

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université de JIJEL – Faculté des sciences
Département de Biologie



Mémoire



Pour obtenir le diplôme de Magister en biologie

Option : PHYTOPHARMACOLOGIE

Présenté par

Wided KEBSA



EFFET DES FLAVONOÏDES DE LA PROPOLIS ALGÉRIENNE SUR LE STRESS OXYDATIF MITOCHONDRIAL

Soutenu publiquement : Le 02 Juillet 2006

Devant le Jury :

Dr. E. LEGHOUCI	M.C	Université de Jijel	PRESIDENT
Dr. M. LAHOUEL	M.C	Université de Jijel	RAPPORTEUR
Dr. M.R. DJEBBAR	Pr.	Université de Annaba	EXAMINATEUR
Dr. H. DJEBBAR	M.C	Université de Annaba	EXAMINATRICE
Dr. N. ABIDLI	M.C	Université de Constantine	EXAMINATRICE



615/30

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université de JIJEL – Faculté des sciences
Département de Biologie



Mémoire

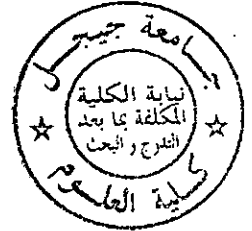


Pour obtenir le diplôme de Magister en biologie

Option : PHYTOPHARMACOLOGIE

Présenté par

Wided KEBSA

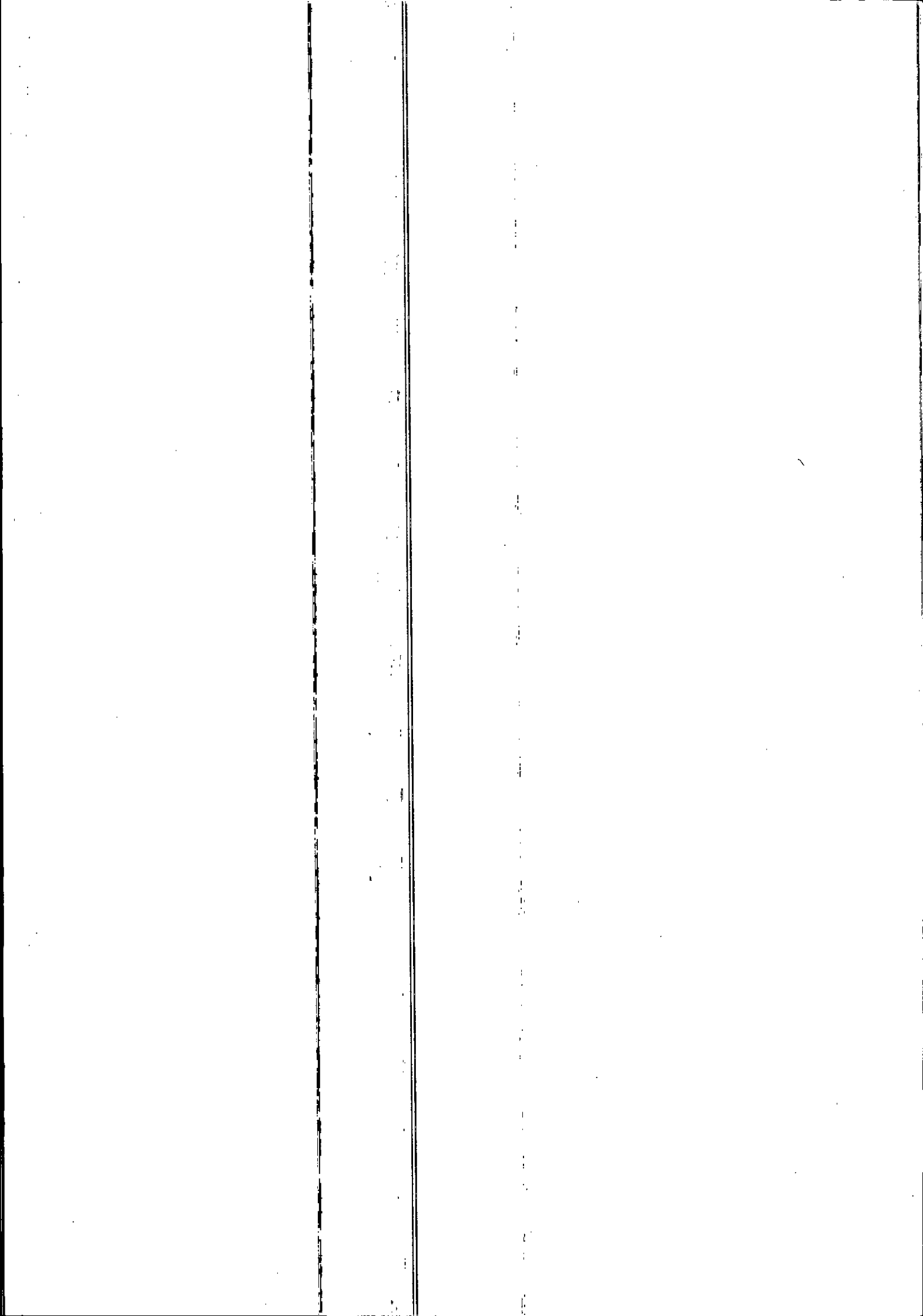


EFFET DES FLAVONOÏDES DE LA PROPOLIS ALGÉRIENNE SUR LE STRESS OXYDATIF MITOCHONDRIAL

Soutenu publiquement : Le 02 Juillet 2006

Devant le Jury :

Dr. E. LEGHOUCHI	M.C	Université de Jijel	PRESIDENT
Dr. M. LAHOUEL	M.C	Université de Jijel	RAPPORTEUR
Dr. M.R. DJEBBAR	Pr.	Université de Annaba	EXAMINATEUR
Dr. H. DJEBBAR	M.C	Université de Annaba	EXAMINATRICE
Dr. N. ABIDLI	M.C	Université de Constantine	EXAMINATRICE



*Si le chercheur allait à son travail sans
Aucune idée 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 soient 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

*C'est dans l'effort que l'on trouve la
Satisfaction et non dans la réussite. Un plein
effort est une pleine victoire.*

Gandhi

Remerciement

J'aimerais en tout premier lieu remercier mon Dieu le tout puissant qui ma donné la capcité à fin d'ccomplir ce modeste travail et qui m'a toujours guidé vers le bon chemin.

Puis J'aimerais adresser ma plus sincère gratitude à mon directeur de recherche, monsieur Lahouel Mesbah, maître de conférence de l'université de Jijel, un homme de science et de qualité passionné, dévoué et perspicace qui a à cœur la formation et la réussite de ses disciples. Mille mercis monsieur pour votre disponibilité, vos conseils, votre soutien et votre confiance inébranlable qui m'ont beaucoup appris. Votre esprit de synthèse, votre érudition restent pour moi un exemple à suivre. Merci infiniment monsieur d'avoir cru en moi, même si cela n'a pas toujours été facile.

Je suis très reconnaissante envers le docteur Leghouchi Essaid, maître de conférences et doyen de la faculté des sciences de l'université de Jijel, d'abord pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et confié ce travail sans cesse tout en préservant mon autonomie. Et puis pour m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Mille mercis monsieur pour votre aide technique et scientifique, vous vous êtes beaucoup investis à résoudre nos nombreux problèmes. Vos remarques, vos connaissances, votre caractère entier ont été une vraie chance pour moi. Homages respectueux.

Je remercie vivement chacun des membres de jury qui m'ont fait l'honneur d'y prendre part et qui ont sacrifié de leur temps pour évaluer ce travail: Monsieur Leghouchi Essaid, Monsieur Djebbar Mohamed-Reda, professeur de l'unversité de Annaba, Madame Djebbar Houria, maître de conférences de l'université de Annaba et madame Abidli Nacira, maître de conférences de l'université de Constantine, Sincères remerciements.

Un merci spécial au docteur Morin Didier, du laboratoire de pharmacologie, faculté de médecine de Paris, pour ses réponses à mes nombreuses questions et pour m'avoir transmis une très grande partie de ses connaissances dans le domaine de l'étude de la mitochondrie. Merci monsieur!

Un énorme Merci à monsieur Mohammed Kebieche, chef du département de biochimie-Microbiologie et à tous les autres membres qui font que ce département est le meilleur.

Je tiens à exprimer aussi mes vifs et sincères reconnaissances à tous mes enseignants qui m'ont suivi durant mon cycle de formation, du primaire à la post-graduation, et à mes collègues dans la graduation et la post-graduations.

Je remercie tous les membres des laboratoires de biologie pour leur convivialité, spécialement Yahia, responsable de laboratoire de phytopharmacologie pour son aide et sa patience durant toute la période de la réalisation de mon travail dans le laboratoire.

J'associe à mes remerciements les docteurs, Madame Amaddah et Monsieur Amaddah de l'université de Constantine pour leur accueil chaleureux et pour leur précieuse collaboration.

Enfinement et surtout, j'adresse ma plus profonde reconnaissance 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, leur appui à mes projets m'a permis de prendre les voies que je désirais dans ma vie, m'a permet de m'améliorer à chaque instant et m'incite à continuer et à réaliser mes rêves. Mille mercis à vous d'être si présent!

Wided Kebba

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. GENERALITES SUR LA MITOCHONDRIE.....	4
I.1. HISTOIRE DE DECOUVERTE ET DEFINITION	4
I.2. ORIGINE.....	5
I.3. ORGANISATION GENERALE DE LA MITOCHONDRIE	5
I.3.1. Membrane externe	5
I.3.2. Membrane interne.....	5
I.3.3. Espace intermembranaire.....	6
I.3.4. La matrice mitochondriale.....	6
I.3.5. Le génome mitochondrial.....	6
I.4. STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.....	6
I.4.1. Le complexe I: NADH ubiquinone oxydoréductase	7
I.4.2. Le complexe II: Succinate ubiquinone oxydoréductase	7
I.4.3. Le complexe III: Ubiquinol cytochrome C réductase	7
I.4.4. Le complexe IV: Cytochrome C oxydase.	7
I.4.5. Le complexe V: FOF1- ATP synthase	7
I.5. LES PRINCIPALES FONCTIONS DE LA MITOCHONDRIE.....	8
I.5.1. Synthèse d'ATP.....	8
I.5.3. Mitochondrie et apoptose.....	9
I.5.4. Mitochondrie source de ROS et de stress.....	9
I.5.4. Mitochondrie et homéostasie du calcium.....	10
II- LE STRESS OXYDANT.....	11
II.1. DEFINITIONS.....	11
II.2. LES DERIVEES REACTIFS DE L'OXYGENE (ROS).....	11
II.3. SOURCES ET FORMATION DE ROS.....	13
II.3.1. Sources exogènes.....	13
II.3.2. Sources endogènes.....	15
II.4. IMPLICATION DE LA MITOCHONDRIE DANS LE STRESS OXYDANT.....	17
II.4.1. La cytochrome b ₅ réductase.....	17
II.4.2. La monoamine oxydase (MAO).....	17
II.4.3. Dihydro-orotate déhydrogénase (DHOH).....	17
II.4.4. Alpha-glycerophosphate déhydrogénase.....	17
II.4.5. Succinate déhydrogénase (SDH) ou complexe II.....	18
II.4.6. L'Aconitase.....	18
II.4.7. Le complexe Alpha-cetoglutarate.....	18
II.4.8. Production des ROS par le complexe I.....	18
II.4.9. Production de ROS par le complexe III et le cycle Q.....	19
II.5. MODULATION DE LA PRODUCTION MITOCHONDRIALE DE ROS.....	21
II.6. LES DEGATS OXYDATIFS.....	21
II.6.1. La peroxydation lipidique.....	22

II.6.2. L'oxydation des protéines.....	24
II.6.3. Oxydation de l'ADN.....	25
II.6.4. Oxydation des carbohydrates.....	25
II.7. SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LES ROS.....	25
II.7.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	26
II.7.3. Les antioxydants non enzymatiques.....	28
II.8. INTERVOTION DES ROS AU COURS DES PROCESSUS PHYSIOLOGIQUES.....	33
III- LA MITOCHONDRIE ET L' APOPTOSE.....	34
III.1. DEFINITION DE L' APOPTOSE.....	34
III.2. ACTEURS MOLECULAIRES MAJORITAIRES DE L' APOPTOSE.....	35
III.2.1. Les caspases.....	35
III.2.2. Les membres de la famille Bcl-2.....	35
III.3. MECANISMES DE PERMEABILISATION DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES LORS DE L' APOPTOSE.....	36
III.3.1. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale MPTP.....	36
III.3.2. La rupture de la membrane externe mitochondriale.....	37
III.3.3. Le pore formé par les membres de la famille Bcl-2.....	37
III.4. MECANISMES MOLECULAIRES ET DIFFERENTES VOIES DE L' APOPTOSE.....	37
III.4.1. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque.....	37
III.4.2. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque.....	40
III.5. REGULATION DE LA VOIE MITOCHONDRIALE DE L' APOPTOSE.....	41
VI. MITOCHONDRIE, STRESS, APOPTOSE ET PATHOLOGIES HUMAINES.....	42
VI.1. LE VIEILLISSEMENT.....	42
VI.2. L'ISCHEMIE-REPERFUSION.....	43
VI.3. LES MALADIES NEURODEGENERATIVE.....	43
VI.4. LE CANCER.....	44
VI.5. ENCEPHALOMYOPATHIE MITOCHONDRIALE.....	44
VI.6. ATAXIE DE FRIEDRICH.....	44
VII. LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDANT PAR LES FLAVONOÏDES DE LA PROPOLIS.....	45
VII.1. LES FLAVONOÏDES.....	45
VII.1.1. DEFINITION ET STRUCTURE CHIMIQUE.....	45
VII.1.2. LOCALISATION.....	46
VII.1.3. DISTRIBUTION.....	46
VII.1.4. CLASSIFICATION.....	46
VII.1.5. BIOSYNTHESE.....	47
VII.1.6. PHARMACOCINETIQUE DES FLAVONOÏDES.....	49
VII.1.7. PROPRIETES DES FLAVONOÏDES, MECANISME D' ACTION ET RELATION STRUCTURE- ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	50
VII.2. LA PROPOLIS.....	55
VII.2.1. Historique et définition.....	55
VII.2.2. Aspect et propriétés physicochimiques.....	56

VII.2.3. Origine botanique de la propolis.....	56
VII.2.4. Composition chimique.....	57
VII.2.5. Toxicité et interactions de la propolis.....	57
VII.2.6. Propriétés thérapeutiques.....	67
MATERIEL ET METHODES.....	59
I. MATERIEL VEGETAL ET CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYTOCHIMIQUE.....	59
I.1. Récolte de la propolis.....	59
I.2. Préparation de l'extrait éthanolique et extraction des aglycones flavoniques de la propolis	59
I.3. Test chimique d'identification des aglycones flavoniques de la propolis.....	60
I.4. Dosage des flavonoïdes de la propolis.....	60
I.5. Contribution à l'analyse structurale des flavonoïdes de la propolis.....	62
I.5.1. La chromatographique sur couche mince de l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis.....	62
I.5.2. Analyse spectral infrarouge de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis.....	64
II. LES ANIMAUX.....	64
II.1. Entretien des animaux.....	64
II.2. Traitement des animaux.....	64
II.2.1. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis in vitro.....	65
II.2.2. Etude de l'effet d'un traitement à long terme par l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis sur la balance antioxydant- prooxydant mitochondriale et cytosolique.....	65
II.2.3. Etude de l'effet préventif de l'extrait brut et des aglycones flavoniques de la propolis contre le stress induit par la doxorubicine.....	65
II.2.4. Etude de l'effet curatif de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis contre le stress induit par la doxorubicine.....	66
II.3. Sacrifice des animaux et prélèvement de foie.....	66
III. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE SUR MITOCHONDRIES ET CELLULES HEPATIQUES.....	67
III.1. Isolement des mitochondries hépatiques.....	67
III.2. Préparation de la matrice mitochondriale.....	68
III.3. Préparation de la fraction cytosolique hépatique.....	69
III.4. Evaluation de l'effet scavenger par la méthode du DPPH°.....	69
III.5. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde.....	70
III.6. Mesure du gonflement mitochondrial "Mitochondrial Swelling".....	70
III.7. Evaluation de l'activité enzymatique de enzymes antioxydante mitochondriales et cytosolique.....	71
III.7.2. Mesure de l'activité enzymatique de la SOD in vitro et in vivo.....	71
III.7.1. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase n vitro et in vivo.....	72
III.8. Dosage du glutathion hépatique.....	72
III.9. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	73
III.9.1. Dosage du MDA mitochondrial.....	73
III.9.2. Dosage du MDA cytosolique.....	74

IV. TRAITEMENT DES RESULTATS.....	75
IV.1. Test de student.....	75
IV.2. La corrélation.....	75
RESULTATS ET INTERPRETATION.....	77
I. ETUDE PHYTOCHIMIQUE.....	77
I.1. Identification des aglycones flavoniques et dosage des flavonoïdes.....	77
I.2. Chromatographie sur couche mince.....	77
I.3. Spectres infrarouges.....	78
II. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES, DE LA PROPOLIS IN VITRO SUR MITOCHONDRIES ET CELLULES HEPATIQUES	79
II.1. Evaluation de l'effet scavenger.....	79
II.2. Evaluation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde.....	81
II.3. Evaluation de l'effet sur la peroxydation lipidique mitochondriale induite in vitro par le fer.....	82
II.4. Evaluation de l'effet sur le gonflement mitochondrial in vitro.....	84
II.5. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes in vitro.....	86
II.5.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale...	86
II.5.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale.....	89
III. ETUDE DE L'EFFET DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE 100 MG/KG SUR LA BALANCE ANTIOXYDANT- PROOXYDANT MITOCHONDRIALE ET CELLULAIRE IN VIVO A LONG TERME.....	91
III.1. Evaluation de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques.....	91
III.2. Evaluation du gonflement mitochondrial.....	92
III.3. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	93
III.3.1. Evaluation des taux du MDA mitochondriale.....	94
III.3.2. Evaluation des taux du MDA cytosolique.....	95
III.4. Evaluation des taux de glutathion hépatique.....	96
III.5. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes.....	97
III.5.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale.	
III.5.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique.....	99
IV. ETUDE DE L'EFFET PREVENTIF DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES À 100 MG/KG CONTRE LE STRESS OXYDANT MITOCHONDRIAL ET CELLULAIRE INDUIT PAR LA DOXORUBICINE.....	101
IV.1. Evaluation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde.....	101
IV.2. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale et cytosolique.....	103
IV.3. Evaluation des taux du GSH cytosolique hépatique.....	105
IV.4. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes mitochondriales.....	107
IV.4.1. La SOD mitochondriale	107
IV.4.2. La catalase mitochondriale.....	108

7. ETUDE DE L'EFFET CURATIF DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES A 100 MG/KG CONTRE LE STRESS OXYDANT MITOCHONDRIAL ET CELLULAIRE INDUIT PAR LA DOXORUBICINE.....	109
V.1.Evaluation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde.....	109
V.2. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale et cytosolique.....	111
V.3. Evaluation des taux de GSH cytosolique hépatique.....	113
V.4. Evaluation de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes mitochondriales....	114
V.4.1. La SOD mitochondriale.....	115
V.4.2. La catalase mitochondriale.....	116
DISCUSSION.....	119
CONCLUSION.....	136
ANNEXE.....	139
REFERENCES.....	141

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Antimycin A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Facteur induisant l'apoptose.
ANT	adenine nucléotide transporter
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bax	Bcl-2-associated protein X
CAT	Catalase
CSA	Cyclosporine
DIABLO	Direct IAP Binding protein with Low pI
DPPH°	2,2-diphénylpicrylhydrazyl
FAD	Flavine-adénine dinucléotide
FADD	Fas-associated death domain
FADH	Flavine-Adénosine-Dinucléotide, forme réduite
FMN	Flavine mononucléotide
FMN	Flavine Mono Nucléotide
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HSP	Heat Shock Proteins
IAP	Inhibitors of apoptosis
IV	Intraveineuse
MDA	Malondialdehyde
Myx	Myxothiazol
NADH	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate
NBT	Bleu de nitrotétrazolium
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
O₂°	Anion superoxyde
ONOO-	Peroxynitrite
PTP	Permeability transition pore
ROS	Reactive oxygen species
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
T TNF	Tumor Necrosis Factor Receptor
NF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UCPn,	Protéines découplantes (uncoupling protein)
VDAC	Voltage-dependent anion channel
XIAP	X-linked inhibitor-of-apoptosis protein.
Ψ_m	Différence de potentiel de la membrane mitochondriale

