protégeant ainsi les membranes cellulaires, mitochondriales de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes de la peroxydation protéique.
- Ils inhibent le gonflement mitochondrial et par la suite l'apoptose par empêcheement de l'oxydation des groupements thiols de pore de transition de perméabilité.
- En fin, ils protègent le glutathion cellulaire et mitochondriale, molécule antioxydante très intéressante, des effets néfastes des radicaux libres soit par prise de son rôle dans la captation de ces radicaux, soit par induction de sa biosynthèse.

Ces résultats nous permettent de prévoir les prochaines études à mettre en œuvre :

- Etude au niveau génétique pour démontrer si les flavonoïdes et les polyphénols en général agissent réellement par induction des gènes pour activer les stratégies de défenses cellulaires et mitochondriales.
- Etude sur des modèles de cellules en culture.
- Etude sur des cellules cardiaques qu'était programmée dans notre étude mais le manque de produits nécessaires annule sa réalisation.
- Etude polarographique pour bien préciser le site d'action des flavonoïdes de la propolis sur les complexes de la chaîne respiratoire.
- Détermination des concentrations prooxydantes de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis.
- Il sera important de faire l'identification, des études analytiques des flavonoïdes et des polyphénols en général de la propolis et d'exprimer la relation *structure-activité antioxydante* des flavonoïdes.
- En fin, il est nécessaire de faire des expériences par des molécules pures de la propolis (des acides phénols, des flavonoides, des terpènes...etc.) pour bien déterminer les classes de molécules potentiellement actives de la propolis.

ANNEXE

ANNEXE

A. Préparation des solutions tampons

❖ Préparation de la solution TSE (QSP 1000 mL) :

Sucrose ultrapur : 85.5g
Tris : 1.21 g
EGTA : 0.38g

pH = 7.2 à 4°C.

❖ Préparation de la solution TS (QSP 1000 mL):

Sucrose ultrapur : 85.6g
Tris : 1.2 g

pH= 7.2 à 4°C.

❖ Préparation du tampon swelling respirant (QSP 0.1 L) :

Sucrose ultapur: 8.6g
KH₂PO₄ : 68mg

pH = 7.2 à 25°C.

B. Préparation de la Solution hypotonique: QSP 100ml

KH₂PO: 0.49g
MgCl₂ : 047g

pH =7.2

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

1. Livia CH. Reactive oxygen species in cardiac signalling-from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Proceeding of Australian Physiological Societies* 2005; 36: 55-61.
2. Zmijewski, A. Landar, N. Watanabe, D.A. Dickinson, N. Noguchi, and V.M. Darley-Usmar. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochemical Society Transactions* 2005; 33:1385-1389.
3. DE Moffarts B, Kirschvink N, Pincemail J, and Lekeux P. Impact physiologique et pathologique du stress oxidant chez le cheval. *Ann Med Vet* 2005 ; 149 : 1-9.
4. Mario O. Analyse fonctionnelle d'homologues végétaux de Bax Inhibitor-1 et développement d'un modèle de mort cellulaire programmée induite par Bax chez des cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum*. Thèse de doctorat, Laval QUÉBEC, 2004, pp.
5. Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, and Jap BK. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bcl complex. *Science* 1998; 281: 64-71.
6. Yu CA, Xia D, Kim H, Deisenhoefer J, Zhang L, Kachurin AM, and Yu. Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bcl complex. *Biochim Biophys Acta L* 1998; 1365: 151-158.
7. Hsin-Chen LEE, Pen-Hui Yin, Ching-Wen CHI, and Yau-Huei Wei. Increase of mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 2000; 348: 425-432.
8. Morin D, Zini R, Tillement JP, and Berdeaux A. Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion: mitochondrial respiratory chain is a pharmacological target. *Letters in Drug Design and Discovery* 2004; 1: 279-284.
9. Overly CC, Rieff HI, and Hollenbeck PJ. Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 1996; 109: 971-980.
10. Yau-Huel Wei, and Hsin -Chen Lee. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227: 671-682.
11. Vellai T, and Vida G. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc R Soc London B: Biol Sci* 1999; 266: 1571-1577.
12. Guéry B, Choukroun G, Westeel PF, Noël LH, Cordonnier C, Rotig A, Munnich A, and Chauveau D. Néphropaties de l'adulte par mutation A324G de l'ADN mitochondrial. *Flammarion Médecine-Sciences—Actualités néphrologiques* 2002. pp 109-126.

13. **Scheffler IE.** Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliver Rev* 2001; 49: 3-26.
14. **Larsson NG, Wang G, and Wilhelmsson H.** Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genet* 1998; 18: 231-236.
15. **Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, and Howell N.** Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genet* 1999; 23: 147.
16. **Beckman KB, Ames BN.** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-581.
17. **Wu Z, Puigserver P, Anderson U, Zhang C, Adelman G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, and Spiegelman BM.** Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98: 115-124
18. **Robin ED, and Wong R.** Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cell. *J Cell Physiol* 1988; 136: 507-513.
19. **Virbasius JV, and Scarpulla RC.** Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1309-1313
20. **Leonard JV, and Schapira AH.** Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 2000; 355: 299-304.
21. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD.** Energy conversion: Mitochondria and chloroplasts. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (eds) *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing, Inc., New York 1994, p 653-720.
22. **Gilkerson RW, Selker JML, Capaldi RA.** The crystal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 2003; 546: 355-358.
23. **Paolo B, Luca S, Raffaele C, Valeria P, and Fabio DL.** Mitochondria and cell death. *Eur J Biochem* 1999; 264: 687-701.
24. **Giuseppe Petrosillo, Francesca M Ruggiero, and Giuseppe Paradies.** Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *The FASEB Journal* 2003; 17: 2202-2208.
25. **Smeitink J, van den Heuvel L, and DiMauro S.** The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 342-352.