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. STRUCTURE GENERALE ET FONCTIONNEMENT DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE	8
FIGURE 2. METABOLISME HEPATIQUE DE LA DOXORUBICINE.....	14
FIGURE 3. PRODUCTION DE ROS AU NIVEAU DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.....	16
FIGURE 4. TRANSFERT REVERSE (F.E.T) ET TRANSFERT NORMAL (R.T.E) DES ELECTRONS AU NVEAU DU COMPLEX.....	19
FIGURE 5. MECANISME DE PRODUCTION DU SUPEROXYDE AU NIVEAU DU COMPLEXE III DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.....	20
FIGURE 6. CYCLE Q MECANISME D'ACTION ET INHIBITEURS DU COMPLEXE III.....	20
FIGURE 7. CHAINE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.....	23
FIGURE 8. METABOLISME ET FONCTIONS ANTIOXYDANTES DU GSH DANS LA CELLULE.....	30
FIGURE 9. PRINCIPALES SOURCES ET SYSTEME DE DETOXIFICATION DES ROS DANS LA MITOCHONDRIE	32
FIGURE 10. PRINCIPAUX COMPOSANTS DU PORE DE TRANSITION DE PERMEABILITE MITOCHONDRIALE (PTP)	36
FIGURE 11. FORMATION DE L'APOPTOSOME ET ACTIVATION DES CASPASES.....	39
FIGURE 12. VOIE INTRINSEQUE ET EXTRINSEQUE DE L'APOPTOSE ET LES FACTEURS LIBERES DE LA MITOCHONDRIE LORS DU PROCESSUS APOPTOTIQUE.....	40
FIGURE 13. SQUELETTE DE BASE DES FLAVONOÏDES.....	45
FIGURE 14. VOIE DE BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES.....	48
FIGURE 15. PIEGEAGE DES ROS PAR LES FLAVONOÏDES.....	52
FIGURE 16. ÉLEMENTS ESSENTIELS POUR L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES FLAVONOÏDES.....	53
FIGURE 17 FLAVONOÏDES ET LEURS SITES PROPOSES POUR LA CHELATION DES IONS METALLIQUES.....	53
FIGURE 18 PRINCIPAUX COMPLEXES FORMÉS PAR LE $AlCl_3$ AVEC ES FLAVONOÏDES.....	61
FIGURE 19 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES.....	68
FIGURE 20. FORMES RADICALAIRE (1) ET REDUITE (2) DU DPPH°.....	69
FIGURE 21. SPECTRE INFRAROUGE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE LA PROPOLIS.....	78
FIGURE 22. SPECTRE INFRAROUGE DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	79
FIGURE 23. VARIATION DE L'EFFET SCAVENGER DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES, DE LA PROPOLIS ET DE LA VITAMINE E A DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES VIS-A-VIS DU RADICAL LIBRE DPPH° IN VITRO.....	80
FIGURE 24. VARIATION DE LA PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE PAR LES MITOCHODRIES HEPATIQUES DE RAT EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS IN VITRO.....	82
FIGURE 25. VARIATION DES TAUX DU MDA MITOCHONDRIAL GENERE SUITE A LA PEROXYDATION LIPIDIQUE INDUITE IN VITRO PAR LE $FeCl_2/FeCl_3$ EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	84
FIGURE 26. VARIATION DU GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT IN VITRO EN FONCTION DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	86

FIGURE 27. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD MITOCHONDRIALE EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS IN VITRO.....	88
FIGURE 28. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD CYTOSOLIQUE IN VITRO EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	88
FIGURE 29. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE IN VITRO EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	89
FIGURE 30. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE IN VITRO EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	90
FIGURE 31. EFFET A LONG TERME DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES PAR VOIE ORALE A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET DE LA QUERCETINE A (0.033 MG/KG/J), PENDANT DEUX MOIS SUR LA PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE PAR LE COMPLEXE III DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.....	92
FIGURE 32. EFFET A LONG TERME DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES PAR VOIE ORALE A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET DE LA QUERCETINE A (0.033 MG/KG/J), PENDANT DEUX MOIS SUR LE GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	93
FIGURE 33. VARIATION DES TAUX DU MDA MITOCHONDRIAL HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	95
FIGURE 34. VARIATION DES TAUX DU MDA CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	96
FIGURE 35. VARIATION DES TAUX DES TAUX DE GSH CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	97
FIGURE 36. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD MITOCHONDRIALE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.	98
FIGURE 37. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	98
FIGURE 38. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.	100
FIGURE 39. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.	100
FIGURE 40. VARIATION DU POURCENTAGE DE LA PRODUCTION MITOCHONDRIALE DE L'ANION SUPEROXYDE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	102

FIGURE 41. VARIATION DES TAUX DE MDA MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE LA PROPOLIS , DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.	104
FIGURE 42. VARIATION DES TAUX DE MDA CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	104
FIGURE 43. VARIATION DES TAUX DE GSH CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN	106
FIGURE 44. VARIATION DES L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD MITOCHONDRIALE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	107
FIGURE 45. VARIATION DES L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	108
FIGURE 46. EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG/J PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT BRUT, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS SUR LA PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE PAR LES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	110
FIGURE 47. VARIATION DES CONCENTRATION EN MDA MITOCHONDRIAL HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT BRUT, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS, A 100 MG/KG/ J OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	112
FIGURE 48. VARIATION DES CONCENTRATION EN MDA HEPATIQUE CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT BRUT, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS, A 100 MG/KG/ J OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	112
FIGURE 49. VARIATION DES CONCENTRATION EN GLUTATHION HEPATIQUE CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOIDES, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	114
FIGURE 50. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD MITOCHONDRIALE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT BRUT DE LA PROPOLIS OU DE SES AGLYCONES FLAVONIQUES A LA DOSE DE 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	116
FIGURE 51. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT BRUT DE LA PROPOLIS OU DE SES AGLYCONES FLAVONIQUES A LA DOSE DE 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0. 033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....	117
FIGURE 52. MECANISME D'OUVERTURE DU PORE GEANT PAR LA CURCUMINE.....	121
FIGURE 53. MECANISME DE L'EFFET PROOXYDANT DE LA DOXORUBICINE AU NIVEAU HEPATIQUE.....	133
FIGURE 54. MECANISME D'ACTION DES FLAVONOÏDES DE LA PROPOLIS DANS LA PROTECTION CONTRE LE STRESS HEPATIQUE MITOCHONDRIAL ET CELLULAIRE.....	134

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. PRINCIPAUX ROS ET COMPARAISON DES POUVOIRS OXYDANTS.....	12
TABLEAU 2. RELATION ENTRE LA FLUORESCENCE SOUS UV ET LA STRUCTURE DES FLAVONOÏDES.....	66
TABLEAU 3. RELATION ENTRE LE RF ET LA STRUCTURE DES FLAVONOÏDES.....	67
TABLEAU 4. COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE SUR COUCHE MINCE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE LA PROPOLIS.....	80
TABLEAU 5. COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE SUR COUCHE MINCE DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	80
TABLEAU 6. VARIATION DE L'EFFET SCAVENGER DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES, DE LA PROPOLIS ET DE LA VITAMINE E A DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES VIS-A-VIS DU RADICAL LIBRE DPPH° IN VITRO.....	83
TABLEAU 7: VARIATION DE LA PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE PAR LES MITOCHODRIES HEPATIQUES DE RAT EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS IN VITRO.....	85
TABLEAU 8.VARIATION DES TAUX DU MDA MITOCHONDRIAL GENERE SUITE A LA PEROXYDATION LIPIDIQUE INDUITE IN VITRO PAR LE FECL ₂ /FECL ₃ EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	86
TABLEAU 9. VARIATION DU GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT IN VITRO EN FONCTION DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE LA PROPOLIS.....	88
TABLEAU 10. VARIATION DU GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT IN VITRO EN FONCTION DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	88
TABLEAU 11. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE HEPATIQUE EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS IN VITRO.....	90
TABLEAU 12. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE IN VITRO EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS MOLAIRES DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE ET DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS.....	93
TABLEAU 13. EFFET A LONG TERME DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES PAR VOIE ORALE A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET DE LA QUERCETINE A (0.033 MG/KG/J) PENDANT DEUX MOIS SUR LA PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE PAR LE COMPLEXE III DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.....	94
TABLEAU 14. EFFET A LONG TERME DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS ADMINISTRES PAR VOIE ORALE A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET DE LA QUERCETINE A (0.033 MG/KG/J) , PENDANT DEUX MOIS SUR LE GONFLEMENT DES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....	96
TABLEAU 15. VARIATION DES TAUX DU MDA MITOCHONDRIAL ET CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	97
TABLEAU 16. VARIATION DES TAUX DES TAUX DE GSH CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.	99
TABLEAU 17. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD MITOCHONDRIAL ET CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....	102

TABLEAU 18. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION PROLONGEE PAR L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, LES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE DE (100 MG/KG/J) ET LA QUERCETINE A LA DOSE DE (0.033 MG/KG/J) PAR VOIE ORALE PENDANT DEUX MOIS.....104

TABLEAU 19. VARIATION DE LA PRODUCTION MITOCHONDRIALE DE L'ANION SUPEROXYDE APRES ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A LA DOSE QUOTIDIENNE DE 100 MG/KG ET LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS SUIVIE DE LA DOXORUBICINE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS.....105

TABLEAU 20. VARIATION DES TAUX DU MDA CYTOSOLIQUE ET MITOCHONDRIAL APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....108

TABLEAU 21. VARIATION DES TAUX DE GSH CYTOSOLIQUE HEPATIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....109

TABLEAU 22. VARIATION DES L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CATALASE ET DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE MITOCHONDRIALES APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE IV PENDANT TROIS JOURS OU PRECEDEE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU DE LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....112

TABLEAU 23. EFFET DE LA DOXORUBICINE ADMINISTREE SEULE A 10 MG/KG/J PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT BRUT, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS, A 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS SUR LA PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE PAR LES MITOCHONDRIES HEPATIQUES DE RAT.....113

TABLEAU 24. VARIATION DES CONCENTRATION EN MDA HEPATIQUE MITOCHONDRIAL ET CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DE L'EXTRAIT BRUT, DES AGLYCONES FLAVONIQUES, DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....116

TABLEAU 25. VARIATION DES CONCENTRATION EN GLUTATHION HEPATIQUE CYTOSOLIQUE APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE PAR ADMINISTRATION DES FLAVONOÏDES, DES AGLYCONES FLAVONIQUES DE LA PROPOLIS A 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....117

TABLEAU 26. VARIATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA SOD ET DE LA CATALASE MITOCHONDRIALES HEPATIQUES APRES ADMINISTRATION DE LA DOXORUBICINE SEULE A 10 MG/KG/J PAR VOIE INTRAVEINEUSE PENDANT TROIS JOURS OU SUIVIE DE L'EXTRAIT BRUT DE LA PROPOLIS OU DE SES AGLYCONES FLAVONIQUES A LA DOSE DE 100 MG/KG/J OU LA QUERCETINE A 0.033 MG/KG/J PAR VOIE ORALE PENDANT UN MOIS.....117

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La mitochondrie, site principal de la production de l'énergie cellulaire, a un rôle important dans l'initialisation du processus pathologique et toxique à travers la génération d'un excès des radicaux libres de l'oxygène (ROS) (1). Ces substances, produisant spontanément et d'une manière continue au sein de notre organisme, sont formées en quantités pathologiques lorsque la chaîne respiratoire ne peut réduire complètement la totalité de l'oxygène qu'elle reçoit. Les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont les sites majeurs de cette production (2.3.4). Pour lutter contre ces radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Certains sont endogènes alors que d'autres sont apportés par l'alimentation (5).

Lorsque le précaire équilibre entre production et élimination des ROS est rompu soit par augmentation de la production des radicaux libres, soit par baisse des capacités antioxydantes, il survient un stress oxydatif. Cet état, que l'on définit comme étant un déséquilibre de la balance antioxydant-prooxydant en faveur de ces derniers, peut occasionner plusieurs types de dommages aux cellules entraînant de ce fait une perte de la fonction et de l'intégrité, voire la mort cellulaire (6).

La mitochondrie est reconnue également, comme étant un point d'intégration majeur des signaux de mort ou de survie engendrés par une panoplie de stimuli intra- et extracellulaires. La mitochondrie serait le point de départ du processus d'apoptose. L'ouverture d'un mega canal mitochondrial appelé « pore de transition de perméabilité » ou PTP induit un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale « Ψ_m » qui a pour principale conséquence d'altérer la production d'ATP. Ces perturbations favorisent le gonflement « swelling » de l'organite et la libération dans le cytosol de facteurs proapoptotiques responsables de la mort cellulaire programmé (7.8).

Aujourd'hui, le concept des maladies mitochondriales est bien admis et beaucoup de pathologies sont liées au dysfonctionnement mitochondrial. C'est pourquoi la plupart des approches pharmacologiques visant à protéger les tissus comme le cœur, le foie, le rein, le pancréas ou le cerveau cherchent à prévenir ou réduire les conséquences du stress oxydatif particulièrement par la protection des fonctions mitochondriales. Différentes substances antioxydantes sont actuellement proposés. Les flavonoïdes, métabolites secondaires appartenant

à la famille des polyphénols, largement représentés dans les fruits et les légumes mais également dans la propolis des abeilles (9), sont largement étudiés dans le domaine médical où on leur reconnaît plusieurs activités pharmacologiques.

Cependant, si aujourd'hui des études épidémiologiques ont mis en évidence les propriétés antioxydantes de ces flavonoïdes. Très peu de travaux ont été consacrés aux effets des flavonoïdes de la propolis en général et de la propolis algérienne en particulier. A ce jour, aucun mécanisme moléculaire n'a été proposé pour expliquer leurs effets antioxydants. Les interactions avec les fonctions mitochondriales en relation avec le stress et avec le processus d'apoptose restent à déterminer également. D'autre part, l'utilisation massive des antioxydants peut entraîner des effets néfastes et peut devenir un agent prooxydant comme c'est le cas avec la vitamine C, cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a été faite sur l'effet d'un traitement prolongé par ces principes actifs sur la balance antioxydant-prooxydant, d'où l'originalité de notre travail.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les objectifs de notre étude, réalisée sur un modèle de mitochondries et de cellules hépatiques de rat albinos, visant à :

- Evaluer l'activité antioxydante de l'extrait ethanologique et des aglycones flavoniques de la propolis *in vitro*, sur mitochondries isolées, par l'évaluation de: L'activité antiradicalaire, l'effet sur la production de l'anion superoxyde par le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'effet sur le gonflement mitochondrial et l'ouverture du PTP, sur la préoxydation lipidique mitochondriale induite *in vitro* ainsi que l'effet sur l'activité des enzymes antioxydantes SOD et catalase.
- Evaluer l'effet d'un traitement à long terme (2 mois) par ces principes actifs administrés à la dose de 100 mg/kg sur la balance antioxydant-prooxydant afin de voir une intolérance probable de l'organisme ou un effet prooxydant de ces principes actifs.
- Etudier les effets préventif et curatif des deux extraits de propolis administrés à 100 mg/kg par voie orale contre le stress oxydant induit par la doxorubicine administrée par voie intraveineuse à 10 mg/kg, et en parallèle évaluer l'impact de la doxorubicine sur la balance prooxydant-antioxydant.
- Faire comparer l'effet antioxydant de l'extrait brut avec celui des aglycones flavoniques de la propolis et avec la quercétine comme aglycone de référence.
- Nous essaierons enfin de proposer un mécanisme d'action moléculaire de ces principes actifs et de la doxorubicine au cours du stress oxydatif mitochondrial et cellulaire, et du stade précoce de l'apoptose.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur la mitochondrie

Les mitochondries constituent ce qu'on a coutume d'appeler « la centrale énergétique de la cellule » où ont lieu en particulier les réactions de la respiration cellulaire qui permettent la synthèse d'ATP, molécule énergétique utilisable directement par les réactions cellulaires (10). L'existence d'un eucaryote primitif sans mitochondries est actuellement mise en doute, plusieurs études ont récemment montré que des organismes amitochondriés l'étaient en réalité par perte secondaire des mitochondries (11, 12). De plus, certaines de ces organismes possèdent par contre des hydrogénosomes qui seraient vraisemblablement dérivés des mitochondries (13.14.15).

I.1. Histoire de découverte et définition

La découverte des mitochondries est beaucoup plus diffuse. En 1890, Altman découvre dans le cytoplasme des granulations et des filaments qui les dénomma bioblaste (du grec *bios* : vie et *blastos* : germe). En 1897, Banda mit au point une technique très compliquée qui permet de différencier ces formations d'une manière précise dans le protoplasme des cellules animales et végétales. C'est lui qui donna à ces germes de vie le nom de mitochondrie (du grec *mitos* : filaments et *chondria* : granule). L'organisation de la mitochondrie telle que nous la connaissons actuellement a été mise en évidence grâce à la microscopie électronique par Plade (1952) et Sjöstrand (1953). En 1959, Chevremont découvre la présence des molécules d'ADN dont la structure est fondamentalement différente et indépendante de celle de l'ADN nucléaire (16).

Les mitochondries constituent des compartiments cellulaires qui ont généralement une apparence de cylindres de 0,5 à 1 µm de diamètre, pouvant atteindre une longueur maximale de 7 µm. Le nombre, la forme, la taille et la localisation des mitochondries varient en fonction de l'activité de la cellule. Elles varient également selon l'organe et le tissu. Les cellules en contiennent de nombreuses : nombre estimé de 1000 à 2000 dans l'hépatocyte de rats (16.17).

Les mitochondries se divisent par bipartition ou bourgeonnement. La microcinématographie séquentielle des cellules vivantes a permis de constater que les mitochondries sont extrêmement mobiles et malléables, qu'elles changent constamment de forme, fusionnent et se séparent. Elles sont souvent associées aux microtubules lors de leurs déplacements (18.19).

I.2. Origine

La mitochondrie résulte d'un phénomène d'endosymbiose primaire. Cette origine postule qu'une protéobactérie (symbiote) a été phagocytée par une archéobactérie anaérobie (hôte) il y a cela au moins un milliard et demi d'années pour former un eucaryote primitif duquel tous les eucaryotes actuels dériveraient. La bactérie à l'origine de la mitochondrie s'est trouvée donc dans une vacuole d'endocytose au sein du cytoplasme de la cellule hôte, il n'y a pas eu digestion de la bactérie mais mise à profit de ses potentialités que l'hôte n'avait pas (19,20). Les processus de la transformation de la bactérie en une mitochondrie consistent en des phénomènes morphologiques et physiologiques conduisant à l'interdépendance des deux acteurs. Après la perte de la paroi bactérienne, les deux membranes entourant l'organite sont très probablement celle de la phagocytose pour la membrane externe, et celle dérivant du plasmalemme de la bactérie pour la membrane interne (21).

I.3. Organisation générale et ultrastructure de la mitochondrie

L'ultrastructure de la mitochondrie est caractérisée par l'existence de deux membranes limitantes qui représentent environ 40% des membranes cellulaires dans un hépatocyte, la membrane externe et la membrane interne. Ces deux membranes sont séparées par un espace de 10 à 20 nm, espace intermembranaire ou chambre externe. La membrane interne délimite l'espace matriciel mitochondrial (16).

I.3.1. La membrane externe

Elle a une structure trilamellaire constituée de 60 % des protéines et 40 % des lipides. Elle est semi-perméable en raison de la présence de porines laissant passer les molécules de 5Kd au maximum. Ces porines contiennent des canaux anioniques voltage dépendant VDAC (Voltage Dépendent Anion Channel) qui ont une action métabolique et régulatrice. La membrane externe contient également des récepteurs d'importation, les translocases de la membrane externe TOM (Translocase of the Outer Membrane), des complexes d'importation du cholestérol, et les protéines de la famille B-cl₂ (16).

I.3.2. La membrane interne

L'organisation moléculaire de la membrane interne diffère complètement de celle de la membrane externe. Elle émet à l'intérieur de l'organite des replis serrés appelées crêtes dont le nombre et la forme varient selon l'état physiologique de l'organisme. La membrane interne contient 80% des protéines et 20% des lipides. Elle comprend les complexes de la chaîne respiratoire qui seront décrits ci-après, les transporteurs de l'ADP et l'ATP, des cotransporteurs spécifiques pour assurer le passage des éléments tels le pyruvate, les acides gras, le Ca⁺⁺ et les

enzymes de la *B*-oxydation. La cardiolipine et les transporteurs d'électrons comme le cytochrome C et l'ubiquinol (16.22.23).

I.3.3. L'espace intermembranaire

La composition de cette chambre est proche à celle du cytosol, elle est particulièrement riche en protons. Elle contient aussi des composants clefs impliqués dans l'apoptose qui sont les caspases 2, 3 et 9, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et le cytochrome C. Ces molécules sont libérées sous l'action des facteurs pro-apoptotiques (16).

I.3.4. La matrice mitochondriale

Cette chambre interne légèrement dense en microscopie électronique renferme un mélange très concentré de nombreuses enzymes impliquées dans la réplication, la transcription et la traduction de l'ADN, ainsi que ceux nécessaires pour les différentes voies métaboliques matricielles. La matrice mitochondriale contient également des granules de 50 nm de diamètre accumulateurs des cations (Ca^{++} , Mg^{++}), des mitoribosomes, de l'ARN, et des molécules d'ADN mitochondrial (23).

I.3.5. Le génome mitochondrial

Vu leurs origine endosymbiotique, les mitochondries sont dotées d'un génome propre et bien distinct du matériel génétique nucléaire. Le patrimoine génétique d'une mitochondrie, ADN mitochondrial (ADN mit) qui représente moins de 1% du génome cellulaire total, est une molécule circulaire bicaténaire de petite taille (16569 pb chez l'homme). Chaque mitochondrie comporte deux à dix molécules d'ADN mitochondrial et chaque cellule humaine contient de 10^3 à 10^4 molécules (24.25). L'ADN mit code pour 13 protéines essentielles entre 83 impliquées dans la chaîne respiratoire (7 sous unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux du complexe V), 2 ARN ribosomiaux et 22 ARN de transfert requis pour la synthèse des protéines mitochondriales (24.26). Le génome mitochondrial est dépourvu d'introns et des structures flanquantes à l'exception d'une boucle d'environ 1000 pb, il est caractérisé également par son origine exclusivement maternelle et par l'absence d'histones (25).