26. **Jan AM Smeitink, Lambert WPJ Van den Heuvel, Werer JH Koopman, Leo JJ Neijtmans, Cristina Ugalde, and Peter HGM Willems.** Cell biological consequences of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Current Neurovascular Research* 2004; 1: 29-40.
27. **Etienne HM.** La voie de réduction dans la mutation des cytochromes de type c mitochondriaux : étude de la protéine CCMH d'Arabidopsis thaliana. Thèse de doctorat, *Louis Pasteur Strasbourg I* 2004, pp : 1-3.
28. **Robert S. Balaban, Shino N, and Toren F.** Review: mitochondria and aging. *J Cell* 2005; 120: 483-495.
29. **Maria LG, Milena MP, Annalisa B, Adrea B, Anna F, Carla B, Gabriella F, Giovanna PC, and Giorgio L.** Mitochondrial production of reactive oxygen species and role of coenzyme Q as an antioxidant. *Experimental Biology and Medicine* 2003; 228: 506-513.
30. **Weiss H, Friedrech T, Hofhaus G, and Preis D.** The respiratory chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur J Biochem* 1991; 197:563-576.
31. **Hirst J, Carroll J, Fearnely IM, Shannon RJ, and Walker J.** The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1604: 135-150.
32. **Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, and Korsmeyer SJ.** Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
33. **Jean-Claude Callen.** Biologie cellulaire des molécules aux organismes. Dunod, Paris 1999, pp 282-314.
34. **Morin D, Vassilios Papadopoulos, and Tillement JP.** Prevention of cell damage in ischemia: novel molecular targets in mitochondria. *Expert Opin Ther Targets* 2002 ; 6 : 315-334.
35. **Duchen MR.** Contributions of mitochondria to animal physiology : from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* 1999; 516: 1-17.
36. **Michel R Duchon.** Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 2004; 53: 96-102.
37. **Rizutto R, Printon P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Fuft RA, and Pozzan T.** Close contact with the endoplasmic reticulum as determinant of mitochondrial calcium responses. *Science* 1998; 280: 1763-1766.
38. **Kroemer G, Reed C.** Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6: 513-519.
39. **Du C, Fang M, Li Y, Li L, and Wang X.** Smac, a mitochondrial protein that promote cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42.

40. **Eyal G, Sean MA, and Craig BT.** Mitochondrial respiratory control is lost during growth factor deprivation. *PNAS* **2002**; 99: 12801-12806.
41. **Michael R. Duchen.** Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of Physiology* **2000**; 529: 57-68
42. **Rizzuto R, Bernardi, P, and Pozzan T.** Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of Physiology* **2000**; 529 : 37-47.
43. **Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, and Gunter K.** Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* **2000**; 28: 285-296.
44. **Christos C and Vera AV.** Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. *FEBS Journal* **2006**; 273: 433-450
45. **Frelton S.** Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN. These de doctorat, *Grenoble I* **2001**, pp
46. **Novelli GP.** Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol* **1997**; 48: 517-527.
47. **Kohen R, Nyska A.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods of their quantification. *Toxicol Phathol* **2002**; 30: 620-50.
48. **Castronovo V.** Alimentation et cancer. *Rev Med Liege* **2003** ; 58 : 231-239.
49. **Aurousseau B.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la production, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod Anim* **2002** ; 15 : 67-82.
50. **Sami Ahmad.** Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. *Kluwer Academic Publishers Boston Hardbound* **1995**.
51. **Andreyev Yu A, Kushnareva Yu E, and Starkov AA.** Review: mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* **2005**; 70: 200-214.
52. **Isabelle R.** Effet d'un traitement combiné au périndopril, inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, et d'un agent diurétique l'indapamine, sur la progression de l'insuffisance rénale chez le rat Zucker obèse. Thèse de doctorat, *Paris 6- Pierre et Marie Curie et Sherbrooke* **2005**, pp : 85-91.
53. **Alain Favier.** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique novembre-décembre **2003**, pp 108-115.

54. **Raha S, and Robinson BH.** Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 502-508.
55. **Halliwell B.** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-22.
56. **Richter C.** Reactive oxygen species and DNA damage in mitochondria. *Mutation Research* 1992; 275: 249-255.
57. **Tatoyan A, and Giulivi.** Purification and characterization of nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273: 11044-11048.
58. **Sies H.** Physiological thiols compounds exert pro-and-antioxidant effects respectively in iron- and copper dependent oxidation of human low density lipoproteins. *BBA* 1999; 1345: 215-221.
59. **Dardik R, Varon D, Tamarin I.** Homocystein and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation. *Thromb Haemost* 2000; 83: 338-344.
60. **Milane H.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres; étude et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat, *Louis Pasteur Strasbourg I* 2004, pp : 24.
61. **Sinha BK, Mimnaugh EG, and Myers CE.** Andryamicin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res* 1989; 49: 3844-3848.
62. **Coline H.** Effets des rayonnements ionisantes sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat, *Paris 6- Pierre et Marie Curie* 2005, pp : 43-58.
63. **Smith RAJ, Kelso GF, Blaikie FH, Porteous CM, Ledgerwood EC, Hughest G, James AM, Ross MF, Asin-Cayuela J, Cochemé HM, Filipovska A, and Murphy MP.** Using mitochondria-targeted molecules to study mitochondrial radical production and its consequences. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1295-1299.
64. **Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC, Cadenas E.** Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899:121-135.
65. **Kunduzova OR, Bianchi P, Parini A, and Cambon C.** Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2002; 448: 225-230.
66. **Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompert G, Cambon C, Parini A, and Frances B.** Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: 1460-1467.
67. **Mc Lennan HR, and Degli Esposti M.** The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32: 153-162.