L'absence de système de réparation de l'ADN et son exposition aux radicaux libres générés par la phosphorylation oxydative exposent l'ADN mit à une mutabilité accrue de 10 à 20 fois supérieure à celle de l'ADN nucléaire ce qui conduit à l'hétéroplasmie (27.28).

I.4. Structure et fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les quatre complexes qui constituent la chaîne mitochondriale de transfert des électrons sont la résultante de l'association d'une cinquantaine de polypeptides. Chaque complexe est

indépendant et contient des groupements prosthétiques engagés dans une série d'oxydo-réduction (29).

I.4.1. Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase

Il est constitué de 42 ou 43 sous unités polypeptidiques pour une masse globale de 750 KDa. Il possède 7 couples redox : une FMN (Flavine Mono Nucléotide) et 6 centres Fe/S. Le transfert initial d'électrons nécessite le cofacteur NADH qui est oxydé sur la face matricielle de la membrane par la NADH déshydrogénase, le transfert d'électrons s'effectue à travers l'FMN et les centres Fe-S. Le complexe I catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à l'expulsion des protons de la matrice à l'espace intermembranaire. Le complexe I peut être inhibé par la roténone (30.31).

I.4.2. Complexe II : Succinate ubiquinone oxydoréductase

Il est entièrement codé par l'ADN nucléaire. Il participe au cycle de Krebs par la catalyse de la réoxydation du succinate en fumarate, qui permet le transfert de deux électrons au complexe III par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH₂ et d'un pool d'ubiquinone. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à l'efflux de protons. L'utilisation du malonate permet d'inhiber l'activité de ce complexe (30).

I.4.3. Complexe III : Ubiquinol cytochrome c réductase

Les ubiquinones sont des transporteurs libres d'électrons du complexe I et II vers le complexe III. Ce dernier est un dimère de 550 KD, contenant 10 polypeptides parmi lesquels les cytochromes b et c₁ et une protéine à centre Fe-S. Le complexe III permet le transfert d'électrons de l'ubiquinol au cytochrome C, transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire. Ce transfert est associé à un efflux de protons. L'antimycine A inhibe le complexe III (23.24).

I.4.4. Complexe IV : Cytochrome c oxydase

C'est un dimère de 320 KDa, contenant 9 polypeptides, parmi lesquels les 2 cytochromes a₁ et a₃ ainsi que des protéines à cuivre. Les cytochromes de la classe a sont les seuls qui sont auto oxydables, c- à -d capables de s'oxyder spontanément au contact de l'O₂. Ce complexe catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l'O₂ en H₂O par 4 électrons. Ce transfert d'électrons est couplé à un efflux de protons vers l'espace intermembranaire. Le cyanure est un inhibiteur de la cytochrome c oxydase (22.32).

I.4.5. L'ATP synthase: FOF1- ATP synthase

L'ATP synthase couple la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi et permet donc de transformer la différence du potentiel électrochimique généré par les complexes I, III et IV en énergie chimique (figure 1) (31.32).

Ce complexe est composé de deux supercomplexes, le supercomplexe Fo hydrophobe transmembranaire permettant l'accès des protons vers le deuxième supercomplexe F₁ qui est hydrophile et situé à la face matricielle de la membrane interne. F₁ seul ne peut que catalyser l'hydrolyse de l'ATP d'où son nom d'ATPase, c'est l'association des 2 supercomplexes qui permet la synthèse d'ATP (24.32).

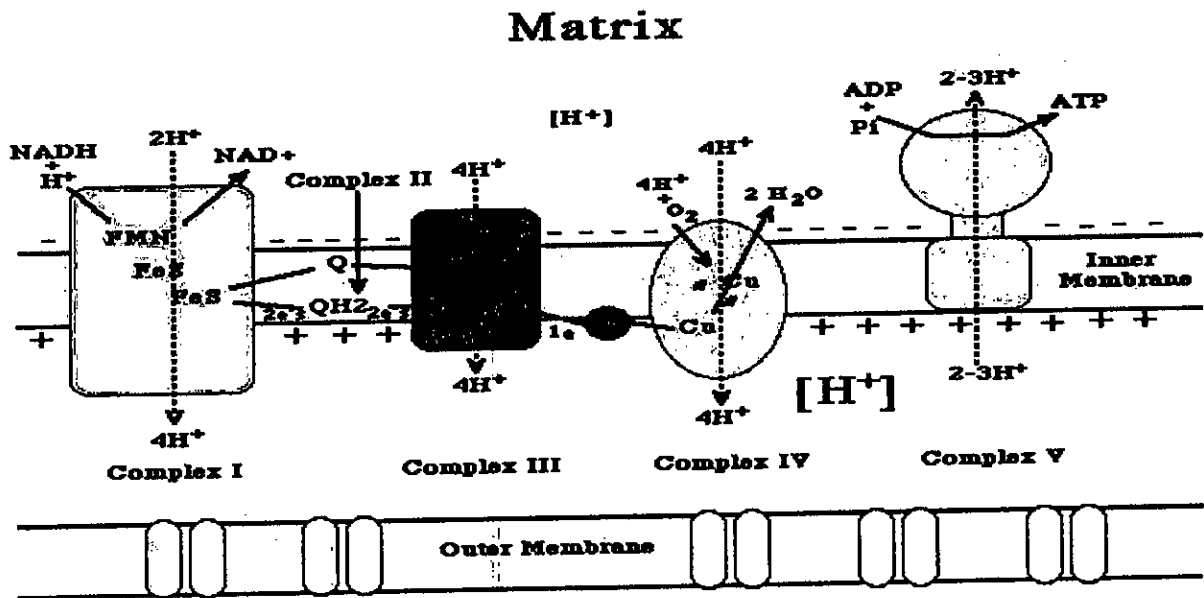


Figure 1. Structure générale et fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (33).

I.5. Les principales fonctions de la mitochondrie

Les mitochondries sont la source principale de l'énergie produite sous forme d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire. Elles sont impliquées également dans plusieurs fonctions : synthèse des hormones stéroïdes, catabolisme des acides gras par *B*-oxydation, régulation du Ca⁺⁺ intracytoplasmique, participation à la mort cellulaire programmée et à la production des ROS (30).

I.5.1. Synthèse d'ATP

L'énergie contenue dans les liaisons moléculaires des métabolites provenant des aliments ingérés est convertie en ATP par la phosphorylation oxydative mitochondriale. La mitochondrie utilise plusieurs substrats, le pyruvate issu de la glycolyse des carbohydrates principalement constitue le substrat mitochondrial majeur. Dans la matrice mitochondriale, le pyruvate est transformé en acétyl CoA sous l'action de la pyruvate deshydrogénase.

Au cours du cycle tricarboxylique, l'oxydation de ce dernier (Acétyl CoA) produit des molécules de NADH substrat du complexe I et de FADH₂, qui est produit au niveau du complexe II lors de l'oxydation du succinate en fumarate. Ces deux complexes transfèrent les électrons

résultants de l'oxydation des substrats au pool d'ubiquinone. L'ubiquinone réduit en ubiquinol achemine les électrons vers le complexe III qui les transfère vers le cytochrome *c*. Puis, au niveau du complexe IV, les électrons provenant de l'oxydation du cytochrome *c* sont utilisés pour réduire l'oxygène moléculaire (O₂). Cette voie de transfert des électrons est aussi appelée voie des cytochromes. Ces transferts d'électrons sont accompagnés au niveau des complexes I, III et IV par une expulsion de protons dans l'espace intermembranaire. Un gradient électrochimique d'environ 150 mV est ainsi généré et représente donc une force poussant les protons à retourner dans la matrice mitochondriale. Quand ces protons retournent par l'ATP synthase, l'énergie alors libérée permet la synthèse d'ATP à partir de l'ADP et de pi (30.31.34).

I.5.2. Mitochondrie et apoptose

La mitochondrie joue un rôle intégrateur des voies de mort cellulaire programmée: dans la majorité des cas elle constitue un passage obligé mais parfois seulement un lieu de potentialisation de l'apoptose. La mitochondrie possède toute une panoplie de protéines impliquées dans la régulation de ce processus (35.36.37). En effet, la phase effectrice de l'apoptose implique l'ouverture du pore de transition de perméabilité "PTP" de la mitochondrie et la libération des molécules apoptogènes tel que le cytochrome *c* et l' AIF (Anti-apoptotique Inducing Factor), capables de déclencher l'apoptose via l'activation des caspases. Cette phase de libération est sous le contrôle des membres de la famille B-cl₂ (38).

I.5.3. Mitochondrie source de ROS

La chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) est la principale source de la production des ROS à l'intérieure de la cellule (39.40). Dans les conditions du fonctionnement optimal entre 5 à 15 % des électrons tombent de la chaîne respiratoire prématurément. Ils sont directement captés par des molécules d'oxygènes qui se transforment non pas en eau mais en radical toxique superoxyde. Ces ROS sont produits au niveau des complexes de la chaîne respiratoire essentiellement le complexe I et III (1.41.42). Cette production s'effectue lors du fonctionnement normal de la chaîne respiratoire mitochondriale, production que l'on peut comparer aux inévitables déchets des centrales industrielles d'énergie. Ainsi 1 à 4% de l'oxygène consommé en conditions basales est affecté à la production du radical superoxyde. Si usuellement cette production des radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé, elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient intense ou lorsque interviennent des désordres inflammatoires ou nutritionnelles (43).

I.5.4. Mitochondrie et homéostasie du calcium

Le Ca^{++} intracellulaire est régulé par plusieurs processus. Sa concentration cytosolique est ajustée par fixation sur les protéines non membranaires, par le réticulum endoplasmique et principalement par la mitochondrie. Les mitochondries sont capables de prendre de grandes quantités du Ca^{++} cytosolique. De ce fait, elles agissent en tant que dispositifs de sécurité contre des augmentations potentiellement toxiques du Ca^{++} cytosolique. Elle capte et libère le Ca^{++} par des modes de transport différents. Ainsi le Ca^{++} entre à travers les uniporteurs Ca^{++} et est libéré essentiellement par un transport antiport ($\text{Na}^+ / \text{Ca}^{++}$) / (Na^+ / H^+) au niveau de la membrane mitochondriale interne (44). La concentration matricielle du Ca^{++} libre varie entre 0,2 et 10 μM , concentration nécessaire pour le bon fonctionnement des activités mitochondriales comme la régulation de l'activité des enzymes clés du métabolisme énergétique et la régulation de la synthèse protéique et celle des acides nucléiques. Les variations de cette concentration conduisent au dysfonctionnement mitochondrial telle l'ouverture du PTP et l'induction de l'apoptose (44.45).

II. Le stress oxydant

L'oxygène, élément indispensable à la vie, pouvait dans certaines conditions devenir un danger pour l'organisme via la formation d'espèces réactives de l'oxygène hautement réactionnelles. Ainsi le métabolisme cellulaire normal de cet élément produit de façon continue de faibles quantités de ces dérivés réactifs particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire (44.46).

II.1. Définitions

Pour définir le stress oxydant, il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. *Un radical libre* est une espèce chimique contenant un électron célibataire non apparié au niveau de son orbitale électronique périphérique, cet état confère à la molécule une grande instabilité et une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de l'électron libre sur une autre molécule. La probabilité entre ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre (47.48). Les radicaux oxygénés libres (ROL) sont nommés également "Dérivés Réactifs de l'Oxygène" (DRO) ou, pour les anglo-saxons "Reactive Oxygen Species" (ROS), "Reactive Oxygen Intermediates" (ROI) ou encore "Reactive Oxygen Metabolites" (ROM) (5). L'appellation "Dérivés libres de l'oxygène" n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (49). Dans les conditions normales, il existe un équilibre entre la production et l'élimination des ROS, *le stress oxydant* est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur des ROS. Ce déséquilibre résulte soit d'une production augmentée des radicaux libres par rapport aux capacités antioxydantes intactes, soit d'un état déficient de ces dernières, soit de ces deux situations cumulées (6.50).

II.2. Les espèces réactives de l'oxygène

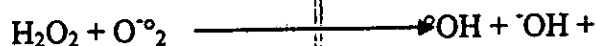
Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et qui nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule, ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réduction à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) (51). D'autres espèces dérivés de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$) ne sont pas des radicaux libres mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène dont réactivité étant très variable selon la nature du radical (tableau 1) (52).

Une première origine des phénomènes radicalaires est la formation initiale de l'anion superoxyde, le plus courant des radicaux oxygénés libres. Cet anion superoxyde peut alors dismuter soit spontanément, soit de façon enzymatique pour donner de l'eau oxygénée (H_2O_2) qui peut à son tour se transformer en radical hydroxyle ($^{\circ}OH$), le plus réactif des ROS. Ce dernier est formé par dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi le peroxyde d'hydrogène associé à du fer ferreux conduit à la réaction de fenton :



Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec le radical superoxyde aboutissant là encore à la production du radical hydroxyle. Ce mécanisme réactionnel se nomme réaction Haber-Weiss:



Le monoxyde d'azote en réagissant avec un radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) forme le peroxynitrite ($ONOO^{\circ}$), un puissant oxydant. Les radicaux alkoxyles (RO°) et peroxydes (ROO°) peuvent être générés par l'action de $O_2^{\cdot-}$, $^{\circ}OH$ et de l'oxygène singulet sur les acides gras insaturés (6).

Tableau 1. Principaux ROS et comparaison des pouvoirs oxydants (44).

Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
radical hydroxyle	$^{\circ}OH$
Radical hydroperoxyde	HOO°
Radical peroxyde	ROO°
Radical alkoxyde	RO°
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO°
peroxonitrite	$ONOO^{\circ}$
Hypochlorite	ClO
Pouvoir oxydant:	$^{\circ}OH > RO^{\circ} > HOO^{\circ} > ROO^{\circ} > NO^{\circ}$

II.3. Sources et formation des dérivés réactifs de l'oxygène

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

II.3.1. Les sources exogènes des ROS

L'environnement dont lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production des ROS dans notre organisme (6).

II.3.1.1. Les médicaments et leur métabolisme

Les médicaments, substances étrangères, sont capable d'induire un état du stress oxydatif sévère. Aux niveaux hépatiques, les médicaments sont soumis aux réactions de détoxification qui diminuent rapidement leurs réactivités. Deux types de réactions biochimiques sont utilisées: la première phase de la détoxification est assurée par les enzymes de la famille des cytochromes oxydases P450 et implique notamment des réactions d'oxydation, la deuxième phase consiste à la conjugaison des substrats oxydés avec des molécules comme l'acide gluconique ou les groupement sulfates (6). La métabolisation des médicaments par le cytochrome P450 peut s'avérer nuisible, en produisant des métabolites réactifs qui attaquent les lipides, les protéines et l'ADN et qui peuvent induire des phénomènes de cancérisation, des cytotoxicités ainsi que des phénomènes nécrotiques et/ ou apoptotiques (53).

➤ La doxorubicine

La doxorubicine est une drogue antitumorale qui est largement répandue dans le traitement d'un large spectre des cancers (54). Ce médicament appartient à la famille des anthracyclines dont la chimie conduit à la génération des radicaux libres.

Plusieurs enzymes y compris la cytochrome P450 réductase, NADH dehydrogenase associé au complexe I mitochondrial, la NO synthase catalysent le métabolisme de la doxorubicine (55.56). La structure quinonique de la doxorubicine leur permet de se comporter comme accepteur des électrons en présence des enzymes d'oxydoréduction tel que le cytochrome P450. En effet, l'addition d'un électron libre transforme la quinone en radical libre semi-quinonique avec libération des anions superoxydes qui auraient alors des effets délétères directe sur l'ADN et les macromolécules. En présence d'oxygène, ils se forment des radicaux superoxydes, hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène qui seront également toxiques conduisant à un état de stress oxydatif. (57). Le métabolisme de la doxorubicine est représenté dans la figure 2. Des études in vitro et in vivo ont prouvé que la doxorubicine stimule des perturbations dans l'homéostasie du Ca^{++} cellulaire et mitochondrial. La doxorubicine est capable d'induire la voie mitochondriale de l'apoptose ainsi que la voie extrinsèque (58.59).

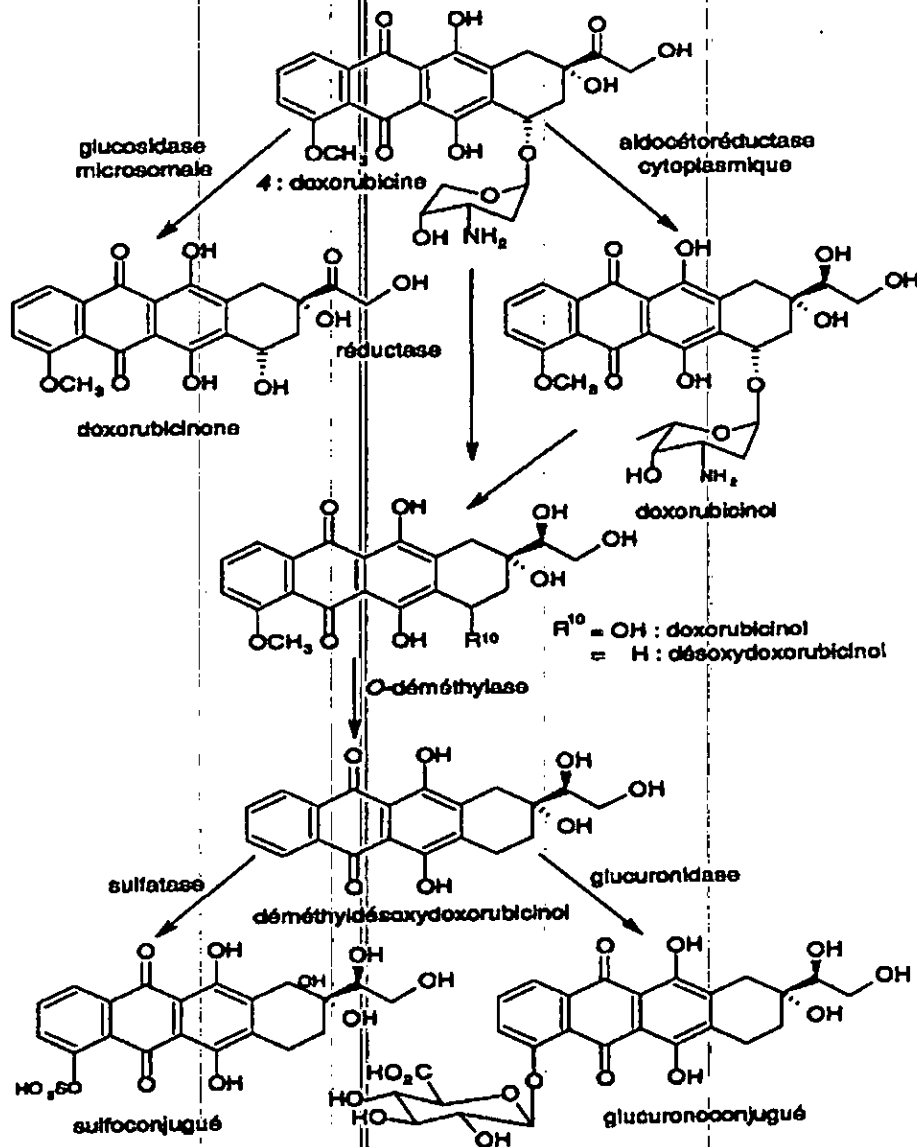


Figure 2. Métabolisme hépatique de la doxorubicine (57).

II.3.1.2. Autres sources exogènes

Les rayonnements électromagnétiques, certains métaux de transition, les fumés de combustions (de cigarette, de bois, de matériaux de construction), les produits chimiques (antiseptiques, médicaments, pesticides, produits toxiques tel le CCl₄ et les solvants, les poussières d'amiante et de silice) sont autant des facteurs qui contribuent à la genèse des radicaux libres. Les particules inhalées du silice et d'amiante sont des sources de radicaux libres parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée des sels de fer. Les rayonnements sont capables de produire des radicaux libres soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X, γ, soit en activant des molécules photosensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène

singulet. Signalons également qu'un stress intellectuel ou thermique, agents infectieux ainsi qu'un exercice physique intense mal géré peut générer un *stress oxydant* (6.51).

II.3.2. Sources endogènes des ROS

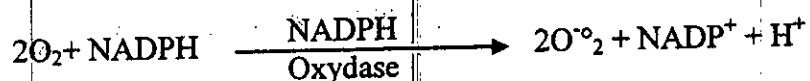
Au niveau cellulaire, il existe plusieurs sources potentielles des radicaux libres que ce soit au niveau des mitochondries, des membranes, du réticulum endoplasmique ou tout simplement du cytosol. De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés. Les sources cellulaires des ROS sont enzymatiques et non enzymatiques (28.60).

II.3.2.1. La xanthine oxydase

C'est une enzyme soluble qui génère les ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie et les intestins. Dans les conditions basales, la production de ROS par la xanthine oxydase est faible, mais elle jouerait un rôle important dans l'ischémie - réperfusion (28).