68. **Miwa S, St-Pierre J, Partridge L, and Brand MD.** Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Rad Biol Med* **2003**; 35: 938-948.
69. **Gardner PR.** Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Meth Enzymol* **2002**; 349: 9-23.
70. **Tretter L, and Adam-Vizi V.** Generation of reactive oxygen species in the reaction catalysed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* **2004**; 24: 7771-7778.
71. **Starkov A, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Brown SE, Patel MS, and Beal MF.** Mitochondrial ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* **2004**; 24: 7779-7788.
72. **Liu Y, Fiskum G, and Schubert D.** Generation of reactive species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **2002**; 80: 780-787.
73. **Sipos, I, Tretter L, and Adam-Vizi V.** Quantitative relation ship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve mitochondria *J. Neurochem* **2003**; 84: 112-118.
74. **Genova, ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, and Lenaz G.** The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulphur cluster 2. *FEBS Lett* **2001**; 505: 364-368.
75. **Korshunov SS, Korkina OV, Ruuge EK, Skulachev VP, and Starkov AA.** Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* **1998**; 435: 215-218.
76. **Murphy MP.** Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends Biotechnol* **1997**; 15: 326-330.
77. **Michael P, and Christiaan L.** Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *Journal of Cerontologie: BIOLOGICAL SCIENCES* **2001**; 56:475-482.
78. **Degli Esposti M, Ballester F, Timoneda J, Crimi M, Lenaz G.** The oxidation of ubiquinol by the isolated 'Rieske' iron- sulphur protein in solution. *Arch Biochem Biophys* **1990**; 283:258-265.
79. **Yulia K, Anne NM, and Alexander A.** Complex I mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P+) oxidation-reduction state. *Biochem J* **2002** ; 368 : 545-553.
80. **Morin D, Thierry Hauet, Michael Spedding, and Tillement JP.** Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Advances Drug Delivery Review* **2001**.

81. **Herrero A, and Barja G.** Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and non synaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32: 609-615.
82. **Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, and Kim SH.** Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* 1998; 392: 677-684.
83. **St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, and Brand MD.** Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.
84. **Abdelghafour M.** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat, *LIMOGES 2003* ; pp 23-42.
85. **Gardner PR, Raineri I, Epstein LB, and White, CW.** Superoxide radical and ion modulate aconitase activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 13399-13405.
86. **Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, and Browne RH.** Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet* 1996 ; 13 : 43-47.
87. **Lenzen S, Drinkgern J, and Tiedge M.** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 463-466.
88. **Chen Z, and Lash LH.** Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylase and 2-oxo glutarate carriers. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 608-618.
89. **Raza H, Robin MA, Fang JK, and Avadhani NG.** Multiple isoforms of mitochondrial glutathione-S transferase and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 2002; 366: 45-55.
90. **Laurent C.** Effet d'un hydroperoxyde lipidique et de LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique de phospholipides plaquettaires. Thèse de doctorat, *Institut National des Sciences Appliquées de Lyon 2004*, pp : 59-73.
91. **Fujii J, and Ikeda Y.** Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional mammalian redox protein. *Redox Rep* 2002; 7: 123-130.
92. **Gohil K, Viguie C, and Stanley W.** Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol* 1988; 64: 115-119.

93. **Martensson J, Lai JC, and Meister A.** High affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7185-7189.
94. **Ernster L, and Dallner G.** Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995; 24: 195-204.
95. **Alleva R, Tomasetti M, Bompadre S, and Littaru P.** Oxidation of LDL and their subfractions: kinetic aspects and COQ 10 content. *Mol Aspects Med* 1997; 18: 105-112.
96. **Beyer RE, Segura-Aguilar J, Di Bernardo S, Cavazzoni M, Fato R, Fiorentini D, Galli MC, Setti M, Landi L, and Lenaz G.** The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of Coenzyme Q in membrane systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2528-2532.
97. **Takahashi T, Yamaguchi T, Shitashige M, Okamoto T, Kishi T.** Reduction of ubiquinone in membrane lipids by rat liver cytosol and its involvement in the cellular defense system against lipid peroxidation. *Biochem J* 1995; 309: 883-890.
98. **Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, and Passarella S.** Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J Biol Chem* 2000; 275: 37159-37166.
99. **Middleton E, and Kandaswami C.** Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1167-1179.
100. **Bellizzi MC, Franklin MF, Duthie GG, and Jamesco PT.** Vitamin C and coronary heart disease: the European paradox. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: 822-831.
101. **Halliwell B, Gutteridge JMC, and Cross CE.** Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
102. **Meagher EA, and FitzGerald GA.** Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 1745-50.
103. **Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH.** Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat Res* 1999; 423: 11-21.
104. **Wei YH.** Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 53-63.
105. **Kregel KC.** Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 2002; 92: 2177-2186.

106. **Davies MJ.** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 1151-1163.
107. **Kalous M, and Drahota Z.** The role of mitochondria in aging. *Physiol Res* 1996; 45: 351-9.
108. **Elliott Middleton, Jr. Chithan Kandaswami, and Theoharis C Theoharides.** The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacological Review* 2000; 52: 673-751.
109. **Myara J.** Vieillissement et stress oxydant: capacité de génotologie francilienne (cours de 1^{ère} année), 2002.
110. **Wojciech L, and Elzbieta S.** DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular and Molecular Biology Letters* 2003; 8: 391-413.
111. **Juurlink BHJ, and Patreson PG.** Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestion for pharmacological intervention and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med* 1998; 21: 309-334.
112. **Holgrim A.** Critical review of oxidative stress and aging. Cutler and Rodriguez Eds 2003, pp: 102-111.
113. **Pincemail J, Defraigne JO, and Limet R.** Oxidative stress in clinical situations-fact of fiction? *Eur J Anaesthesiol* 1996; 13: 219-234.
114. **Jenkins RR.** Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 670-674.
115. **Deby-Dupont G, Grulke S, Caudron I, Mathyhartert M, Benbarek H, Deby C, Lamy M, and Serteyn D.** Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radio-immunoassay and first results in septic pathologies. *Vet Immunol Immunopath* 1998; 66: 257-271.
116. **Marlin DJ, Johnson L, Kingston DA, Smith NC, Deaton CM, Mann S, Heaton P, Van V, Saunders K, Kydd J, and Harris PA.** Application of the comet assay for investigation of oxidative DNA damage in equine peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr* 2004; 134: 2133-2140.
117. **Young IS, Woodside JV.** Antioxidant in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186.
118. **Pelletier M, and Vallette FM.** Apoptose et maladies neurodégénératives. *La Lettre du Pharmacologue* 2001 ; 15 : 159-167.
119. **Lucie P.** Etude de la relation structure-fonction de la protéine BI-1 chez *Saccharomyces cerevisies*. Thèse de doctorat, Laval QUÉBEC EC 2005 , pp.