II.3.2.2. NADPH oxydase

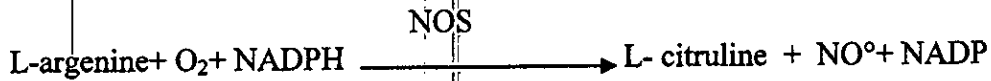
C'est une oxydase liée à la membrane plasmique. Elle a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et dans la lutte contre les micro-organismes. Elle est spécialisée dans la production du radical superoxyde selon la réaction suivante:



Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée. La forte consommation d'oxygène qui en résulte est appelée "respiratory burst" dans la littérature internationale. Cette production du superoxyde est à l'origine de la synthèse des molécules comme l' H_2O_2 et l'hypochlorite (ClO^-) indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Cette voie de production est particulièrement stimulée au cours des processus infectieux (5.28.61).

II.3.2.3. La NO synthase

Beaucoup de cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO°) à partir de l'arginine et de l'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO synthase (NOS), selon la réaction ci-dessous.



En effet, les études réalisées à l'aide des enzymes purifiées ont montré que la NOS est capable de générer des anions superoxydes dans les situations du déficit de son substrat, la L-arginine, ou de ces cofacteurs d'activation (28.52.62).

II.3.2.4. Les ions métalliques

Les ions métalliques comme le fer et le cuivre, sont de remarquable prometteurs des processus radicalaires: ils transforment l' H_2O_2 en radical hydroxyle encore plus toxique selon la réaction de fenton décrite précédemment et accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique, la concentration libre de fer ou de cuivre est particulièrement basse, ces métaux étant séquestrés par des protéines spécialisées de sorte que cette réaction n'a pas lieu. En revanche, les destructions cellulaires (hémolyse, cytolysse hépatique) entraînent une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydant (63.64.65).

II.3.2.5. Les peroxyosomes

Le peroxyosome est une source importante dans la production cellulaire des ROS, car cet organelle contient de nombreuses enzymes générant du peroxyde d'hydrogène, toute fois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxydomale afin de réaliser les processus de détoxification présents dans le foie et le rein. Il semble cependant que seule une faible quantité de H_2O_2 pourrait échapper à la catalase (28).

II.3.2.6. La mitochondrie

La source endogène prépondérante des RL est cependant liée à l'activité des mitochondries. Cet organelle est considérée comme la principale source des ROS dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, essentiellement à travers la fuite des électrons au cours de leurs transfert au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 3) (66.67).

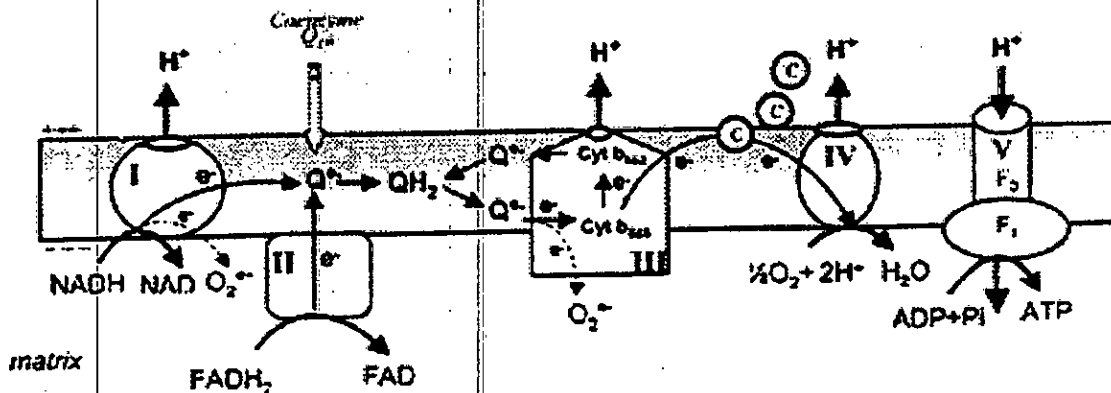


Figure 3. Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (66).

II.4. 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 et de ce fait elle est impliquée dans la genèse de la plupart des pathologies humaines et animales. Il est estimé que dans les conditions normales 1-4 % de l'oxygène consommé est incomplètement réduit en superoxyde. Dans la mitochondrie, il existe neuf sites responsables de cette production qui sont ubiquitaires dans les mitochondries des mammifères, mais l'expression et la capacité de production diffèrent selon les tissus. Bien que ces sites aient été montrés comme producteurs de ROS en quantité appréciable, l'évolution des concepts a permis de confirmer l'importance des complexes I et III dans la production de ROS (66.67).

II.4.1. La cytochrome b₅ réductase

Localisée dans la membrane externe de la mitochondrie, cette protéine se trouve en grande quantité chez les mammifères, elle oxyde le NADPH cytoplasmique et réduit le cytochrome b₅ au niveau de la membrane externe. Elle participe à la régénération de l'ascorbate en réduisant le radical libre ascorbyle. La cytochrome b₅ réductase mitochondriale produit l'anion superoxyde avec une vitesse très élevée qui dépasse 300 nmole/min/mg de protéines (67.68).

II.4.2. La monoamine oxydase (MAO)

Localisée également au niveau de la membrane externe, cette enzyme catalyse l'oxydation des amines biogéniques qu'elle est accompagnée de la libération du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Les monoamines oxydases des mitochondries cérébrales jouent un rôle central dans le renouvellement des neurotransmetteurs. L'oxydation de la tyramine par la mitochondrie cérébrale du rat produit l'H₂O₂ par une vitesse 50 fois plus élevée que celle du complexe III inhibé par l'antimycine A. Les MAOs constituent la principale source d' H₂O₂ dans les tissus lors des ischémies (69.70.71).

II.4.3. Dihydro-orotate déhydrogénase (DHOH)

Cette enzyme est localisée à la surface externe de la membrane interne. Elle catalyse la conversion du dihydro-orotate, une étape de la synthèse des nucléotides pyridines. En absence de son accepteur naturel des électrons (coenzyme Q), le DHOH réduit peut produire de l' H₂O₂ in vitro. La production de l'anion superoxyde par le DHOH est également suggérée (67.72).

II.4.4. Alpha-glycerophosphate déhydrogénase

Elle est localisée également à la surface externe de la membrane interne. Elle existe en quantité importante dans le tissu adipeux brun, les muscles et le cerveau où elle possède une grande activité. C'est une enzyme à FAD, elle catalyse l'oxydation du glycérol -3-phosphate en

dihydroxy-acétone phosphate et utilise le coenzyme Q comme accepteur d'électron, cette réaction est accompagnée de la production du peroxyde d'hydrogène (67.73).

II.4.5. Succinate déhydrogénase (SDH) ou complexe II

C'est une flavoprotéine localisée à la face interne de la membrane mitochondriale interne. Elle oxyde le succinate en fumarate. En utilisant des particules submitochondriales oxydants le succinate, la production des ROS peut être inhibée par la carboxine, un inhibiteur de la succinate déhydrogénase, mais il est peu clair si ce complexe de la chaîne respiratoire intacte soit capable de générer les ROS (74.75).

II.4.6. L'Aconitase

C'est une enzyme de la matrice mitochondriale qui participe au cycle tricarboxylique en catalysant la conversion du citrate en isocitrate. Cette enzyme est inactivée par l'anion superoxyde qui oxyde son centre Fe-S. L'activation de l'enzyme conduit à la production du radical hydroxyle. Une telle production est médiée par les ions Fe^{2+} (76.77).

II.4.7. Le complexe Alpha-cetoglutarate

C'est une enzyme matricielle étroitement liée à la membrane mitochondriale interne. Elle catalyse l'oxydation de l'alpha cetoglutarate en succinyl-COA. Deux études récentes réalisées sur des enzymes purifiés isolés des mitochondries cardiaques des bœufs et des mitochondries cérébrales des rats ont montré que ce complexe enzymatique est capable de générer l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (78.79).

II.4.8. Production des ROS par le complexe I

Le complexe I constitue l'un des deux points majeurs d'entrée à la chaîne respiratoire mitochondriale pour la réduction des équivalents réduits dérivés du cycle de Krebs. Plusieurs études ont été faites afin d'explorer le mécanisme de la production des ROS au niveau de ce complexe, malheureusement ces études ne donnent aucune idée sur le site exact de cette production. Certaines 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 (42.80).

Les données globales dans ce sujet supportent l'opinion que les ROS sont très probablement produits par l'un des centres Fe-S et que (N-1a) Fe-S est le candidat puissant. Selon ces études le complexe I produit l'anion superoxyde à partir du NADH lorsqu'il est inhibé par la roténone par un mécanisme indépendant du potentiel membranaire et à partir de l'ubiquinol par un mécanisme potentiel dépendant dit " *transfert reverse des électrons*" ou *TRE* (81.82). Ce flux

inverse des électrons est une série des réactions s'effectuant au niveau de la chaîne respiratoire conduisant au transfert des électrons contre le gradient du potentiel redox des transporteurs d'électrons, de l'ubiquinol vers le NAD^+ et non vers l'oxygène (67.82). Si le succinate est utilisé comme substrat en absence de roténone, la production du superoxyde est très importante ce qui a mis à jour l'importance du flux inverse des électrons du complexe II vers le complexe I. Ce flux inverse est dû au fait que les électrons dérivés du succinate peuvent remonter au complexe I et réduisent le NAD^+ en NADH libérant des électrons conduisant à la formation du superoxyde (42). Cette production est régulée par l'amplitude du potentiel membranaire, ainsi une diminution de 10% de ce potentiel provoque une inhibition de la production des ROS par 10%. Elle est inhibée également par l'acidification du milieu, par tout processus utilisant l'énergie comme la synthèse d'ATP, transport du Ca^{++} et par les découpleurs (83.84.85). Le TRE est inhibé également par la roténone (Figure 4) (67).

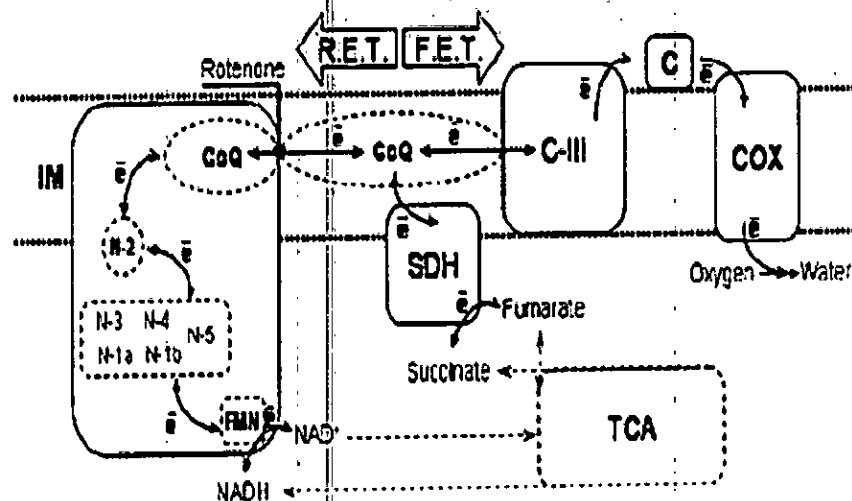


Figure 4. Transfert reverse (F.E.T) et transfert normal (R.E.T) des électrons au niveau du complexe I (67).

II.4.9. Production des ROS par le complexe III et le cycle Q

La production des ROS par le complexe III représente un exemple remarquable des recherches déductives en sciences biochimiques. Il est capable de la production robuste de $1^{\circ}\text{O}_2^{\cdot-}$. Cette production est le résultat de la fuite des électrons au niveau du cycle Q. En effet ces électrons peuvent réagir directement avec l'oxygène dissous et former les anions superoxydes radicalaires (figure 5) (5.67).

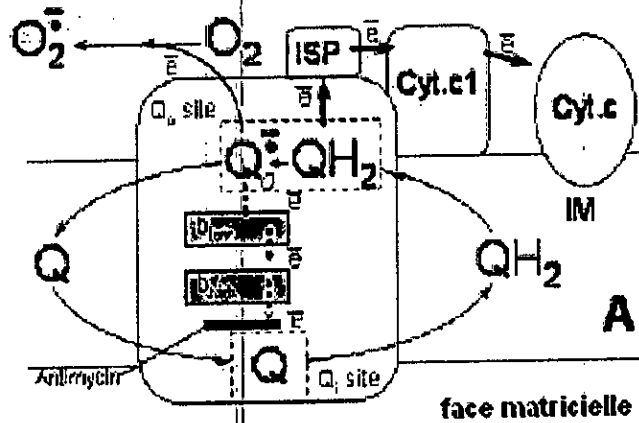


Figure 5. Mécanisme de la production du superoxyde au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (67).

Pour envisager ce cycle Q, il faut suivre le chemin parcouru par 2 molécules d'ubiquinol (QH₂) pénétrant simultanément dans le cycle (Figure 6). Les deux molécules QH₂ délivrent chacune un électron au cytochrome C₁ (via Fe-S) ce qui aboutit à la formation d'un anion ubisemiquinone (Q^{•-}) étape (i). Les protons libérés lors de cette réaction passent dans l'espace intermembranaire. Q^{•-} est alors oxydé en ubiquinone par le cytochrome b₅₆₆ - étape (ii). Une molécule d'ubiquinone (Q) produite par cette voie est alors réduite en ubisemiquinone par un électron du cytochrome b₅₆₂ (qui lui-même a été réduit par le cytochrome b₅₆₆) - étape (iii). Un second électron du b₅₆₂ réduit ensuite Q^{•-} en QH₂. L'autre molécule de Q formée à l'étape (ii) est réduite en QH₂ par le complexe I ou II ou par une autre flavoprotéine ubiquinone-réductase et le cycle peut alors continuer (Figure 6) (5.30).

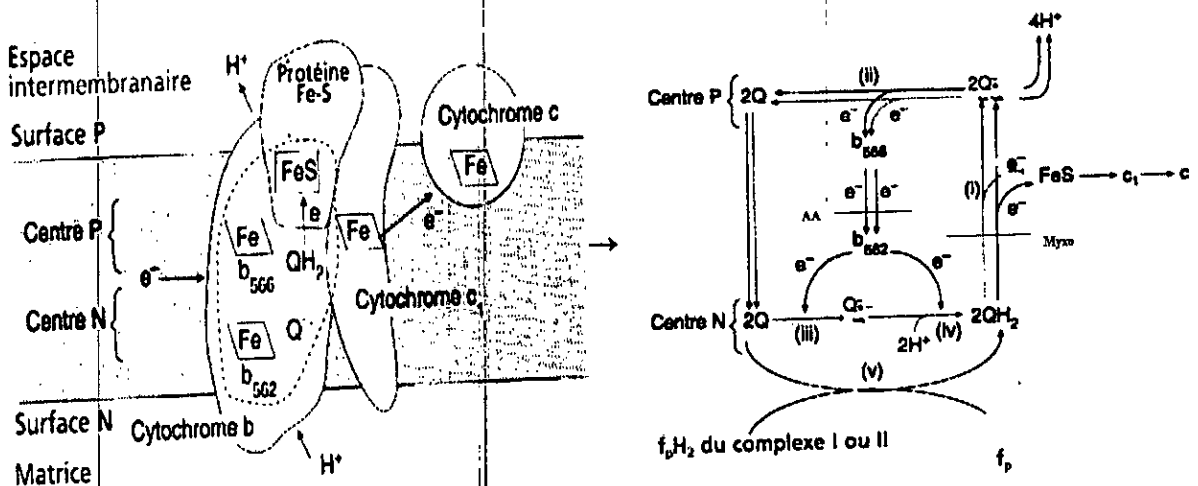


Figure 6. Cycle Q mécanisme d'action et inhibiteurs du complexe III (adaptée à partir de 30).

AA: Antimycine A, Myxo: Myxothiazol.

Les effets des inhibiteurs spécifiques du complexe III ont joué le rôle le plus important en déduisant le site et la source de la production des ROS au niveau de ce complexe. Le Myxothiazol (Myxo) empêche le flux des électrons de l'ubiquinol au centre Fe-S, inhibant ainsi la formation de l'ubisemiquinone. L'Antimycine A (AA) interrompt le transfert des électrons du cytochrome b_{562} à l'ubisemiquinone du centre N et cause de ce fait l'accumulation de la forme radicalaire instable qui cède un électron à l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde (28.39.41.86.87.88). Le Myxothiazol prévient l'effet de l'AA inhibant ainsi la production du superoxyde dans les mitochondries des mammifères (89.90). En absence de l'AA, la production du superoxyde par le complexe III est minime (100), et il est probable donc qu'*in vivo*, le complexe I est la source majeure de ROS lors du transfert normal des électrons et surtout à travers le transfert réverse. Plusieurs auteurs ont montré que le complexe I produit le superoxyde vers la face matricielle de la membrane interne tandis que le complexe III le génère vers les deux faces; matricielle et cytosolique (67.81):

II.5. Modulation de la production mitochondriale des ROS

Il est important de noter que la production mitochondriale est variable selon les tissus étudiés. Ce sont les mitochondries des tissus post-mitotiques qui présentent la production de ROS la plus élevée (91). Plusieurs auteurs ont montré que la production mitochondriale de ROS n'est détectable qu'après utilisation des inhibiteurs spécifiques du transfert d'électrons: la roténone pour les substrats liés aux $NADH_2$ et l'antimycine A pour les substrats liés aux $FADH_2$. Cette production est également régulée par des constituants de la membrane mitochondriale interne dits " protéines découplantes" (uncoupling protein, UCP) qui permettent la dissipation de l'énergie liée au potentiel électrochimique (92.93). Dans des macrophages surexprimants UCP2 la production de H_2O_2 est réduite. De plus les macrophages des souris dont de gène UCP2 a été invalidé produisent plus de ROS que les souris sauvage. Le débit de production des ROS est aussi fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire (28.94).

II.6. Les dégâts oxydatifs des ROS

Lorsque les moyens de défense sont débordés, l'équilibre prooxydant/antioxydant est perturbé, les ROS en excès vont donc endommager les macromolécules biologiques (lipides, protéines, glucides et acides nucléiques) entraînant ainsi des modifications irréversibles mais aussi des lésions secondaires due au caractère cytotoxique et mutagènes des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut réagir contre ces composés par

production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (5.28).

II.6.1. Peroxydation lipidique

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les radicaux libres et notamment le radical hydroxyle (5).

II.6.1.1. Mécanisme de la peroxydation lipidique et produits formés

Les membranes des mammifères sont riches en acides gras polyinsaturés et sont donc très sensibles au stress oxydant. Quel que soit l'événement déclencheur, la séquence par laquelle la lipoperoxydation survient peut se résumer en trois étapes distinctes: la phase d'initiation, la phase de propagation et la phase de terminaison (Figure 7) (64.95).

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne, initiée par l'attaque d'un radical R tel que le radical hydroxyle sur un acide gras insaturé (LH) par abstraction d'un atome d'hydrogène. Dans un environnement aérobie, l'oxygène s'additionne sur le radical lipidique pour donner le radical peroxy (LOO^\bullet). Une fois initié, le radical peroxy peut propager la réaction en chaîne de peroxydation par abstraction d'un atome d'hydrogène d'un autre acide gras insaturé. Les hydroperoxydes formés (LOOH) peuvent subir plusieurs modes d'évolution: être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane ...) qui, de par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. La coupure de la molécule LOOH peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde MDA et le 4-hydroxynonanal (HNE). Ces deux derniers ont été très étudiés et très utilisés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (64.95).

Ultimement, le système de propagation doit être arrêté. Cette étape de terminaison est atteinte lorsque deux radicaux libres se rencontrent et partagent de façon covalente leurs électrons ou lorsque des systèmes antioxydants entrent en jeu. A cette fin, la stratégie communément utilisée par la cellule consiste à former un composé stable électroniquement. Cette nouvelle structure électronique a un pouvoir réactif faible qui devra être régénéré sous sa forme antioxydante ou éliminé par l'organisme. C'est le cas notamment du tocophérol, de l'ascorbate et du système de glutathion (64.95).

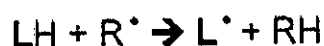
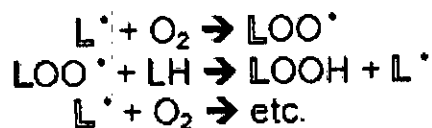
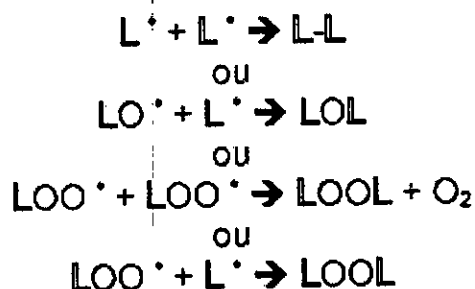
Phase d'initiation**Phase de propagation****Phase de terminaison**

Figure 7. Chaîne de la peroxydation lipidique (5).

R: radical libre, (LH) : acide gras insaturé, (LOO°): radical peroxyde, LOOH: hydroperoxyde, L-L et LOOL: composé stable électroniquement.

II.6.1.2. Métabolisme du MDA

Dans le foie, le MDA peut être transformé en CO₂ et H₂O par des métabolisations successives. Le MDA est converti en acide malonique semi-aldéhyde par l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale. Le semi-aldéhyde malonique se décarboxyle spontanément en acétaldéhyde qui est oxydé par l'acétaldéhyde déshydrogénase en acétate, ce dernier est ensuite métabolisé. Une partie du MDA peut être convertie en malonate qui est convertie en malonyl CoA et décarboxylé en acétyl CoA. Dans les urines, différents métabolites du MDA sont retrouvés, ils proviennent de la dégradation des conjugués (MDA-protéines, et MDA-désoxyguanosine). Le métabolisme du MDA est responsable de l'apparition du méthyle éthyle cétone dans les urines. Le MDA est donc rapidement métabolisé tout en perturbant le métabolisme et l'excrétion des autres métabolites des lipides (96.97).