120. **Buendia B, Santa-Maria A, and Courvalin JC.** Cascade -dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 1999; 112: 1743-53.
121. **Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, and Cryns VL.** Caspase cleavage of vimentine disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* 2001; 8: 443-50.
122. **Klippel A, Tang J, Chu K, Mc Garry TJ, Kirshner MW, Kohts KK, Kwiatko Wski DJ, and Williams LT.** Caspase -3- generated fragment of gelsolin: effectors of morphological changes in apoptosis. *Science* 1997; 278:294-8.
123. **Tatton WG and Olanow CW.** Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 195-213.
124. **Lowe SW and Lin AW.** Apoptosis and cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-95.
125. **Trudeau JD, Duts JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, and Finegood DT.** Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 1-7.
126. **Kaufmann SH, and Hengartner MO.** Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 525-34.
127. **Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, and Wang X.** Bid, a Bcl 2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481-90.
128. **Ashkenazi A and Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1997; 281: 1305-8.
129. **Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, and Wang X.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Biol* 1999; 15: 269-90.
130. **Timothy S. Hiura, Ning Li, Roman Kaplan, Marcus Horwits, Jean-Clare Seagrave, and Andre E. Nel.** The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemical extracted from diesel exhaust particles. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 2703-2711.
131. **Xiaodong W.** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* 2001; 15: 2922-2933.
132. **Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Zamzami N, and Kroemer G.** Apoptosis inducing factor (AIF): a novel caspase independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 2002; 84: 215-22.
133. **Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Morits RL, Simpson RJ, and Vaux DL.** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53.

134. **Daugas E, Susin SA, Zamzami N.** Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 2000; 14: 729-739.
135. **Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, and Kroemer G.** apoptosis inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 2000; 476: 118-23.
136. **Ronald J.Sokol, Michael S. Straka, Rolf Dahl, Michael W. Devereaux, Baruch Yerushalmi, Eric Gumpright, Nancy Elkins and Gregory Everson.** Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatric Research* 2001; 49: 519-531.
137. **Arnaud BT, Laurent M, Didier D, Stéphane O, and Marie FP.** Les récepteurs périphériques des benzodiazépines. *Médecine Sciences* 2001 ; 17 : 458-464.
138. **Morin—Philchenkov A.** Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 432-444.
139. **Blanchard H, Koclandapani L, Mitt PRE, Di Marco S, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KL, and Grutter MG.** The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure* 1999; 7: 1125-33.
140. **Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Hendrickson RL, Tomaselli AG, and Watenpugh KD.** The atomic-resolution structure of human caspase -8, a key activator of apoptosis. *Structure* 1999; 7: 1135-43.
141. **Chang HY, and Yang X.** Proteases for cell suicide: function and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 821-46.
142. **Creagh EM, and Martin SJ.** Caspases: cellular demolition expert. *Biochemical Society Transactions.* 2001; 6: 696-702.
143. **Xia C, Xu Z, Yuan X, Uematsu K, You L, Li K, Li L, McCormick F, and Jablons DM.** Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 687-694.
144. **Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Fujikawa K, Murata K, Nakano T.** Cellular FLICE /caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2003; 83: 1033-43.
145. **Villa PG, Henzel WG, Sensenbrenner M, Henderson CE, and Pittman B.** Calpain inhibitors, but not caspases inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci* 1998; 111: 713-22.
146. **Adrain C, and Martin SJ.** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 390-7.

147. **Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Henser JE, Wang X, and Key CW.** Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol Cell* **2002**; 9: 423-32.
148. **Shi Y.** Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase- 9. *Structure* **2002**; 10: 285-8.
149. **Borner C.** The Bcl-2 protein family: sensors and chek points for life-or- death decision. *Mol Immunol* **2003**; 39: 615-47.
150. **Parone PA, James D, and Martinou JC.** Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* **2002**; 84: 105-11.
151. **Boise LH, and Thampson CB.** Bcl-xL can inhibit apoptosis in cell that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**; 94: 7359-64.
152. **Hegde R, Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandez-Alnemri T, and Alnemri ES.** Bik, a BH3 –containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* **1998**; 273: 7783-6.
153. **Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, and Tsujimoto Y.** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95: 14681-6.
154. **Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, and Green DR.** The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Natl Cell Biol* **2000**; 2: 156-62.
155. **Francois-Marie V, and Philippe J.** Modification de la perméabilité membranaire mitochondriale au cours de l'apoptose : ouverture ou repture? *Medicine Sciences* **2000** ; 16 : 261-264.
156. **Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Vecchiet J, Felzani G, Lezza AMS, Cantatore P, Gadaleta MN.** Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* **30**:1223–1233, **2001**.
157. **Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, and Simon RP.** Induction of caspase -3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampe after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* **1998**; 18: 4914-28.
158. **Qian T, Nieminen AL, Herman B, and Lemasters JJ.** Mitochondrial permeability transition in PH-dependant reperfusion injury to rat hepatocytes. *American Journal of Physiology* **1997**; 273: 1783-92.
159. **Yoshimoto T, and Siesjo BK.** Post treatment with immunosuppressant cyclosporine A in transient focal ischemia. *Brain Res* **1999**; 839: 283-91.

160. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, and Herman B. The mitochondrial permeability in salicylate toxicity to cultured rat hepatocytes: implication for the pathogenesis of Reye's syndrome. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 159-65.
161. Jorg BS, Jorg L, Jan S, and Johannes D. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4904-4911.
162. Mytlineous C, Werner P, Molinari S, Di Rocco A, Cohen G, and Yahr MD. Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1994; 8: 223-238.
163. Kridge D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, and Shapira AH. Platelet mitochondrial function in Parkinson disease. The royal kinds and queens Parkinson disease research group. *Ann Neurol* 1992; 32: 782-8.
164. Reichmann H, Florke S, Hebenstreit G, Schrubar H, and Riederer P. Analysis of energy metabolism and mitochondrial genome in post-mortem brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurol* 1993; 240: 377-380.
165. Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, and Shapira AH. Mitochondrial defects in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 459-71.
166. Morgan-Hughes JA, and Hanna MG. Mitochondrial encéphalomyopathies: The enigma of genotype versus phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 125-45.
167. Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, and Rotter JI. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993; 4: 289-94.
168. Mirabella M, Di Giovanni S, Selvestri G, Tonali P, and Serveidei S. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain* 2000; 123: 93-104.
169. Lee JP, Palfrey HC, Bindokas VP, Ghadge GD, Ma L, Miller RJ, and Roos RP. The role of immunophilins in mutant superoxide dismutase 1-linked FALS. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3251-6.
170. Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, and Green DR. P53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 7337-42.
171. Mastrogiovanni F, LaMarche J, Dozic S, Lindsay G, Bettendorff L, Robitaille Y, Schut L, and Kish SJ. Immunoreactive levels of alpha-ketoglutarate dehydrogenase subunits in Friedreich's ataxia and spinocerebellar ataxia type 1. *Neurodegeneration* 1996; 5: 27-33.

172. **Matsuishi T, Sakai T, Naito E, Nagamitsu S, Kuroda Y, Iwashita H, and Kato H.** Elevated cerebrospinal fluid lactate/pyruvate ration in Machado-Joseph disease. *Acta Neurol Scand* 1996; 93: 72-75.
173. **Priller J, Scherzer CR, Faber PW, MacDonald ME, and Young AB.** Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann Neurol* 1997; 42: 265-9.
174. **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3^{ème} éd). Paris : Editions médicales internationales, édition Tec & Doc Lavoisier, 1999, pp 1120.
175. **Nathalie F, Thomas E, Carsten K, Gottfried W, Enrico M, and Markus K.** Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and Arabidopsis cell culture vacuoles. Energization occurs by H⁺-antiport and ATP-binding cassette- type mechanisms. *Plant Physiol* 2002; 128: 726-733.
176. **Uwe W, Sabine K, Mathias DB, and Hannelore D.** Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research* 2000; 60: 3823-3831.
177. **Vanessa C, Christian M, Catherine B, Nicole C, Herve V, Christian D, and Christian R.** The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the native of the compound. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: 980-988.
178. **Paul K, Jorma K, Ritva J, Harri R, Markku H, Antti R, Timo H, and Arpo A.** Flavonoids intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76: 560-568.
179. **Havsteen BH.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96: 67-202.
180. **Kuntal M, Kakali M, Arunava G, Satta BP, and Pulko KM.** Enhanced therapeutic benefit of quercetin-phospholipid complex in carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats: a comparative study. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 2005; 4: 84-90.
181. **Elisabeth S.** The flavonoid quercetin and its potential as neuroprotectant in the therapy of acute traumatic CNS injury: an experimental study. Thèse de doctorat, université de Saskatchewan 2004; pp 61-66.
182. **Harborne JB and Williams CA.** Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55: 481-504.
183. **Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, and Remezy C.** Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glycosides in rats. *J Nutr* 2001; 131: 2109-2114.
184. **Manach C, Scalbert A, Morand C, Remezy C, and Jimenez L.** Polyphenols sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-747.

185. Felgines C, Texeir O, Morand C, Manach C, Scalbert A, Regarat F, and Remezy C. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: 1148-1154.
186. Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, and Osawa T. Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 3217-3224.
187. Hollman PC, Bijlsman MN, Van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, and Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids in glycosides in man. *Free Radical Res* 1999; 31: 569-573.
188. Williams RJ, Spencer JC, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidant or prooxidant molecules? *Free Radical Biol Med* 2004; 36: 838-849.
189. Chu H, Di J, Xu Y, Hu Y, and Tu Y. The sensitive determination of flavonoids by electrochemiluminescence. *Chemistrymag* 2004; 6: 95-98.
190. Guohua C, Emin S, and Ronald LP. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 1997; 22: 749-760.
191. Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, Fernandez ML, Buslos G, Paya M, Gunasegaran R, and Alcaraz MJ. Effect of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory response in mice. *Life Sci* 1994; 54:333-338.
192. Rump AF, Schussler M, Acar D, Cordes A, Ratke R, Theisohn M, Rosen R, Klaus W, and Fricke U. Effects of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit's hearts. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 603-611.
193. Elangovan V, Sekar N, and Govindasamy S. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Lett* 1994; 87:107-113.
194. Greenaway W, May J, Scaysbrook T, and Wkately FR. Identification by gas chromatograph-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z Naturforsch* 1991; 46: 111-21.
195. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, and Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1193-96.
196. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramely PM, and Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995; 22: 375-383.
197. Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, and Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interactions with biomembranes. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 1911-1922.

198. Van Acher SABE, Van den BDJ, Tromp MNJL, Griffion DH, Van BWP, and Bast A. Structure aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 331-342.
199. Dugas AJ, Castaneda AJ, Bonin GC, Price KL, Fisher NH, Winston GW. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationship. *J Nat Prod* 2000; 63: 327-331.
200. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000 ; 63 : 1035-42.
201. Rice-Evan CA, Miller NJ, Pagnana G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 20 : 933-56.
202. Vassya Bankova. Recent trends and important development in propolis research. *eCAM* 2005; 2 : 29-32.
203. Ivan Kosalec, Marina Bakmaz, and Stjepan Pepeljnjak. Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharm* 2003; 53: 275-285.
204. Antonio S, Erica WT, Giuseppina N, and Dejair M. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *eCAM* 2005; 2: 33-38.
205. Chia-Nan Chen, Chia-Li Wu, and Jen-Kun Lin. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology* 2004; 67: 53-66.
206. Erica WT, Giuseppina N, Renata -MSA-Meira, Dejair M, and Antonio S. Plant origin of green propolis: bee behaviour, plant anatomy and chemistry. *eCAM* 2005; 2: 85-92.
207. Bankova V, Milena P, Stefan B and Anna-Gloria S. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch* 2002; 57: 530-533.
208. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, and Houcine S. Propolis from Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z Naturforsch* 2000; 55: 790-3.
209. Bankova V, and Marcucci MC. Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World* 2000; 81: 182-8.
210. Bankova V, Christov R, Kujungiev A, Marcucci MC, and Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Nat Sect C Biosci* 1995; 50: 167-172.
211. Banskata AH, Tezuka Y, and Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytoth Res* 2001; 15: 561-571.
212. Murat K, Sardar K, and Semra K. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z Naturforsch* 2002; 57: 905-909.