II.6.1.3. Conséquences mitochondriales et cellulaires de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique déstabilise les membranes cellulaires et notamment la membrane interne des mitochondries au niveau de laquelle s'organise le transport des électrons, la

destruction de la bicouche phospholipidique des crêtes mitochondriales augmente la chute prématurée de ces électrons. Ce processus conduit à une surproduction des ROS. Un cercle vicieux peut ainsi s'initier. Il aboutira à la destruction de la cellule ou, pire, à la genèse des cellules dont l'ADN est muté. Les membranes deviennent rigides, perdent leur perméabilité sélective, et sous conditions extrêmes, peuvent perdre leur intégrité. Cependant récemment le groupe de Brand a observé que le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCPs et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale des ROS. Ce mécanisme pourrait être un moyen de régulation de la production des ROS par la mitochondrie lors d'une peroxydation lipidique afin de limiter les dommages mitochondriaux (28.98).

II.6.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont également des cibles pour les radicaux libres. Tous les acides aminés et surtout ceux qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) sont des cibles potentielles de l'attaque par les ROS, particulièrement par le radical hydroxyle (51).

II.6.2.1. Mécanisme et produits formés

Les modifications oxydatives des protéines par les ROS provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine. Ces réactions d'oxydation sont classées en deux catégories : D'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. De telles modifications conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique ou structurale des protéines affectés et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du proteasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression du groupement amine ionisable, soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales. Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation des canbonyles protéiques et des groupes nitrotyrosines (51.99).

II.6.2.2. Systèmes de réparation des protéines oxydés

A l'exception notable de l'oxydation des cystéines et des méthionines pour les quelles des systèmes spécifiques de réversion de l'oxydation ont été mise en évidence, l'oxydation des autres acides aminés apparaît comme un phénomène irréversible (99). Au niveau cellulaire, la dégradation des protéines oxydées est assurée principalement par le proteasome. Cependant les protéines les plus endommagées peuvent devenir résistantes à cette dégradation. Ainsi, il a été montré que les protéines modifiées par le 4-HNE devenaient non seulement résistantes à la

dégradation par le proteasome, mais qu'elles pouvaient également agir comme inhibiteur du proteasome pour la dégradation d'autres protéines oxydées (99.100). Les protéines oxydées vont être prises en charge également par des protéines spécifiques dites protéines du stress ou protéines de chocs thermique HSP (Heat Shock Protéin), qui permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide. Parmi ces protéines, les membres de la famille des HSP70 et des HSP72 (101).

II.6.3. Oxydation de l'ADN : Produits formés et systèmes de réparation

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Il existe deux types d'ADN dans la cellule: l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS. Ainsi le taux de bases oxydés serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADN mit par rapport à l'ADN nucléaire (28). Cinq classes principales des dommages oxydatifs médiés par $^{\circ}\text{OH}$ peuvent être générées. Parmi elles les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (102.103). Ces différents dommages sont fortement impliqués dans les phénomènes de cancérisation et du vieillissement, de même les mutations de l'ADNmt pourraient être impliquées dans les phénomènes de mort cellulaire. Le marqueur biologique de l'oxydation de l'ADN le plus largement utilisé est la détection des bases modifiées (28.104). L'élimination des lésions oxydatives de l'ADN est un mécanisme important pour limiter leurs effets mutagènes et cytotoxiques. Pour cela de nombreux systèmes de réparation de l'ADN sont utilisés par la cellule. Les bases oxydées sont éliminés essentiellement par deux mécanismes : La réparation par excision de bases (BER, Base Excision Repaire) ou par excision de nucléotides (NER, Nucléotides Excision Repaire) (28.105).

II.6.4. Oxydation des carborydrates

Si la chimie de l'attaque radicalaire des carborydrates a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les ROS attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Le radical $^{\circ}\text{OH}$ réagit avec les carborydrates en enlevant un proton hydrogène d'une des atomes de carbone formant ainsi un radical carboné centré. Par ailleurs le glucose peut s'oxyder dans les conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et $^{\circ}\text{OH}$, qui entraîneront les coupures des protéines ou leurs glycation par attachement du cétoaldéhyde (ce qui conduit chez les diabétiques à la fragilité des parois vasculaires et de la rétine) (51).

II.7. Systèmes de défense contre les ROS

Les radicaux libres se produisent spontanément et d'une manière continue au sein de notre organisme, les types de ces radicaux produits ainsi que leurs lieu de production et de propagation étant variés, la rapiste antiradicalaire est heureusement polymorphe à la fois préventive et curative. Un antioxydant peut être définie comme toute substance qui est capable, à concentrations relativement faibles, d'entrer en compétition avec d'autres substances oxydables et ainsi ralentir ou inhiber leur oxydation. cette définition s'applique à un grand nombre de substances comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques mais aussi de petites molécules lipo-ou hydrosolubles. Les antioxydants cellulaires sont donc enzymatiques et non enzymatiques (28.106).

II.7.1. Les antioxydants enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et réductase et la catalase. Plus récemment, d'autres enzymes ayant des propriétés antioxydantes ont été révélées, les thioredoxines peroxydases (67).

II.7.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Comme son nom l'indique, la SOD est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Il existe trois isoformes de la SOD: Une forme cytosolique, nucléaire et extracellulaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une autre forme associée au fer (Fe-SOD), prépondérante chez les bactéries et les plantes (28.107).

La SOD mitochondriale, située exclusivement dans la matrice, permet la dismutation quasi-instantanée de l' $O_2^{\cdot -}$ produit au niveau de la chaîne des transporteurs des électrons protégeant ainsi cette organite contre l'attaque des ROS (108). Les souris dépourvues de cette enzyme dite « Mn-SOD knockaut » ne survivent que quelques jours après la naissance tandis que celles qui possèdent seulement 50% d'activité de cette enzyme sont viables et fertiles. Si la Mn-SOD semble indispensable à la vie, ce n'est pas le cas pour la forme cytosolique même si celle ci joue un rôle important dans l'élimination des ROS (67.109). L'activité de cette enzyme est inégalement distribuée dans les tissus. Chez les souris, l'activité dans le foie et les reins est la plus élevée, suivi par celle du cerveau et du cœur, des muscles et de la rate, et en derniers lieu les poumons avec la plus faible activité (20 fois inférieurs que dans le foie) (67).

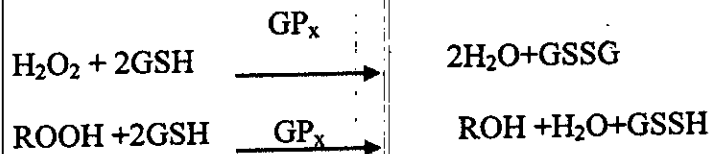
II.7.1.2. La catalase

C'est une enzyme à hème qui agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Dans les tissus,

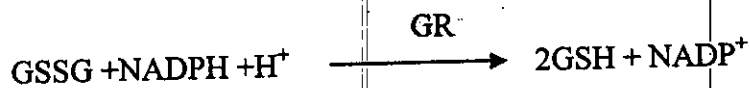
l'activité de la catalase est la plus haute dans le foie suivie des reins, des poumons, du cœur et du cerveau (110). Cette enzyme est contenue dans les peroxysomes, le cytoplasme et les mitochondries. Dans le cœur certains auteurs pensent qu'elle est présente dans les mitochondries seulement, où elle constitue 0,025% des protéines totales. La contribution de cette enzyme est non significative par rapport à celle de la glutathion peroxydase, une autre enzyme détoxifiant le peroxyde d'hydrogène (111).

II.7.1.3. La glutathion peroxydase et réductase (Gpx) et (GR)

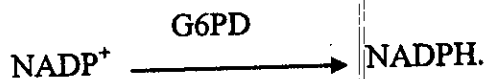
La glutathion peroxydase (Gpx) est la plus importante enzyme détoxifiant l' H_2O_2 chez les mammifères. C'est une enzyme à sélénium présente dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau. Le rôle de cette enzyme est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et d'autre part les hydroperoxydes organique (ROOH) en alcool. Lors de cette réaction qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celle-ci se transforme en glutathion disulfure (GSSG) (51.67) :



La glutathion réductase (GR), localisée également dans le cytosol et dans les mitochondries, quand à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH (64.67) :



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



Au niveau de la mitochondrie, le NADPH est renouvelé par une enzyme appelée isocitrate déhydrogénase $NADP^+$ dépendante (1). La GPx mitochondriale est localisée au niveau de la matrice et dans l'espace intermembranaire. L'activité enzymatique de cette enzyme est la plus haute dans le foie, le rein et le cœur et s'abaisse légèrement dans les mitochondries du cerveau et des muscles squelettiques (67).

II.7.1.4. Les thioredoxines peroxydases (Prx)

Les thioredoxines peroxydases (Prx) ont été découvert récemment et font l'objet de nombreux travaux concernant leurs fonctions antioxydantes (67). Elles sont au nombre de six chez les

mammifères et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les péroxysomes, associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant à travers une activité peroxydase, où l' H_2O_2 , le peroxy-nitrite et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Ils jouent un rôle très importants dans la détoxification vue leur quantité importante (0,1 à 0,8% de protéines solubles cellulaires) et leur large distribution dans la cellule (28).

Deux isoformes de la thiorédoxine peroxydase (Prx 3 et Prx 5) ont été trouvées dans les mitochondries des mammifères. La Prx 3 est omniprésente dans divers tissus de rats, elle est présente en grande quantité dans le cœur et la glande surrénale suivie du foie et du cerveau. La Prx 5, le plus nouveau membre de cette famille, est omniprésent dans les tissus des bovins, avec le plus haut niveau dans les testicules (67).

II.7.3. Les antioxydants non enzymatiques

II.7.3.1. Le cytochrome C

L'espace intermembranaire mitochondrial contient environ 0,7 mM du cytochrome C capable d'éliminer l'anion superoxyde. Le cytochrome c peut être alternativement réduit par l'anion superoxyde et régénéré ensuite par son accepteur normal d'électron la cytochrome-C oxydase (67). Cette capacité fascinante de ce système de défense, de produire l'énergie tout en détoxifiant l'anion superoxyde potentiellement nocif lui a gagné le titre d' "antioxydant idéal". Les propriétés antioxydantes du cyt-C ont été confirmées *in vitro*, mais le rôle physiologique et l'efficacité *in vivo* de ce système piègeur du superoxyde restent à explorer (67).

II.7.3.2. Le NADPH

Quelques auteurs présumant que le NADPH peut servir comme antioxydant non enzymatique direct. Les mitochondries des mammifères contiennent des concentrations élevées du NAD (P)H (environ 3-5 mM de chacun), qui en captant les radicaux centrés de l'oxygène, empêchent les dommages aux protéines et à l'ADN mitochondrial (67).

II.7.3.3. L'ubiquinone ou le CoQ

L'ubiquinone est connue pour son rôle vital dans la production d'énergie, il transfère les électrons entre le complexe I et le complexe III de la mitochondrie. Il possède également des propriétés antioxydantes intéressantes en protégeant les protéines et les lipides des membranes mitochondriales et cellulaires contre la peroxydation aussi efficacement que la vitamine E, ainsi, l'ubiquinone empêche l'initiation et la propagation de la peroxydation lipidique tandis que la vit-E inhibe seulement sa propagation. L'étude du rapport CoQ_{H_2}/CoQ est nécessaire pour évaluer l'importance de l'ubiquinone dans la protection contre l'agression par les ROS (113.114).

II.7.3.4. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide simple (L-gamma- glutamyl- L- cysteinyl- glycine), présent dans toutes les cellules des mammifères, et dans un grand nombre de types cellulaires chez les autres espèces animales. Les propriétés du glutathion sont principalement due à la présence du groupement fonctionnel sulfhydryle ; c'est pourquoi le glutathion réduit est souvent écrit " GSH " et le glutathion oxydé formé de deux molécules de GSH, " GSSG". Plus de 90% du glutathion existe sous la forme réduite (30).

La mitochondrie contient environ 10 à 12 % de la quantité totale du GSH cellulaire, mais vu le volume relativement petit de la matrice, la concentration en GSH mitochondriale est légèrement plus haute à celle dans le cytoplasme, la concentration mitochondriale est dans la gamme de 2 à 14 mM. Ces concentrations changent selon l'état, l'age et le tissu métabolique (67). La mitochondrie est dépourvue des enzymes nécessaires à la synthèse de ce peptide, le GSH mitochondrial est donc transporté à partir du cytosol et ce en utilisant plusieurs systèmes de transport, tels que les transporteurs spécialisés à faible et à haute affinité (low and high affinity GSH transporters) et les porteurs, dicarboxyliques et 2-oxoglutarate (67). Le GSH est considéré comme le principal antioxydant propre à la cellule en se liant directement par son pôle SH aux radicaux libres, mais il est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase et permet donc l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes, prévenant ainsi la peroxydation lipidique. Une déplétion du GSH mitochondrial est létale alors que celle du cytosol n'affecte pas la viabilité cellulaire (64,67).

Le métabolisme et les fonctions antioxydantes du GSH sont représentés dans la figure 8 ci-dessous.

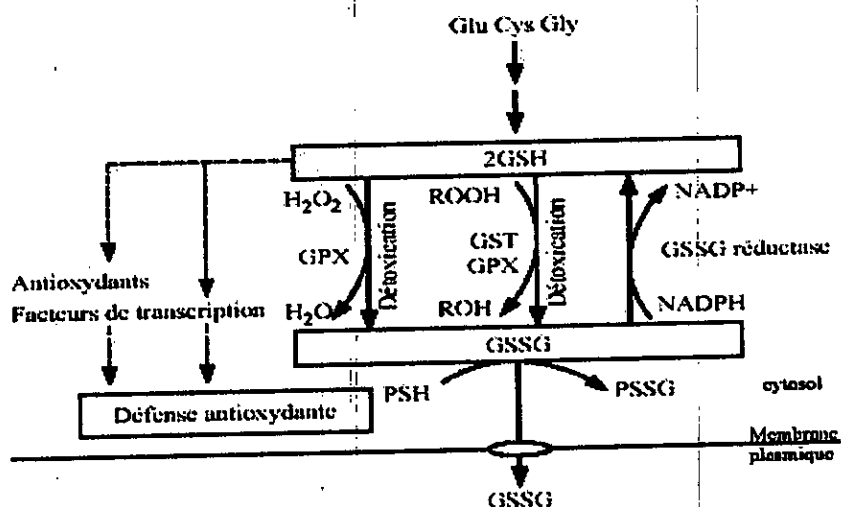


Figure 8. Métabolisme et fonctions antioxydantes du GSH dans la cellule (115).

Le GSH est consommé soit par une GPx cytosolique, soit par les GST et GPx pour réduire le peroxyde d'hydrogène ou les peroxydes organiques générés par le métabolisme aérobie, respectivement. Pour maintenir l'équilibre redox cellulaire, le GSSG est réduit en GSH par la GSSG réductase aux dépens du NADPH, formant ainsi un cycle redox. Dans des conditions sévères de stress oxydant, la capacité de la cellule à réduire le GSSG en GSH peut être dépassée induisant alors son accumulation dans le cytosol. Pour maintenir l'équilibre redox cellulaire, le GSSG est activement exporté ou conjugué à un thiol protéique (PSH) pour former un conjugué mixte disulfure (PSSG).

II.7.3.5. Les thiorédoxines

Les thiorédoxines (Txn) sont de petites protéines (12 KD) douées d'une activité intrinsèque d'oxydoréduction comme toutes les protéines à groupements thiol (-SH). Elles sont capables de réduire les ROS. Trois variants de la thiorédoxine ont été clonés et caractérisés: Txn₁ cytosolique, Txn₂ localisation mitochondriale et Txn₃ expression spécifique au niveau des spermatozoïdes. Une fois oxydée la Txn est réduite par la thiorédoxine réductase (52).

II.7.3.6. Les métallothionéines

Les métallothionéines sont de petites protéines constituées d'une trentaine d'acide aminés, dont un tiers sont des cystéines. La première fonction décrite pour ces protéines est la détoxification des métaux lourds. Leur rôle comme antioxydant est démontré dans les différents cas du stress oxydant tel le stress induit par la doxorubicine. Ces protéines étaient capables d'éliminer le radical hydroxyle, de chélater les ions fer et cuivre et de limiter ainsi la réaction de Fenton (52.116).

II.7.3.7. La vitamine E

Sous le terme de vitamine E est regroupée la famille des tocophérols (Alpha, Bêta, Gamma et Delta), ce sont les alpha et les gamma qui possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes. La vitamine E comme l'ubiquinone, est concentré dans les membranes où elle est particulièrement efficace pour limiter la peroxydation lipidique. Elle peut intervenir donc

directement au niveau des membranes où elle piège les radicaux libres avant qu'ils n'atteignent leurs cibles ou en stoppant la chaîne de la peroxydation lipidiques. La vit E devient alors à son tour un radical et pourra être pris en charge par une autre molécule antioxydante tel l'ubiquinone ou la vitamine C (28.52.113).

II.7.3.8. Autres antioxydants non enzymatiques

Dans le milieu hydrosoluble, plusieurs molécules semblent avoir un pouvoir antioxydant. C'est notamment le cas de la vitamine C ou l'acide ascorbique ; excellent piègeur des ROS et qui protège les substrats de la cellule de l'oxydation, mais cette vitamine pourrait aussi avoir des propriétés pro oxydantes (117).

Le fer et le cuivre sous forme libre étant particulièrement prometteurs de dommages radicalaires, ces métaux sont physiologiquement séquestrés et transportés grâce à des protéines dites chélateurs des ions, comme la transferrine, la ferritine, la lactoferrine, la cerruloplasmine et l'albumine,...qui agissent tant qu'antioxydants primaires (64).

L'acide urique, produit terminal majeur du métabolisme des purines, possède une activité antioxydante majeure. Il peut interagir, à concentration physiologique, avec les ROS et notamment en piégeant l' $O_2^{\cdot-}$ et $^{\cdot}OH$, il apparaît comme étant l'antioxydant plasmatique le plus efficace en terme de réactivité avec les ROS, toute fois, il n'est pas actif contre les radicaux lipidiques (118).

Les oligoéléments qui ont une origine nutritionnelle (Zinc, cuivre, sélénium, Magnésium...) participent au processus de défense contre les ROS comme cofacteur des enzymes antioxydantes. Le déficit en un ou plusieurs de ces oligoéléments résulte généralement en une sensibilité plus accrue au stress oxydant et au développement des maladies liées aux radicaux libres.

Ces antioxydants sont complétés par l'apport alimentaire d'autres substances telles, les caroténoïdes et les flavonoïdes essentiellement. Il en résulte, grâce à ces agents protecteurs, une certaine tolérance de l'organisme vis-à-vis du stress oxydatif (64).

Les principales sources et systèmes de détoxification des ROS dans la mitochondrie sont représentés dans la figure 9 ci-dessous.

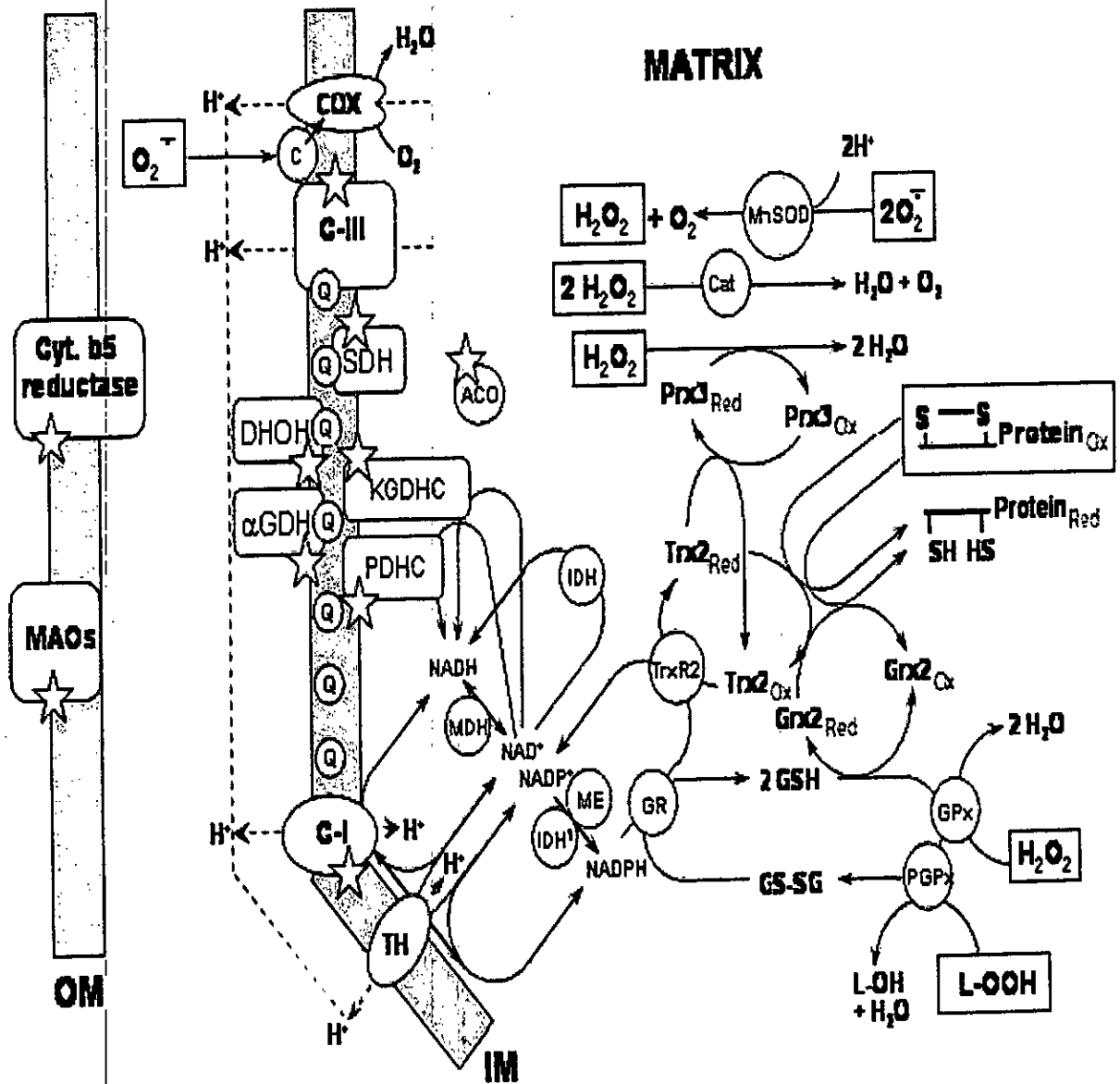


Figure 9. Principaux sources et système de détoxification des ROS dans la mitochondrie (67).