213. **Maria I, Nieva Moreno, Maria I Isla, Antonio R Sampietro, and Marta A.** Comparison of free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 71: 109-114.
214. **Masamitsu S, Satomi C, Nobutaka M, Satoshi M, Hiroishi N, and Hideaki H.** Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *eCAM* 2005; 2: 201-207.
215. **Luis AS, Fernando A, Roberto MA, Margarita GC, Jaume B, Carlos C, and Guillermo SH.** Biologically active compounds from Chilean propolis. *Bol Soc Chil Quim* 2000; 45.
216. **Amoros M, Simoes CMO, Girre L, Sauvager F, and Cormier M.** Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* 1992; 55: 1730-1732.
217. **Chen CN, Weng MS, Wu CL, and Lin JK.** Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *eCAM* 2004; 1: 175-85.
218. **Isla MI, Moreno MIN, Sampietro AR, and Vattuone MA.** Antioxidant activity of Argentina propolis extracts. *J Ethnopharm* 2001; 76: 165-170.
219. **Gonzales R, Corcho I, Ramirez D, Rodriduez S, Ancheta O, Merino N, Gonzales A, and Pascual C.** Hepatoprotective effect of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rat. *Phytoth Res* 1995; 9: 114-117.
220. **Boharun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luyckx M, and Gasin M.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch /Drug Res* 1996; 1-6.
221. **Rustin P, Chrétien D, Bourgeon T, Gérard B, Rotig A, Saudubray JM, and Munnich A.** Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228: 35-51.
222. **Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Ronald R.** Protein measurement with the folin -phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 183: 265-275.
223. **Iqbal M, Som DS, Yasumasa O, Masayoshi F, and Shigero O.** Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddy male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and toxicology* 2003; 92: 33-38.
224. **Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Le Ridant A.** Structure-property relationship of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 113-120.

225. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Add Biochem* 1979; 95: 351-358.
226. Ligeret H, Barthelemy S, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, and Morin D. Effect of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 919-929.
227. Kristal BS, Park BK, and Yu BP. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 1996; 271: 6033-6038.
228. Claiborne A. Catalase activity. In: CRC handbook of methods for oxygen radical research. Ed Greenwald RA, CRC Press, Boca Raton 1985; 283-284.
229. Beauchamp C, Fridovich I. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem* 1971; 44: 276-287.
230. Ellman GL. Plasma antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 1959 ; 82 : 70-77.
231. Morin D, Barthelme S, Zini R, Labidalle S, and Tillement JP. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Letters* 2001; 495: 131-136.
232. Marc WF, Catherine BC, Manisha P, Benett VH, and Sten O. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions* 2005; 5: 94-111.
233. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408: 239-47.
234. Pard JW and Floyd RA. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxy guanine in DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 1992; 12: 245-250.
235. Halliwell B, and Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
236. DeFeudis FV, Papadopoulos V, and Drieu K. Gingo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17: 405-417.
237. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Xiong Q, Hase K, Tran KQ, Tanaka K, Saiki J, Kadota S. Hepatoprotective effect of commbretum quadrangular and its constituents. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 456-460.
238. Malaya G, Upal KM, Thangaval SK, Periyasamy G, and Ramanathan SK. Antioxidant and hepatoprotective effect of Bauhinia racemosa against paracetamol and carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 2004; 3: 12-20.

239. Liu CF, Lin CH, Lin CC, Lin YH, Chen CF, Lin CK, and Lin SC. Antioxidant natural products protect against Econazole-induced liver injuries. *Toxicology* 2004; 196: 87-93.
240. Kang YJ, Chen Y, and Epstein PN. Suppression of doxorubicine cardiotoxicity by overexpression of catalase in the hearth of transgenic mice. *J Biol Chem* 1996; 271: 12610-12616.
241. Arola OJ, Sraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen M, and Voipio-Pulkki LM. Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 1789-1792.
242. Yamaoka M, Yamagushi S, Suzuki T, Okuyama M, Nitobe J, Nakamura N, Mitsui Y, and Tomoike H. Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 881-889.
243. Elimadi A, Bouillot L, Sapena R, Tillement JP, and Morin D. Dose related inversion of cinnarizine and flunarizine effects on mitochondrial permeability transition pore. *Eur J Pharmacol* 1998; 348: 115-121.
244. Bridger S. Deaths from low dose paracetamol poisoning. *Br Med J* 1998; 316: 1724-1725.
245. Nohl H, Gille L, and Staniek K. The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Z Naturforsch* 1998; 53: 279-285.
246. Nohl H. A novel superoxide radical generator in heart mitochondria. *FEBS Lett* 1987; 214: 269-273.
247. Geromel N, Kadhom I, Cebalos-Picot O, Ouari A, Polidori A, Munnich A, Rotig P, and Rustin S. Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1221-1228.
248. Ross JA, and Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Ann Rev Nutr* 2002; 22: 13-34.
249. Da Sliva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J. Quercetin metabolites inhibit copper ion induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett* 1998; 430: 405-8.
250. Kumazawa S, Shimoi K, Hayashi K, Ishii T, and Hamasaka T. Identification of metabolites in plasma and urine of Uruguay propolis- treated rats. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3083-3088.
251. Pascual C, Gonzalez R, and Toricella RG. Scavenging action of propolis extracts against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 2004; 41: 9-13.

252. Masamitsu S, Satomi C, Nobutaka M, Satoshi M, Hiroichi N, and Hideaki H. Neuroprotection by brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2: 201-207.
253. Rubia C, Sandra RG, Waldiceu AV, José RJ, Antonio CS, and Maria JVF. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in defferent topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS Pharm Sci Tech* 2005.
254. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants free *Radical Biol Med* 1990; 9: 19-21.
255. Zini R, Morin C, Bertelli AA, and Tillement JP. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25: 87-97.
256. Hoi YL, PO YC, Miche KTP, and Kam MK. A Yang-Invigorating Chinese herbal formula enhances mitochondrial functional ability and antioxidant capacity in various tissues of male and female rats. *Rejuvenation research* 2005; 8: 238-247.
257. Salvioli S, Bonafe M, Capri M, Monti D, and Franceschi C. Mitochondria, aging and longevity, a new perspective. *FEBS Lett* 2001; 492: 9-13.
258. Kelso GF, Porteous CM, Hughes G, Ledgerwood EC, Gane AM, Smith RA, and Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 2002; 959: 263-274.
259. Si Eun L, Eun MJ, Jeong HK. Antioxidant activity of extracts from Euryale ferox seed. *Experimental and molecular medicine* 2002; 34: 100-106.
260. Inal ME, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet-induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 2000; 154: 21-29.
261. Cengarle L, Carta A, and Tilloca G. Antioxidant activity of Sardinian propolis. *Riv Ital Sostanze Grasse* 1998; 75: 551-557.
262. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol* 1998, 36:347-363.
263. Kujumgiev A, Tsuetkova I, and Bankova V. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographical origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 35-340.
264. Matsushige K, Basnet P, and Kadota S. Potent free radical scavenging activity of dicaffeoyl quinic acid derivatives from propolis. *J Trad Med* 1996; 13: 217-228.
265. Santos AC, Uyemura SA, Lopes JLC, Bazon JN, Mingatto FE, and Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Rad Biol Med* 1998; 24: 1455-1461.

266. Patricia IO, Alejandra GE, Sandra VV, Carl LK, and Sarg F. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical and Developmental Immunology* 2005; 12: 19-25.
267. Van Acker SABE, Van Den Berg D, Tromp MNJI, Griffioen DH, WP Van Bennkom, Van Der Vijgh WJF, and Bast A. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 331-342.
268. Antonio CS, Sergio AU, João LCL, José NB, Fabio EM, and Carlos C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; 24: 1455-1461.
269. Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, and Fillastre JP. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide, and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie* 2004; 7: 59-67.
270. Sies H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91: 31-38.
271. Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 1991; 42: 569-605.
272. Gunter TE, and Pfeiffer DR. Mechanism by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology* 1990; 258: 755-786.
273. Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJH, Vercesi AE. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{+2} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 479-486.
274. Denton RM, and McCormack JG. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 1980; 199: 1-8.
275. Jian L, Riyi S. Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochemistry International* 2005; 46: 243-252.
276. Takeyama N, Matsuo N, and Tanaka T. Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca^{+2} - dependent inner membrane permeability transition. *Biochem J* 1993; 249: 719-725.
277. Bhaumik S, Anjum R, Rangarai N, Pardhasaradhi BV, Khar A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS Lett* 1999; 456: 311-314.
278. Kuo M, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317: 95-100.

279. Simon A, Allais DP, Durox JL, Basly JP, Durand-Fontanier S, Delage C. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. *Cancer Lett* 1998; 129: 111-116.
280. Xin-Jian W, Zhi-Bo W, Jian-Xing X. Effect of salvianic acid A on lipid peroxidation and membrane permeability in mitochondria. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 97: 441-445.
281. Aust SD, Svingen BA. Free radical in biological systems. Acad. Press. London, 1985, 1-28.
282. Guemouri L, Yues A, and Herbert B. Biological variability of SOD, CAT and GPx in blood. *Clin Chem* 1991; 37: 932-937.
283. April CC, Sharon LP, Amie JD, Tracey P, and Christiaan L. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxyde dismutase activity and Bcl-2: Ba ratio. *Cancer Research* 2002; 62: 4592-4598.
284. Levine SA, and Kidd PM. Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California Eds A. *Biocurrents division*. 1996.
285. Mena P, Maynar M, Gutierrez JM. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. *Int J Sport Med* 1991; 12: 563-566.
286. Paul SB, Stanley BD, Dale AP, and Victor DU. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Rad Biol Med* 2002; 32: 1220-1228.
287. Murley JS, Kataoka Y, Hallhan DE, Robert JC, and Grdina DJ. Activation of Nf-kappaB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1426-1439.
288. Metodieva D, Jaiswal AK, Cenas N, Dikancaite E, and Segura A. Quercetin may act as cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 107-116.
289. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, and Mayo JCUH. Neurohormone melatonin prevents cell damage; effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10: 882-890.
290. Lopez-Larzo M, Martin-Cordero C, and Ayuso MJ. Two new flavonol glycoside as DNA topoisomerase I poison. *Z Naturforsch* 2000; 55: 898-902.
291. Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-lavier MC, and Suschetet M. Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors* 2000; 12: 1-4.
292. Hegazi AG, Abd El Hady FK. Egyptian propolis: antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis Reclaimed lands. *Z Naturforsch* 2002; 57: 395-402.

293. **Steele VE.** Current mechanistic approaches to the chemoprevention of cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 78-81.
294. **Radi R, Beckman JS, and Freeman BA.** Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481-487.
295. **Jollow DJ.** Glutathione thresholds in reactive metabolite toxicity. *Arch Toxicol Suppl* 1980; 3:95-110.
296. **Leeuwenburgh C, Ji LL.** Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316:941-949.
297. **Stoyanovsky DA, Wu D, and Cederbaum AI.** Interaction of 1-hydroxymethyl radical with glutathione, ascorbic acid and alpha tocopherol. *Free Radiv Biol Med* 1998; 24: 132-138.
298. **Puntarulo S, Stoyanovsky DA, and Cederham AI.** Interaction of 1-hydroxymethyl radical with antioxidant enzymes. *Arch Biochem Biophys* 1999; 372: 355-359.
299. **Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van-Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, and Vanden BJ.** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxyde scavengers. *J Nat Prod* 1998; 61: 71-76.
300. **Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, and Gaydou EM.** Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 35-43.
301. **Kashif SM, Zaidi R, and Naheed B.** Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta* 2004; 340: 229-233.
302. **Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinai N, and Hirota M.** Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett* 1997; 92: 1-7.
303. **Wilson DW, Metz HN, Graver LM, and Rao PS.** Direct method of quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. *Clin Chem* 1997; 43: 1982-1984.
304. **Ashwani K, Vipin B, and Bansal MP.** Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defense system and lipid peroxidation in cigarette inhaling mice. *BMC Biochemistry* 2001; 2: 14-20.