ACO) aconitase; Prx3_{red}) peroxyredoxine réuit; Prx3_{ox}) peroxyredoxin oxydé; Q) coenzyme Q; DHOH) dihydroorotate déhydrogenase; KGDHC) alpha-ketoglutarate déhydrogenase complex; alphaGDH) alpha-glycerophosphate déhydrogenase; PDHC) pyruvate déhydrogenase complex; IDH) isocitric déhydrogenase; Trx2_{red}) thioredoxin-2 réuit; Trx2_{ox}) thioredoxin-2 oxydé; Grx2_{red}) glutaredoxin-2 réuit; Grx2_{ox}) glutaredoxin-2 oxydé; TrxR2) thioredoxin-2 réductase; MDH) malate déhydrogenase; IDH¹) isocitrate déhydrogenase; GR) glutathion réuit; GSH) glutathion réuit; GS-SG) glutathion oxydé ; GPx) glutathion peroxydase; PGPx) phospholipid hydroperoxide- glutathion peroxydase; C-I) Complexe I; TH) transhydrogenase; Cyt. b5 réuitase) cytochrome b5 réuitase; MAOs) monoamine oxydase A and B; OM) membrane mitochondriale externe; IM) inner mitochondrial membrane. ROS species that are detoxified by the corresponding systems are shown enclosed in a square frame; asterisks indicate sources of ROS.

II.8. Intervention des ROS au cours des processus physiologiques

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De léger 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 désorganiseront les membranes, entraînant des lyses immédiates. Le paradoxe des radicaux libres en biologie est donc, qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, 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 (51).

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction des signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certaines neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation de gènes ; phénomène appelé contrôle redox de gènes (51.52). La phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production de ROS si brutale et intense qu'elle est connue, sous le nom de "*Burst oxydatif*" c-à-d explosion respiratoire. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase et l'action de la SOD et la NO synthase, aboutissent à la formation d'un mélange très corrosif de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $ONOOH$ qui détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens (51).

Les radicaux libres constituent aussi un système de transmission de signaux, ce système est présent chez les êtres unicellulaires, et il s'est conservé chez les êtres évolués, y compris, les mammifères qui se sont dotés de systèmes de production des radicaux libres et de systèmes de détection et de transduction du signal. Les ROS peuvent donc être considérés comme des messagés intra- et extracellulaires. Ils permettent d'induire la réponse cellulaire à de nombreux stress: thermiques, ultraviolets et xénobiotiques, permettant l'expression des gènes de défense et la modulation de l'expression des gènes codants 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 des HSP70 alors que ceux de la Cu-Zn SOD et la glutathion peroxydase sont peu inductibles (76.119)

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. Ceci explique la régulation très fine du génome antioxydant et de ces mécanismes d'adaptation. La thérapeutique antioxydante ne doit pas oublier ces activités utiles des radicaux libres sous peine d'échec, voire d'effets toxiques paradoxaux (51).

III. La mitochondrie et l'apoptose

III.1. Définition de l'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. Elle constitue un des domaines de recherches récentes qui permettent de mieux comprendre pourquoi il y a si peu de cancers, compte tenu du nombre incroyable de mitoses dans l'organisme et des mécanismes précis qui les contrôlent. L'apoptose est donc nécessaire au développement et au maintien du bon fonctionnement de tout organisme vivant. Elle joue un rôle important dans l'embryogenèse, dans les changements morphologiques, dans l'homéostasie cellulaire, dans la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs. Malheureusement, le dérèglement de ce processus soit par activation excessive soit par défaut d'intervention est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies (cancers, maladies neurodégénératives, SIDA...) (120.121.122.123).

Le mot «apoptose» a été introduit en 1972 par Kerr et ses collaborateurs, et fait référence à la chute programmée des feuilles en automne (du grec *apo* pour éloignement, *ptose* pour chute) (121). L'apoptose, type de mort cellulaire actif, désigne une séquence de modifications morphologiques caractéristiques: Condensation du cytoplasme et de la chromatine, fragmentation de la cellule et du noyau en corps apoptotiques qui sont ensuite relargués, et vont être phagocytés sans aucune réaction inflammatoire, par opposition à la nécrose qui est une mort incontrôlée, violente et rapide, se manifeste souvent comme un éclatement immédiat de la cellule provoquant l'effondrement de l'homéostasie interne et est associée à des réactions inflammatoires (120.121).

Le processus apoptotique peut être subdivisé en trois phases distinctes: La phase d'initiation dépendante de la nature de la stimulation et du type cellulaire ciblé par cette dernière, la phase de régulation dépendante de l'activité des protéines de la famille Bcl-2, et la phase d'exécution qui dépend de l'activité de protéases à cystéine ou caspases. Ces deux dernières phases sont en

relation étroite avec l'activité de la mitochondrie. Lors de ce processus la membrane mitochondriale est perméabilisée d'une manière ou d'une autre, provoquant la libération de substances activatrices des caspases comme le cytochrome c ou l'AIF régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (1124.125.126).

III.2. Acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose

III.2.1. Les caspases

Les caspases sont des médiateurs importants de la mort cellulaire. Ce sont des cystéines protéases spécifiques de l'acide aspartique. Le terme caspase a été proposé par Alnemri et ses collaborateurs (127), le "C" représente la cystéine du site actif et "aspase" définit la spécificité stricte de clivage de ces protéases, après un acide aspartique (121). 14 caspases différentes ont été mises en évidence jusqu'à présent. Ces caspases peuvent être subdivisées en caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10), responsables du déclenchement des cascades d'activation des caspases, permettant de ce fait d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques, et en caspases effectrices (caspase 3, 6, 7 et 14) qui dégradent les substrats cellulaires spécifiques (127.128). Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. L'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène. Cependant, il est à noter que très peu de données sont disponibles sur les fonctions de plusieurs caspases et que leurs rôles demeurent encore controversés.

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 est une autre stratégie puissante dans la thérapie du cancer (121.129.1130.131).

III.2.2. Les membres de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins) sont des acteurs clés de la perméabilisation mitochondriale. Cette famille, contenant environ 15 membres, peut être divisée en 2 groupes en fonction de leur activité : les protéines possédant une activité antiapoptotique (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w...) sont en partie localisés au niveau de la membrane externe mitochondriale empêchant de ce fait la dissipation du potentiel membranaire ainsi que la libération du cytochrome c et de l'AIF, et les protéines possédant une activité proapoptotique (Bax, Bid, Bad...) et qui puissent directement induire ces modifications (132.133.134).

Toutes les protéines de la famille Bcl-2 contiennent un domaine carboxy-terminal hydrophobe de 20 acides aminés permettant leur ancrage dans les membranes intracellulaires au niveau de la mitochondrie mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau. La fonction principale de ces régulateurs est de contrôler la libération des facteurs proapoptotiques, comme le cytochrome c, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol (121.135.136).

III.3. Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales lors de l'apoptose

Plusieurs modèles peuvent expliquer le relargage des solutés de la mitochondrie vers le cytosol, étape correspondante à la phase effectrice de l'apoptose.

III.3.1. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale MPTP

Ce MPTP est un canal non sélectif pouvant être formé par l'apposition de protéines transmembranaires résidant au niveau de la membrane interne et au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Les différentes études réalisées montrent que ce pore est principalement formé par l'association de l'ANT (transporteur de nucléotides adenyliques), du VDAC (canaux anioniques voltage dépendant) et de la cyclophiline D (Cyp D), une protéine de la matrice (Figure 10) (8.44).

L'ouverture du pore peut être induite par différents effecteurs physiologiques comme le calcium, la diminution de la concentration en adénine nucléotide ou en phosphate inorganique, la production de radicaux libres oxygénés ou le changement de pH. De plus, les membres de la famille Bcl-2 peuvent réguler l'ouverture du pore : Bcl-2 peut prévenir cette ouverture alors que Bax provoque une chute du potentiel membranaire mitochondrial et en favorise l'ouverture (8.137.138). L'ouverture du pore augmente la perméabilité de la membrane interne mitochondriale vis-à-vis de protéines de poids moléculaire inférieur à 1,5 kda. Ceci entraîne une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, un déséquilibre chimique entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale, ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative, provoquant alors un gonflement osmotique pouvant conduire à la rupture de la membrane externe (120.139).

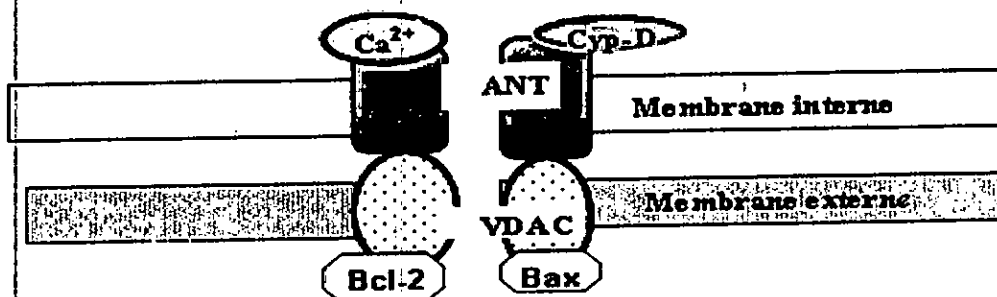


Figure 10. Principaux composants du pore de transition de perméabilité mitochondriale PTP (44).

III.3.2. La rupture de la membrane externe mitochondriale

Ce modèle implique l'hyperpolarisation de la membrane interne précédant la libération du cytochrome C dans certains systèmes. Cette hyperpolarisation résulterait de l'incapacité de l'échange entre l'ADP cytosolique et l'ATP mitochondrial. Cet échange est normalement effectué par les canaux anioniques voltage-dépendant ou VDAC localisés au niveau de la membrane externe et par le transporteur de nucléotide adénylique ou ANT localisé au niveau de la membrane interne. Cette absence d'échange semble inhiber l'activité de la F1F0-ATPase, ce qui empêche le retour des ions H^+ vers la matrice et par conséquent contribue à l'hyperpolarisation. Une telle augmentation du potentiel membranaire mitochondrial peut être à l'origine du gonflement osmotique de la matrice conduisant à la rupture de la membrane externe mitochondriale et au déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose (138).

III.3.3. Le pore formé par les membres de la famille Bcl-2

L'hypothèse d'un canal pouvant laisser passer les protéines apoptogènes de l'espace intermembranaire mitochondrial est étudiée. Ce canal pourrait être formé par certains membres de la famille Bcl-2 compte tenu de la forte homologie de Bcl-X_L avec la sous-unité de la toxine diphtérique, capable de former un pore membranaire. Il a été suggéré que les protéines de la famille Bcl-2 comme Bax pouvaient s'insérer au niveau de la membrane externe mitochondriale et s'oligomériser pour former un canal mais le fait qu'un tel canal puisse être assez gros pour laisser passer de petites protéines reste à démontrer (121).

III.4. Mécanismes moléculaires et différentes voies de l'apoptose

Il existe aujourd'hui plusieurs voies principales de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. Une autre voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort (57).

III.4.1. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

De nombreux stimuli, comme les agents thérapeutiques, les radiations UV, les molécules du stress, le manque de facteurs de croissance, semble induire l'apoptose par la voie mitochondriale. L'espace intermembranaire contient le cytochrome c, certaines procaspases (2, 3 et 9), les protéines Smac/Diablo, AIF et endonucléase G. La perméabilisation des membranes externe et interne provoque la dissipation du potentiel membranaire et le relargage de toutes ces protéines

proapoptotiques dans le cytoplasme. La mitochondrie peut alors développer deux voies apoptotiques: l'une dépendante des caspases, l'autre est indépendante (1140).

III.4.1.1. La voie mitochondriale dépendante des caspases

La libération du cytochrome c constitue l'étape majeure de l'induction de l'apoptose par cette voie.

➤ Le cytochrome c

Le cytochrome c est codé par un gène nucléaire et est synthétisé sous forme de précurseur qui est incapable de participer à l'induction de l'apoptose. Ce précurseur est importé dans la mitochondrie où il subit une maturation. Le cytochrome c est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial où il exerce sa fonction physiologique de transporteur d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (141). En 1996, Liu et ses collaborateurs ont montré que le cytochrome c était nécessaire à l'activation de la caspase-3. Il est désormais établi que le cytochrome c relargué dans le cytosol est à l'origine de la formation de l'apoptosome. Tout récemment, l'inactivation du gène codant pour le cytochrome c a confirmé l'importance cruciale de cette protéine dans l'apoptose. Ces études montrent qu'aucune autre protéine cellulaire ne peut remplacer le cytochrome c pour l'oligomérisation d'Apaf-1 et pour l'activation de la caspase-3, induite par un stress cellulaire ou par un agent ciblant la mitochondrie. (1142.143).

➤ Processus apoptotique

L'augmentation de la perméabilité de la membrane interne de la mitochondrie aboutit à son gonflement par entrée massive de soluté à l'intérieur de la matrice et une altération de la membrane externe suffisante pour libérer les produits de l'espace intermembranaire entre autre le cytochrome c. L'oligomérisation du cytochrome c, et de l'APAF-1 en présence d'ATP permet le recrutement de la procaspase 9 pour former un très gros complexe (700 à 1400 KDa) appelé apoptosome (Figure 11), au sein duquel la procaspase 9 s'active et amorce une cascade des caspases en clivant les caspases 3 et 7, protéases effectrices majeures de l'apoptose responsable de la fragmentation de l'ADN nucléaire et à l'autodestruction cellulaire (140).

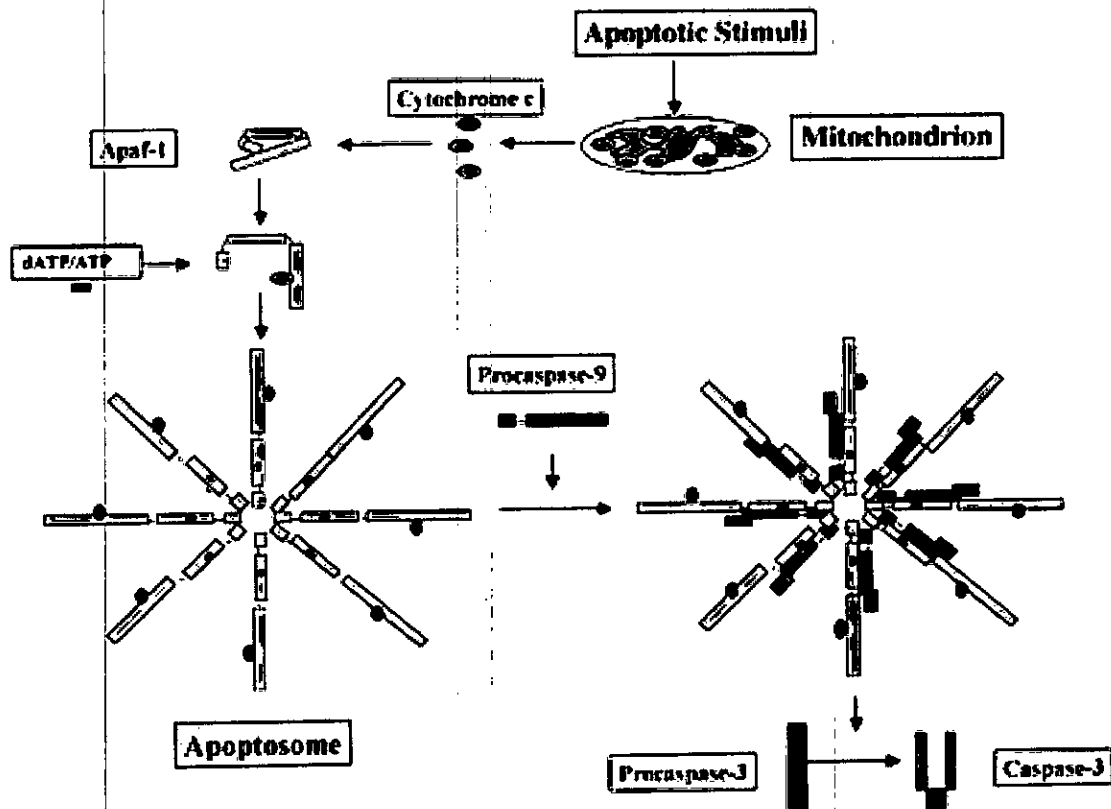


Figure 11. Formation de l'apoptosome, activation des caspases et induction du processus apoptotique (144).

III.4.1.2. La voie mitochondriale indépendante des caspases

Plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases. C'est le cas du facteur d'induction apoptotique AIF et de l'endonucléase G qui, une fois libérés de la mitochondrie, sont transloqués dans le noyau provoquant une condensation de la chromatine et la coupure de l'ADN en larges fragments (Figure 12) (140).

➤ La protéine AIF

C'est une protéine bifonctionnelle ayant probablement une activité oxydoréductase et un rôle proapoptotique. Après exposition de la cellule à un stimulus proapoptotique, l'AIF se transloque de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Les effets de l'AIF en tant que molécule apoptogène ont été étudiés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. *In vitro*, il a été montré que l'AIF génère une condensation périphérique de la chromatine par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence. De plus, l'AIF provoque en présence d'extraits cytosoliques une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et par conséquent la libération du cytochrome c et de la procaspase 9. *In vivo*, les mêmes observations (condensation, fragmentation, libération de protéines mitochondriales) ont été observées (140).

➤ L'endonucléase G

L'endonucléase G est une nucléase mitochondriale non spécifique très conservée chez les eucaryotes. Elle est codée par un gène nucléaire et probablement impliquée dans la réplication du génome mitochondrial. Pendant l'apoptose, l'endonucléase G est relarguée de la mitochondrie et transloquée dans le noyau. Elle digère l'ADN en absence d'activité caspase et en absence de nucléase caspase-dépendante générant ainsi des fragments d'ADN de haut poids moléculaire mais également des fragments oligonucléosomiques (140).

III.4.2. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

Le sentier extrinsèque implique une réception du signal au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs récepteurs connus appartiennent à la famille des récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor) tels que Fas, TNF-R1 (Tumor Necrosis Factor Receptor) ou TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Une fois le message perçu, la transmission s'effectue par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain). Cette protéine possède deux domaines d'interaction, l'un nommé DD (Death Domain) pour le récepteur et l'autre domaine nommé DED (Death Effector Domain) qui interagit avec la caspase-8. L'activation subséquente des caspases-3, 6 et 7 par un clivage protéolytique de la caspase-8 induit l'autodestruction cellulaire en clivant les composantes essentielles au maintien de la vie cellulaire (35.140.143).

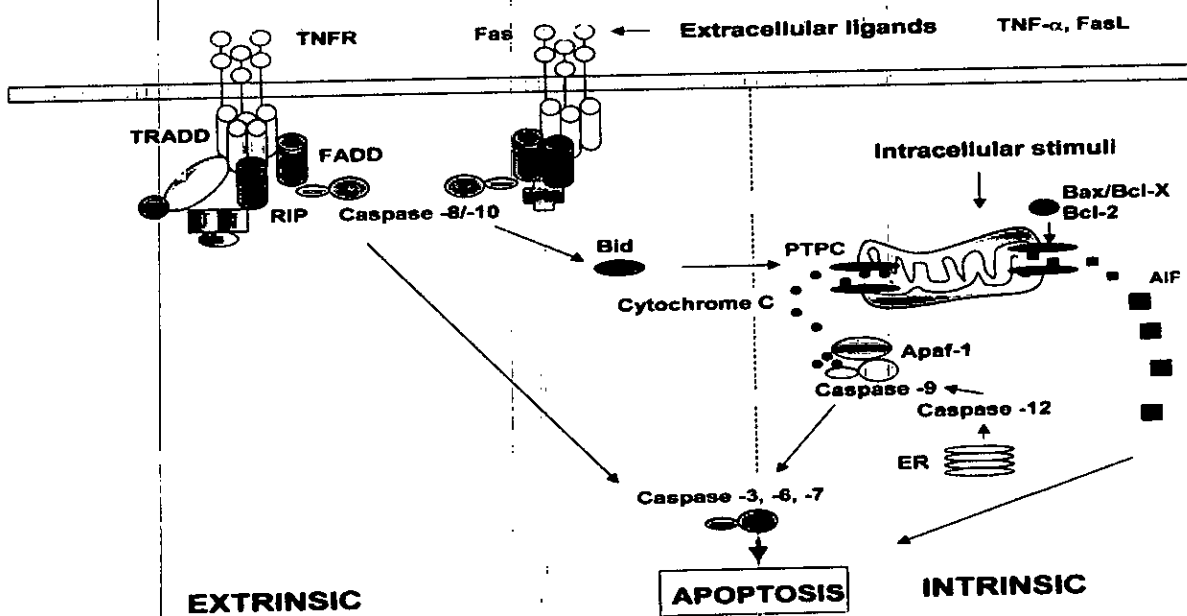


Figure 12. Voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose et les facteurs libérés de la mitochondrie lors du processus apoptotique (139).

III.5. Régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose

III.5.1. Les protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs

Les IAPs sont des protéines qui inhibent la mort cellulaire en empêchant le clivage des caspases. L'XIAP (X-linked inhibitor-of-apoptosis protein) est l'une des molécules les mieux connues de cette famille; elle peut inhiber l'activation de la caspase 9 initiateur ainsi que celle des caspases effectrices 3 et 7. En effet, elle peut se lier à la caspase 9 active et l'empêcher d'agir sur la procaspase 3 ou encore séquestrer la procaspase 3 au niveau de l'apoptosome par simple liaison, ce qui bloque la voie apoptotique (140).

III.5.2. La protéine Smac/DIABLO inhibitrice des IAPs

Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase) et son homologue DIABLO (Direct IAP Binding protein with Low pI) sont des protéines identifiées récemment et qui bloquent l'activité antiapoptotique des IAPs et par conséquent l'activation des caspases. La protéine Smac/DIABLO est fortement exprimée dans le coeur, le foie, les reins, la rate et dans plusieurs lignées cancéreuses. Smac/DIABLO interagit avec les IAPs et empêche leurs liaisons aux caspases 3, 7 et 9 (140).

III.5.3. Autres protéines régulatrices

Les membres de la famille Bcl-2 peuvent également réguler la voie mitochondriale en agissant sur le relargage du cytochrome c mais aussi en se liant à Apaf-1. La régulation de l'apoptose par ces protéines résulte du niveau d'expression entre protéines pro- ou anti-apoptotiques, les cellules exprimant plus de protéines proapoptotiques seront sensibles à la mort, les autres seront résistantes (133,134). Les protéines de choc thermique ou Hsp sont aussi des inhibiteurs de l'apoptose. Différentes études montrent que Hsp-70 et Hsp-90 peuvent se lier au domaine de l'Apaf-1, l'empêchant ainsi de s'oligomériser et d'activer la procaspase 9. Hsp-27 bloque l'oligomérisation de Apaf-1 en se liant au cytochrome C (140).



VI. Mitochondrie, stress, apoptose et pathologies humaines

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution, le premier responsable de ces maladies est la mitochondrie par la production excessive des ROS. La plupart de ces maladies apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de ROS et par conséquent l'apoptose (51).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en supprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. Il joue également un rôle dans l'apparition des autres facteurs athérogènes telle l'augmentation de la résistance à l'insuline et activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs prooxydants. C'est l'association de plusieurs facteurs: carence en antioxydants, surcharge en facteurs prooxydants et des facteurs génétiques qui aboutira au mécanisme pathogène (51). Parmi les maladies liées au stress, au dysfonctionnement mitochondriale et/ou à l'apoptose conséquences du stress oxydant, on peut citer:

VI.1. Le vieillissement

Le vieillissement est caractérisé par l'augmentation de la production mitochondriale de ROS, la modification du potentiel redox, déplétion de GSH et de l'ATP. Ces changements facilitent la peroxydation lipidique et l'ouverture du PTP. La théorie radicalaire du vieillissement " Free radical theory of aging" proposée par Harman relie la sénescence au dommage des radicaux superoxydes et des autres ROS générés lors de la respiration mitochondriale (145). Cette théorie postule que les altérations au hasard de l'ADNmt sont responsables du déclin énergétique accompagnant la sénescence. Une autre théorie, 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. Généralement, il est accepté que les capacités des systèmes antioxydants diminuent avec l'âge, ce qui a pour conséquence la perte progressive de l'équilibre de la balance antioxydant- prooxydant et l'accumulation des dommages oxydatives. 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 (145.146).

VI.2. L'ischémie-réperfusion

L'ischémie correspond à l'interruption ou à la réduction de l'irrigation sanguine d'un tissu ou d'un organe. Durant l'épisode d'ischémie, l'interruption de la circulation sanguine engendre une diminution de la phosphorylation oxydative, et par conséquent une baisse de la concentration d'ATP. Celle-ci provoque une inhibition des pompes Na^+/K^+ -ATP- dépendantes aboutissant à une élévation du Ca^{++} cytosolique. Dans un premier temps, l'absence d'oxygène ne semble pas délétère puisqu'elle inhibe le fonctionnement de la chaîne respiratoire et abaisse le potentiel de la membrane interne ce qui limite l'entrée du Ca^{++} dans la mitochondrie, mais lorsque le tissu est reperfusé, l'arrivée massive d'oxygène provoque une brusque reprise du fonctionnement de la chaîne respiratoire, restant le potentiel membranaire de la mitochondrie. Celle-ci peut alors capter massivement le Ca^{++} concentré dans le cytosol, inhibant ainsi à nouveau la synthèse d'ATP. De plus l'excès relatif d'oxygène provoque la production de radicaux libres en excès qui induisent un stress oxydatif. Lors d'une ischémie suivie d'une réperfusion, on assiste d'abord à une augmentation du Ca^{++} mitochondrial et des radicaux libres, conditions favorables pour l'ouverture du pore géant. Cette deuxième phase a pour conséquence l'apoptose des cellules. Il est observé qu'une ischémie brève conduit à l'apoptose tandis qu'une prolongation de l'ischémie conduit à la mort par nécrose. Il existe plusieurs agents agissant sur la mitochondrie qui inhibent l'apoptose, c'est le cas des inhibiteurs des caspases et de la cyclosporine (147.148).

VI.3. les maladies neurodégénératives

Le dysfonctionnement mitochondrial conduit aux dommages oxydatifs détectés dans plusieurs maladies neurodégénératives. La maladie de parkinson se caractérise par la perte progressive des neurones dopaminergiques du système Nigro-Striatum. L'étude en microscopie électronique des cerveaux des patients parkinsoniens révèle que ces neurones dopaminergiques meurent par apoptose. Cette mort est due à l'augmentation de la synthèse des ROS lors du métabolisme des catécholamines (1149). Il est démontré que l'activité du complexe I mitochondrial est diminuée dans les fibroblastes des parkinsoniens. Il a été démontré également une diminution des activités des complexes I, II et III dans les mitochondries plaquettaires ainsi que des taux de COQ total plus bas par rapport à des sujets sains (150). La maladie d'Alzheimer (MA) qui se caractérise par une perte progressive de la mémoire à court terme puis à long terme, par une diminution des capacités intellectuelles et, parfois, par des troubles moteurs est associée à une importante perte neuronale suite à la réduction de l'activité des complexes II, III et IV des mitochondries neuronales (151). La sclérose latérale amyotrophique (SLA) se caractérise par la perte progressive des motoneurones entraînant l'atrophie des muscles squelettiques et leur paralysie.

La physiopathologie d'environ 20% des SLA familiales résulte de la mutation du gène de la Cu-Zn/SOD. La surpression du gène *bcl₂* antiapoptotique et des IAPs atténue cette perte des motoneurones (152.153). La maladie de Huntington (HD) est caractérisée par la réduction de l'activité des complexes mitochondriaux II et III (154).

VI.4. Le cancer

Les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites ; les ROS intervenant dans l'activation des procarcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant les antioncogènes comme *p53* (gène suppresseur des tumeurs) et les membres proapoptotiques de la famille *bcl₂*. La *p53* est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Il est observé que la protéine *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 Cette pathologie résulte également lors d'une réduction du processus apoptotique (121.122.123).

VI.5. Encephalomyopathie mitochondriale : EPM

Les EPM constituent l'une des maladies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial. Ces mutations provoquent un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la phosphorylation oxydative. Une étude récente a montré une induction de l'apoptose dans les muscles des patients ayants des mutations de l'ADN mitochondrial codant pour les gènes de la chaîne respiratoire par rapport à ceux possédant des mutations au niveau des gènes structurales. L'augmentation des taux du malondialdéhyde et des protéines carbonylées ont été observées chez les sujets atteints par des encéphalomyopathies mitochondriales (155.156).

VI.6. Ataxie de Friedrich

L'ataxie de Friedrich est caractérisée par l'absence de coordination des mouvements et par des cardiomyopathies hypertrophiques. Elle est due à la diminution de la frataxine qui est un régulateur du pool ferrique mitochondrial conduisant à une accumulation importante du fer associée aux dommages oxydatifs observés dans cette pathologie (157).

V. Lutte contre le stress par les flavonoïdes de la propolis

V.1. Les flavonoïdes

Le rôle antioxydant des polyphénols constitue la plaque tournante des recherches actuelles ainsi l'ingestion des nutriments riches en polyphénols diminue significativement le taux de mortalité liés aux stress dans le monde (158). Les polyphénols forment une vaste famille de composés naturels de structure extrêmement variées, l'élément fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique. Ces composés sont divisés en plusieurs classes selon leur structure allant des plus simples, acides phénoliques, à des composés plus complexes comme les lignanes en passant par les flavonoïdes, les composés les plus biologiquement actifs (159). Ces substances occupent ainsi une place importante dans notre recherche vue leur puissant rôle antioxydant cité par plusieurs auteurs (160.161.162.163.164.165). Pour ces raisons il nous semble utile de donner une présentation générale de ces composés sur deux plans l'un biologique l'autre chimique.

V.1.1. Définition et structure Chimique

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de métabolites secondaires des plantes, appartenant à la famille des polyphénols (166.167). Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs des fruits et parfois des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets (9.158.168). De nos jours plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine synthétique commune et par conséquent possèdent tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, 2 cycles en C-6 (A et B) reliés par une chaîne en C-3 intermédiaire (169.170.171). (Figure 13)

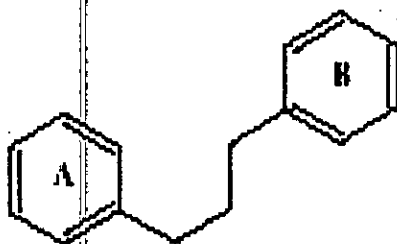


Figure 13. Squelette de base des flavonoïdes (171).

V.1.2. Localisation

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs ils sont concentrés dans les cellules épidermiques.

Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, ils sont presque toujours des génines libres dont la lipophile est accrue par méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (169.172).

V.1.3. Distribution

Les flavonoïdes se trouvent chez tous les végétaux, mais sa présence chez les algues n'as pas à ce jour été démontré (169). S'ils sont fréquents chez les bryophytes se sont toujours des flavonoïdes majoritairement des O- et C- hétérosides de flavone (173). La distribution de ces composés varie nettement en fonction des organes (bois, écorces, feuilles). C'est chez les angiospermes que la diversité structurales des flavonoïdes est maximale ainsi une trentaine de types flavonoidiques ont pu être identifiés chez les Asteraceae (169).

Le monde animale est lui aussi concerné par les flavonoïdes, la propolis l'un des produits d'abeille est très riche en flavonoïdes surtout de type aglycones (174.175). On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, de la galangine et de la pinocembrine dans la propolis. Les abeilles la fabriquent à partir des sécrétions de nombreux arbres et la modifient par leurs enzymes salivaires (174.176).

V.1.4. Classification

Structurellement les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavanols, flavanones, flavanonols, isoflavones chalcones, aurones et anthocyanes (177.178).

Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des constituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire. Ces divers substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides qui résultent de la combinaison d'un groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique : l'aglycone ou la génine avec élimination d'eau (169.179).

La partie osidique peut être mono-, di- ou tri-saccharidique. Elle est formée avec des hexoses (D-glucose, D-galactose, D-allose.....), avec des pentoses (D-apiose, L-arabinose, L-ramnose....), ou avec des acides (D-glucuronate, D-galacturonate..). Cette partie peut être ramifiée ou linéaire (169.180).

V.1.5. Biosynthèse

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (181).

Les composés de départ de la biosynthèse des flavonoïdes sont le malonyl CoA et les dérivés CoA de l'acide cinnamique (cinnamoyl CoA). Ces composés sont formés suite à deux voies complémentaires, voie acétate malonate et voie shikimate (181.184).

La voie shikimate conduit à la synthèse de l'acide cinnamique et donc au cycle B et à la chaîne en C3 de la structure de base des flavonoïdes. Les précurseurs de cette voie sont l'érythrose 4-phosphate de la voie des pentose et le phosphoenol pyruvate (PEP) résultant de la glycolyse. La voie acétate malonate constitue la voie de synthèse du noyau A. Ce système aromatique est formé par condensation répétée d'unités acétate (180).

Enfin les deux voies se condensent pour donner la structure de base en C15. L'étape clé est la condensation de 3 molécules de la malonyl CoA avec une molécule de cinnamoyl CoA, donnant naissance au précurseur commun la 4',2',4',6' tétrahydroxychalone avec l'intervention de la chalcone synthase. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée aux différentes classes des flavonoïdes sous l'action d'enzymes spécifiques (Figure 14). Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et d'acylation amènent les flavonoïdes à leur forme native sur laquelle ils se trouvent *in vivo* (182).

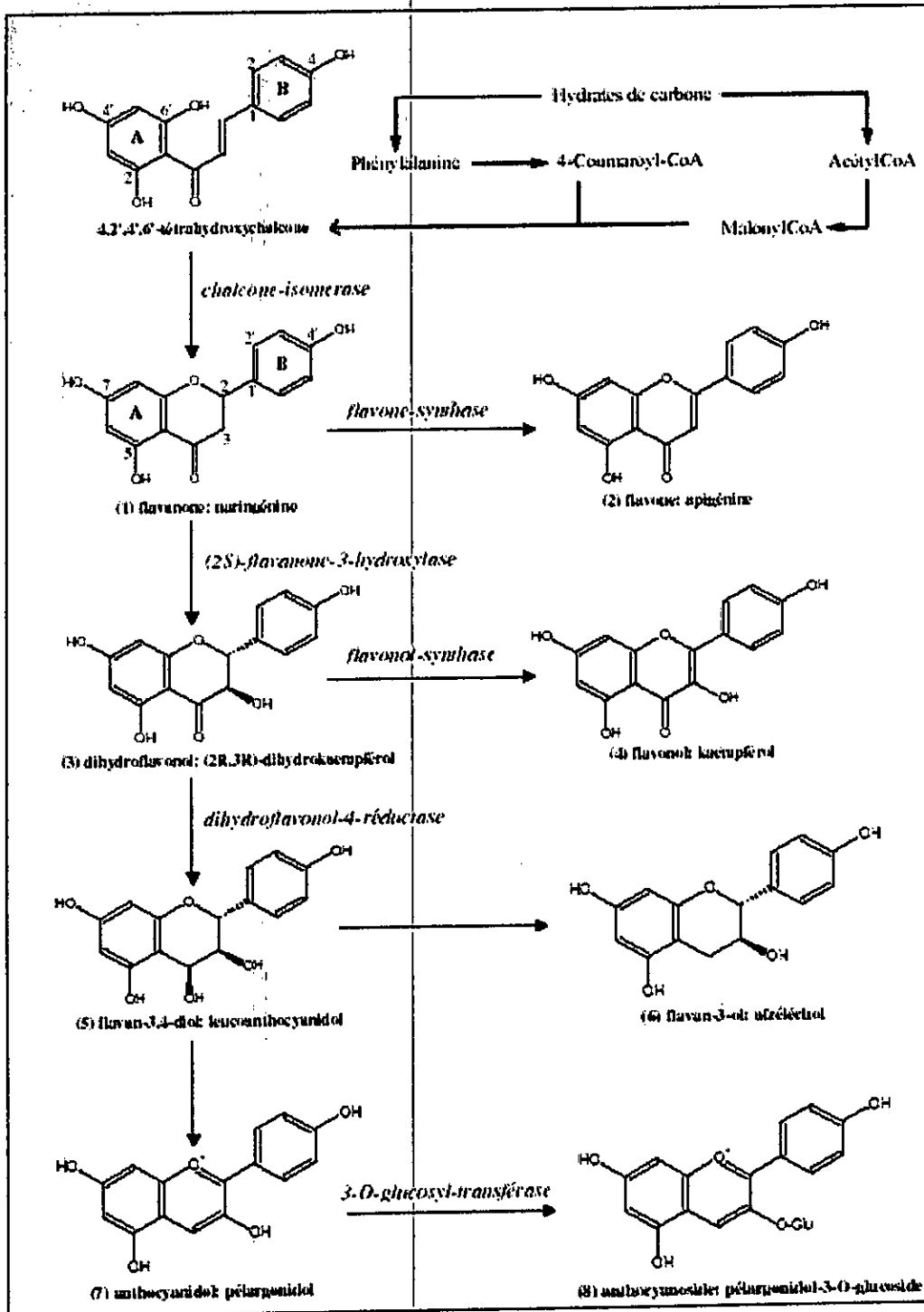


Figure 14. Voie de biosynthèse des flavonoïdes (173.183).

V.1.6. Pharmacocinétique des flavonoïdes

Si les études s'accordent à rapporter des effets biologiques récents pour les flavonoïdes, on manque encore actuellement des données sur leur devenir dans l'organisme une fois qu'ils ont été ingérés et de leur biodisponibilité.

V.1.6.1. Biodisponibilité des flavonoïdes

En fait, La biodisponibilité des flavonoïdes est l'un des sujets compliqués, et les études faites dans ce domaine restent controversées car elles ne prennent pas tous, en considération certains paramètres comme l'absorption intestinale et le métabolisme splanchnique. Les études de Venessa et ses collaborateurs montrent que cette biodisponibilité dépend de 3 facteurs essentiels : La capacité de transport à travers la bordure en brosse, l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et de la capacité de la sécrétion biliaire (9). Plusieurs travaux récents ont montré que c'est le métabolisme splanchnique qui conditionne de plus la biodisponibilité des flavonoïdes.

Les flavonoïdes présentent en générale une faible biodisponibilité avec une élimination lente qui se diffère d'un flavonoïde à l'autre. En prenant la quercétine le principal flavonoïde consommé par l'homme avec ses aliments, prise par voie orale, elle présente une concentration plasmatique maximale (C max) de 196 µg /ml après 2.9 heure, un temps de demi-vie d'absorption de 0.87 h, de distribution de 3.8 h et d'élimination de 16.8 h. La biodisponibilité a un effet direct sur les effets biologiques des polyphénols et notamment sur la capacité antioxydante. In vitro, le pouvoir antioxydant de nombreux polyphénols est supérieur à celui de la vitamine C et de la vitamine E (9.181).

V.6.2. Métabolisme des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents sous plusieurs formes, cette particularité va leur conférer des métabolismes différents. C'est ainsi que les formes libres sont absorbées directement au niveau de l'intestin grêle (184.185), tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par la flore intestinale au niveau du colon avant de pouvoir être absorbées (186.187.188). Cependant les formes libres issues de cette hydrolyse peuvent aussitôt être dégradées par la microflore en acides phénoliques, eux même absorbés ou éliminés via les fèces (162). Les polymères non absorbés au niveau de l'intestin grêle sont également dégradés par la microflore en molécules plus simples qui sont aussi absorbées au niveau du colon (189). L'intestin grêle constitue un site essentiel de biotransformation des flavonoïdes (190.191.192):

A l'intérieur de la cellule intestinale les flavonoïdes sont transformés en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation, ... Une partie de ces flavonoïdes est déversée dans

le sang tandis qu'une autre vers la lumière intestinale, ceci constitue l'un des mécanismes de contrôle de l'absorption intestinale (193.194.195.196).

Après absorption et transformation intestinale, les flavonoïdes atteignent le foie via la veine porte où ils ont été transformés également par des enzymes dites de conjugaison (197.198). Les métabolites ainsi formés atteignent leurs tissus cibles pour avoir un effet biologique ou bien être éliminés dans les urines. Toute fois une fraction des flavonoïdes peut être déversé dans l'intestin via la bile. Dans ce derniers cas, les métabolites peuvent être hydrolysés par les enzymes d'origine bactériennes libérant de nouveau l'aglycone qui, éventuellement pourra être absorbé et constitut un recyclage entérohépatique des flavonoïdes qui permet de maintenir une concentration non négligeable dans le sang (199.200.201.202).

V.1.7. Propriétés des flavonoïdes, mécanisme d'action et relation structure-activité

Une des propriétés majeure des flavonoïdes et de contribuer à la couleur des plantes avec laquelle la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et oiseaux pollinisateurs, assurant ainsi sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant les prédateurs par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes (169). Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent un rôle de phytoalexines (182).

Les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgri (prix Nobel,1937) qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité des vaisseaux étaient guéris par des extraits du jus de citron riches en vitamines C et en flavonoïdes, cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre de perméabilité) (181.182).

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permirent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal, à partir des années quatre-vingts c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées (182.202).