NOM
ROUIBAH

PRENOM
Hassiba

Date de soutenance
2 juillet 2006

ETUDE COMPAREE IN VIVO ET IN VITRO DES EFFETS D'UN TRAITEMENT PROLONGE PAR LES FLAVONOIDES DE LA PROPOLIS ALGERIENNE SUR LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES HEPATIQUES ET CARDIAQUES DE RAT

RESUME

Le traitement du cancer par les médicaments anticancéreux est limité par leur toxicité dont le mécanisme suggéré est la génération de ROS. Par ailleurs, la propolis, une substance très riche en flavonoïdes et en possibilités thérapeutiques, possède une activité anticancéreuse et antioxydante remarquable. Le but de notre travail est d'évaluer en premier lieu l'effet antioxydant *in vitro* de l'extrait éthanolique et des hétérosides flavoniques de la propolis à différentes concentrations sur les mitochondries et les cellules hépatiques de rat, et en deuxième lieu l'effet préventif, curatif ainsi que l'effet à long terme des extraits. *In vitro*, l'extrait éthanolique exprime un effet piègeur de ROS très remarquable même à faibles concentrations, alors que les hétérosides flavoniques sont plutôt actifs à fortes concentrations. L'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis diminuent la production de l'anion superoxyde, le taux de MDA cytosolique et mitochondrial, augmentent l'activité enzymatique de la SOD, de la CAT mitochondriales et cytosoliques ainsi que le taux du glutathion, et en fin inhibent le gonflement mitochondrial. Ces effets sont aussi obtenus *in vivo* chez les rats traités par les extraits en association à la doxorubicine ou les extraits seuls pendant deux mois. Ces résultats sont inversés chez les rats traités par la doxorubicine seule. Le traitement par l'extrait éthanolique et les hétérosides flavoniques de la propolis à long terme n'expriment aucune toxicité mais renforcent plutôt les capacités de défense antioxydantes. Les flavonoïdes et les polyphénols en général semblent agir par la protection de la cellule et de la mitochondrie d'une part, par piégeage de ROS et inhibition de leur synthèse et d'autre part, par protection et activation des molécules antioxydantes.

Mots clefs : flavonoïdes, à long terme, mitochondrie, préventif, SOD, CAT, anion superoxyde, doxorubicine, rat.

SUMMARY

Cancer therapy with anti-cancer drugs is limited by their toxicity. It has been suggested that doxorubicin-induced free radical generation can be involved. In addition, the propolis, a substance very rich in flavonoids and therapeutic possibilities, has a great anti-cancer and antioxidant activity. The purpose of our study is to evaluate initially the antioxidant effect *in vitro* of the ethanolic extract and flavonic glycosids of the propolis with various concentrations on the mitochondria and the hepatic cells of rat and, in second place the preventive, curative as well as the long-term effect. *In vitro*, the ethanolic extract of propolis expresses a very remarkable scavenger effect even with low concentrations, whereas flavonic glycosids are rather active at high concentrations. The ethanolic extract and flavonic glycosids of propolis decrease the production of the anion superoxyde, the rate of cytosolic and mitochondrial MDA, increase the enzymatic activity of cytosolic and mitochondrial SOD and CAT as well as the rate of the glutathione and, at the end inhibit mitochondrial swelling. These effects are also obtained *in vivo* in the rats treated by the extracts in association with the doxorubicin or the extracts alone for two months. These results are reversed in the rats treated by the doxorubicin only. The treatment by the ethanolic extract and flavonic glycosids of propolis at a long-term does not express any toxicity but reinforce rather the antioxidant capacities of defence. Flavonoids and polyphenols in general seem to act on the first hand, by the protection of the cell and mitochondrion, by trapping of ROS and inhibition of their synthesis and on the other hand, by protection and activation of the antioxidant molecules.

Key-words: flavonoids, long term, mitochondrion, preventive, SOD, CAT, superoxyde anion, doxorubicin, rat.

ملخص

إن علاج السرطان بواسطة الأدوية المضادة للسرطان ممدودة لما يعرف لهذه الأدوية من ممية ناتجة عن تكوين الجذور الأكسوجينية الحرة. من جهة أخرى فإن الدنج وهي مادة غنية جدا بالفلافونويدات تملك خصائص مضادة للسرطان والأكسدة. إن الهدف من وراء بحثنا هذا هو تقدير التأثير خارج خلوي للمستخلص الإيثانولي ومستخلص السكريات الفلافونية لمادة الدنج بتركيز مختلفة أولاً. تم تقدير التأثيرين العلاجي والوقائي وكذا التأثير طويل المدى لهذه المستخلصات. بالنسبة للتجارب المجراة خارج خلوي فإن المستخلص الإيثانولي يبدي تأثير جد صياد للجذور الأكسوجينية الحرة حتى عند جرع ضعيفة. إن المستخلصات المدروسة تقوم بخفض كل من كمية الأيونين المؤكسد، معدل السمالونالدهيد السيتوزولي، الميتوكوندري كما تقوم برفع الفعالية الأنزيمية السوبروكسيدديسموتاز، الكاتالاز وكذا معدل الفلوطاتيون وأخيراً تثبط الانتفاخ الميتوكوندري. ولقد حصلنا على هذه النتائج داخل خلوي أيضاً عند الجرذان المعالجة بواسطة المستخلصات لوحدها أو مع الدوكسوروبيسين وذلك لمدة شهرين. أما النتائج المحصل عليها عند معالجة الجرذان بالدوكسوروبيسين لوحدها كانت معاكسة للأولى. إن المعالجة طويلة المدى بمستخلصات الدنج لم تظهر أية سمية بل تقوي القدرات الدفاعية المضادة للأكسدة. يبدو أن الفلافونويدات تعمل على حماية الخلية و الميتوكوندري عن طريق اصطياد الجذور الحرة و تثبيط إنتاجها من جهة و تثبيط الجزيئات المضادة للأكسدة من جهة أخرى.

الكلمات المفتاحية: فلافونويدات، طويلة المدى، ميتوكوندري، وقائية، سوبروكسيدديسموتاز، كاتالاز، دوكسوروبيسين، جرذان.