V.1.7.1. Activité antioxydante des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont considérés comme antioxydants puissants capable d'inhiber la formation des radicaux libres oxygénés et de s'opposer à la l'oxydation des macromolécules.

Les ROS générés par les phagocytes jouent un rôle physiologique important mais ils peuvent également initier l'inflammation et provoquer des dommages tissulaires importantes. Des études récentes ont montrés que les flavonoïdes inhibent la génération des ROS par les neutrophiles chez l'homme et en premier lieu l'anion superoxyde. La quercetine et autre flavonoïdes sont des inhibiteurs puissants de la production de l'anion superoxyde et de la libération du radical hydroxyle (181).

Les flavonoïdes peuvent inhiber la peroxydation lipidique dans les différents systèmes biologiques : mitochondries, microsomes, chloroplastes et erythrocytes (181.203). Les études de Bindoli et ses collaborateurs ont montré que la sylimarin, un (3-OH flavonone) est capable de protéger les mitochondries hépatiques de la peroxydation induite par le fer, cette capacité est 10 fois plus que celle de la vit E (181). Les flavonoïdes empêchent la fixation des radicaux libres sur l'ADN inhibant ainsi l'oxydation nucléique. Plusieurs études ont montrés le rôle des flavonoïdes dans inhibition de l'oxydation des LDL et des macromolécules comme l'ADN et les protéines (204.205.206.207).

V.1.7.2. Mécanismes de l'action antioxydante des flavonoïdes

D'après les études d'Ishige et ses collaborateurs et de Halliwell, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre le piégeage direct de ROS, l'inhibition des enzymes responsables de la production de ROS, la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS et la protection des systèmes de défense antioxydants tel que l'augmentation des taux du glutathion (208.209).

V.1.7.2a. Le piégeage direct des ROS

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante, les flavonoïdes (FL-OH) sont capables de réduire les radicaux libres comme l'anion superoxyde, le peroxyde et l'hydroxyle, et ce par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante (209.182):



Où R[°], représente l'anion superoxyde, le peroxyde ou l'hydroxyle.

Le radical Flavonoxy (FL-O°) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Figure 15) ou interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant des flavonoïdes (182). Les flavonoïdes sont de bons piègeurs de radicaux libres in vitro (210.211.212.213.214).

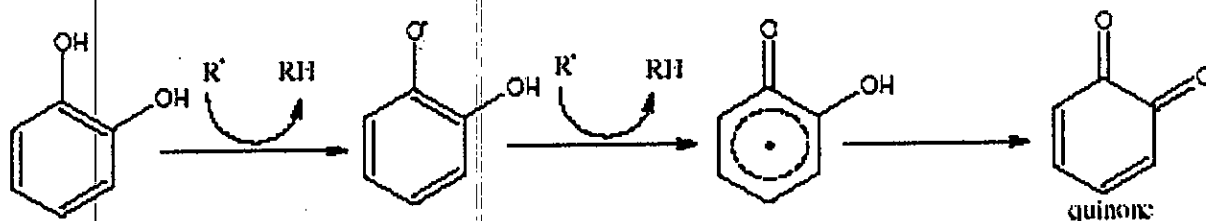


Figure 15. Piégeage des ROS par les flavonoïdes (182).

V.1.7.2b. La chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être soit des constituants des hémoprotéines soit des cofacteurs des différentes enzymes de système de défense antioxydant mais, ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton. Dans l'organisme la plupart des ions métalliques sont liés aux protéines limitant leur participation aux réactions qui produisent les radicaux libres (161.163).

Les flavonoïdes sont de bons chélateurs de ces ions métalliques ce qui attribue à leur activité antioxydante (182.215.216).

V.1.7.2c. L'inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont de bons inhibiteurs des enzymes in vitro, tel que l'histidine décarboxylase, l'élastase, la hyaluronidase, l'aldose réductase ...etc. (169).

Plusieurs flavonoïdes ont une activité inhibitrice des enzymes responsables de la production des ROS. En effet, les flavonols monomères et biflavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la lipooxygénase et / ou la cyclooxygénase. Les flavonoïdes sont également de bons inhibiteurs de la xanthine oxydase qu'elle est considérée comme une source biologique importante des radicaux libres (182). Hansaki et ses collaborateurs dans une étude sur la maladie de la goutte ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois la concentration d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (160).

V.1.7.3. Relation Structure –Activité antioxydante

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des *flavonoïdes* et leur capacité à piéger les radicaux libres. En analysant tous ces résultats la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho-hydroxy sur le cycle B qui confère la stabilité au radical flavonoxy.
- 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.

A titre d'exemple la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (182.217). (Figure 16)

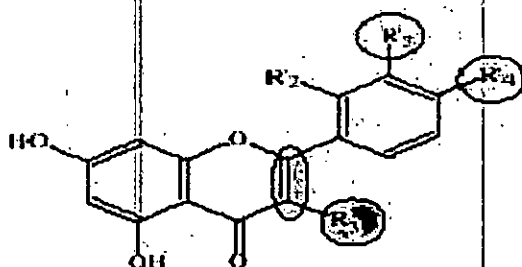


Figure 16. *Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (182).*

Pour la chélation des ions métalliques par les flavonoïdes, les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation du fer par certains flavonoïdes ont montré que les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont les suivants (Figure 17):

- un noyau catéchol sur le cycle B.
- les groupes 3- hydroxyle et 4-oxo du cycle C
- Et, les groupes 4- oxo et 5- hydroxyle entre les cycles A et C (182.193).

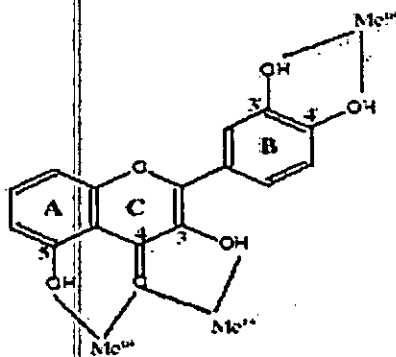


Figure 17. *Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (193).*

Le nombre des groupements hydroxyles du cycle B augmente l'activité de piégeage des ROS, cette activité diminue avec la diminution du nombre de ces groupements. La présence d'un sucre lié à l'aglycone diminue l'activité anti-oxydante des groupements hydroxyles voisins. En effet les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles non glycosylés, par exemple la rutine est presque 10 fois moins active que la quercetine sur l'inhibition de la xantine oxydase (173.182).

V.1.7.4. Propriétés prooxydantes des flavonoïdes

Nous avons décrit précédemment des propriétés antioxydantes des flavonoïdes, mais il ne faut pas négliger leurs propriétés prooxydantes. Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de prooxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, ils seraient capables de réduire le fer ferrique en fer ferreux aboutissant à la formation de radicaux hydroxyles. En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro* (219.220).

Les flavonoïdes peuvent donc avoir un effet pro- ou anti-apoptotique selon les doses utilisées ainsi le flavone tangeretin du citrus (5, 6, 7, 8, 4' penthamethoxy flavone) induit l'apoptose des cellules HL-60 à des concentrations supérieurs à 2.7 mM (181). Alors, le potentiel prooxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes.

V.1.7.5. Autres activités des flavonoïdes

De nos jours les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical ou on leur reconnaît de l'activité antibactérienne (221.222.223), antifongique (224.225) et antivirales (221.226). En effet, l'apigenin, la quercetine et la catéchine ont une activité anti-virale contre 11 types de virus y compris le VIH (227).

Les flavonoïdes présentent une activité anti-inflammatoire et ce par inhibition de la cyclooxygénase et/ ou de la lipooxygénase. Landolfi et son groupe ont montré que les effets de la quercetine et de la myrecitine sont dose dépendante (182). Parmi les mécanismes de cette activité, on cite également la capacité des flavonoïdes à piéger l'anion superoxyde produit par la NADPH oxydase des membranes des globules blancs (169).

Des études employant différents modèles de cellules animales ont suggérés que certains flavonoïdes empêchent l'initiation ainsi que la progression des tumeurs au niveaux des poumons (228), de la peau (229), de la prostate (230) et du sein (231).

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduit le risque des maladies cardiovasculaire. Il est intéressant de noter que les flavonoïdes sont des inhibiteurs de l'adhésion, de l'agrégation et de la sécrétion plaquettaire (181.182).

L'activité anti-ulcéreuse des flavonoïdes a été également démontrée dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus et le piégeage des radicaux libres (182).

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Les flavonoïdes peuvent améliorer la sécrétion d'insuline et protéger les cellules pancréatiques qui peuvent être endommagées par les radicaux libres. Cong et khoo ont reporté que la myrécétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques (181.232). Il est nécessaire de noter que ces activités des flavonoïdes sont dues principalement à leur capacité anti-oxydante (162).

V.2. La propolis

V.2.1. Historique et définition

La propolis est l'un des principaux produits de la ruche, qui désigne toute une série de substance résineuse, gommeuse et balsamique de consistance visqueuse (233.234.235.236). Elle est recueillie sur certaines parties de végétaux (bourgeons et écorces principalement) par les abeilles, qui la rapportent à la ruche, l'additionnent et la modifient en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires surtout) (237).

Comme tous les produits de la ruche, la propolis existe depuis que l'abeille est apparue sur terre, il y a environ 125 millions d'années (174.236), leur usage remonte à plusieurs millénaires avant notre aire vraisemblablement à l'Égypte antique, et de façon certaine aux Grec; " Propolis" vient du Grec "pro", à la défense de et "polis", ville, il désigne ainsi un produit impliqué dans la défense de la communauté d'abeilles (239).

En fait, la propolis est essentielle à la vie de la ruche, les abeilles l'utilisent à de nombreux fins: comme biocide à l'intérieur de la ruche, pour colmater les fissures et consolider les cadres afin de rendre la ruche bien hermétique et pour momifier les petits rongeurs morts à l'intérieur de la ruche et elles l'utilisent également pour réduire l'ouverture du trou de vol en fonction des variations climatiques (240).

V.2.2. Aspect et propriétés physicochimiques de la propolis

La propolis se présente sous l'aspect d'une substance de consistance variable en fonction de la température; dure et friable à 15°C, elle devient molle aux alentours de 300°C et collante jusqu'à fondre vers 60-70°C, mais le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C (240). La couleur de la propolis est variable selon sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noire en passant par toute une gamme de brun (rougeâtre, verdâtre) extrêmement riche et étendue (175.241).

La propolis présente une odeur variable, généralement arôme agréable et douceâtre, en rapport avec les résines aromatique qu'elle contient, sa saveur est souvent âcre et parfois amère. Concernant la solubilité de la propolis, elle est insoluble dans l'eau à froid, selon Bankova, quelques composants sont solubles dans l'eau bouillante. Elle est partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool (éthanol, méthanol), l'ammoniaque, benzène, et seul un mélange adéquat de différents solvant permet de la dissoudre (234.241).

V.2.3. Origine botanique de la propolis

L'origine botanique de la propolis peut influencer la saveur, la couleur et la composition chimique de la propolis (242). la connaissance de l'origine botanique de la propolis est très importante pour sa standardisation chimique, dans ce cadre il est bien documenté dans la littérature que dans les zones tempérées (Europe, Afrique du nord, Asie et Amérique du nord) la source principale de la propolis est le peuplier (*populus sp*) avec toutes ses espèces, et différentes conifères, tandis que dans les zones tropicales, où le peuplier est inexistant, les abeilles cherchent une autre source de la propolis, chaque région a une plante dominante (Romarin et Eucalyptus en Brésil par exemple). On parle donc de propolis des zones tempérées et celles des zones tropicale et sub-tropicale (242.243.244.245).

V.2.4. Composition chimique de la propolis

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à la composition chimique de la propolis et plusieurs travaux ont été effectués sur des propolis de différents pays et ont aboutit la conclusion suivante:

La composition chimique de la propolis varie selon l'origine botanique, l'espèce de l'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique, mais elle présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable. Globalement la propolis est constituée de: 50 à 55 % de résines et baumes, 25 à 35 % de cire, 10 % des huiles essentielles, 5 % de pollen, et 5 % de matières diverses : Traces de minéraux (Ca^{++} , Mg^{++} , Fer, Zinc, K, P, Silice...), traces de vitamines (A, B, B2, B3, C, E, ...), acides benzoïque et leurs esters, sucre (246.247.248.249).

Jusqu'à présent il a été identifié plus de 300 constituants dans différentes propolis mais les principaux sont de la classe des flavonoïdes de type aglycones, car les abeilles modifient les glycosides de la propolis par les glycosidases salivaires lors de la collection et ce afin d'améliorer l'action pharmacologique (233.234.239). Chimiquement, les aglycones de la propolis sont les flavones, flavonoles, flavonone, dihydroxyflavonoles et chalcones (242.250).

V.2.5. Toxicité et interactions de la propolis

Les études en rapport avec la toxicité de la propolis sont rares, Ghisalberti signale qu'elle n'est pas toxique pour l'homme et les animaux si elle est consommée en quantité raisonnables (252). Administrée chez le rat par voie orale à une dose de 4 mg/kg/j durant 15 jours, elle n'entraîne aucun effet toxique (253). La propolis ne montre aucune interaction avec d'autres thérapeutiques (254).

V.2.6. Propriétés thérapeutiques

En fonction de certains facteurs comme la composition chimique et l'origine botanique, la propolis peut avoir des propriétés spécifiques essentiellement les propriétés thérapeutiques (174), l'étude des activités de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs, l'ensemble des recherches montre que la propolis a plusieurs activités à savoir: Activité antioxydante (255.256.257.258), antibactérienne (221.259.260), antifongique (242.261), antivirale (242.262), astringente (258.260), spasmolytique (242.258), cytostatique (234), immunostimulante (174), hépatoprotective (263), hypotensive (263) et proapoptotique (174). C'est la présence des flavonoïdes, essentiellement, qui confère à la propolis tous ces extraordinaires propriétés thérapeutiques (250).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de phytopharmacologie du département de biologie, à l'université de Jijel. Elle est consacrée pour évaluer l'effet de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur les fonctions mitochondriales et cellulaire liées aux stress oxydant.

I. Matériel végétal et contribution à l'étude phytochimique

I.1. Récolte de la propolis

La propolis est récoltée au mois d'Avril –Mai 2005 à partir des ruches de la coopérative apicole de Kaous (Jijel) et ce par grattage et raclage des cadres et des parois de la ruche. Seule la propolis récemment produite est récoltée pour cette étude. Les conditions de stockage ont été respectées: La propolis est gardée dans des récipients opaques, bien fermés et à l'abri de la chaleur (- 4°C) afin de garder intact tout ses composants. Comme cette propolis est assez impure, elle est découpée en petits morceaux puis lavée dans l'alcool absolu pendant 2 heures.

I.2. Préparation de l'extrait éthanolique et extraction des aglycones flavoniques de la propolis

L'extraction des flavonoïdes de la propolis est réalisée selon le protocole décrit par Brunetton (1993) (169), 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 génines libres ou aglycones flavoniques sont extraits par l'éther diéthylique et les hétérosides flavoniques par l'acétate d'éthyle.

Pour cela, la propolis est coupée 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 10 ml d'éthanol. Après filtration sur coton, le filtrat est évaporé à 79°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporator E100, Hei dolph). Le résidu est repris dans le méthanol 70% et laissé à macération pendant une nuit. Après évaporation, l'extrait obtenu est appelé extrait brut ou extrait éthanolique de la propolis. L'extraction est poursuivie afin d'extraire les aglycones et les hétérosides flavoniques. Pour cela, l'extrait brut (40g) est suspendu dans 1L du mélange méthanol/eau (V/V) (264), et la solution hydroalcoolique subit une série d'affrontements par 3 solvants différents:

- *Affrontement par l'éther de pétrole*: Nous avons ajouté 500 ml d'éther de pétrole à la phase hydroalcoolique. Après agitation énergique et repos de 10mn dans une ampoule à décantater, deux phases sont obtenues: La phase organique de l'éther de pétrole en haut contenant les cires et les graisses, et la phase hydroalcoolique en bas.
- *Affrontement par l'éther diethyle*: 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 diethylique. Deux phases sont ainsi obtenue ; phase éther diethylique en haut contenant les aglycones flavoniques et phase hydroalcoolique en bas. Cette dernière subit trois autres affrontement par le même solvant pour extraire le maximum de substances bio-actives.
- *Affrontement par l'acétate d'éthyle*; solvant préférentiel des hétérosides flavoniques: Sur la phase hydroalcoolique obtenue après affrontement par l'éther diethyle, 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.

La phase éther diethylique subit ensuite une évaporation à sec dans l'évaporateur à 45°C avec la pesé de l'extrait afin de faire le dosage des flavonoïdes et la préparation des différentes dilutions.

I.3. Test chimique d'identification des aglycones flavoniques

Pour identifier les aglycones flavoniques dans l'extrait brut et confirmer leur présence dans l'extrait éther diethylique (solvant préférentiel des aglycones flavoniques), nous avons utilisé la réaction de *Shibata*; test chimique d'identification des aglycones de flavonoïdes (265). Pour cela, 5ml de l'extrait aqueux a été additionné de 2.5 ml du méthanol et 1.5ml d'une solution de magnésium à 1%. Deux à trois gouttes d'acide chlorhydrique concentré sont ensuite ajoutées. L'apparition d'une couleur rouge ou orange indique la présence des flavonoïdes aglycones (essentiellement les dérivés de flavonols).

I.4. Dosage différentiel des flavonoïdes

Le taux des flavonoïdes a été déterminé par la méthode de réactivité avec le $AlCl_3$ comme décrit par Boharune et al 1996 (266). En solution éthanolique 2%, le chlorure d'aluminium forme un

complexe avec les composés flavoniques qui peut être stable (Carbonyle en 4, OH en 5 et/ou en 3), ou labile (2 OH libres en position ortho) (Figure 18).

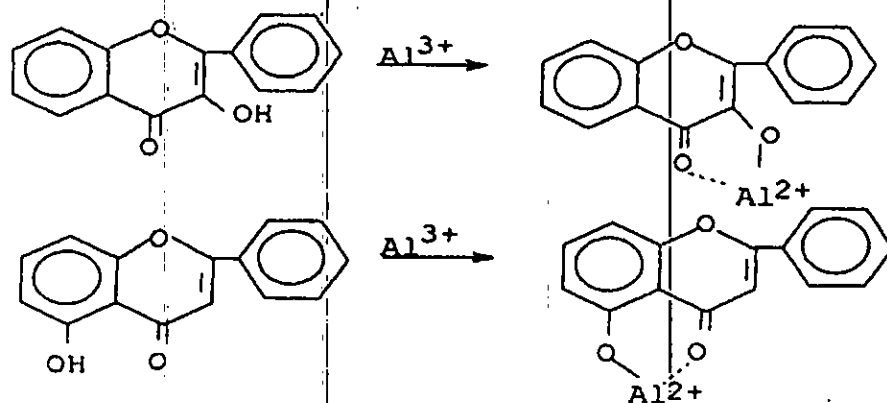


Figure 18. Principaux complexes formés par le $AlCl_3$ avec es flavonoïdes.

Deux solution de l'extrait sont nécessaires: La première avec l'éthanol 96°, la second dans l'éthanol 96° contenant $AlCl_3$ à 2%. Après 10 mn d'incubation, on lit l'absorbance à 430 nm.

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

$$C = (DO/\epsilon).M.V. (d/p)$$

Avec:

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

DO : densité optique.

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

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

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

d : Facteur de dilution.

➤ Préparation des différentes dilutions

Après le dosage des flavonoïdes, considérés comme quercétine, nous avons obtenu une concentration de 370 mg/ml de la solution mère préparée dans l'éthanol. Cette solution est considérée comme solution molaire (solution à 1 M), et à partir de laquelle les concentrations utilisées ($10^{-2}M$, $10^{-4}M$, $10^{-6}M$ et $10^{-8}M$) sont ensuite préparées par dilution dans l'eau distillée. Pour la préparation de la concentration $10^{-2}M$ par exemple, nous avons pris 1 ml de la solution mère avec 99 ml d'eau distillée.

I.5. Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes de la propolis

L'identification des flavonoïdes reposait sur des relevés de fluorescences et de Rf ainsi que sur les caractéristiques spectrophotométriques UV-visible des composés. De puis quelques années, deux méthodes physiques sont venues compléter l'éventail des techniques d'identification structurale: La spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Ces dernières doivent d'être considérées comme des compléments indispensables aux premières. Selon les moyens disponibles nous avons effectué la chromatographie sur couche mince et la spectroscopie infrarouge de nos extraits.

I.5.1. La chromatographie sur couche mince de l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis

Les conditions chromatographiques adoptés pour la réalisation de la chromatographie sur couche mince des deux extraits sont les suivantes:

- Support chromatographique: plaque de gel de silice 60 GF254 (Merck)
- Phases mobile: Ethanol-Eau (6-4) v/v, pour l'extrait brut, et Dichlorométhane-Eau (9-1) pour les aglycones flavoniques.
- Révélation: Après développement, les plaques sont pulvérisées avec une solution éthanolique de $AlCl_3$ à 1% puis séchées. Le chromatogramme peut être observé à la lumière UV (336 nm) ou dans le visible. A 336 nm, on observe une fluorescence allant du bleu au brun. Dans le visible, on observe une coloration jaune. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présentes sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes, et indique la nature aglycone des flavonoïdes.

La fluorescence sous lumière UV ainsi que la valeur du Rf accessible immédiatement à l'examen du chromatogramme apportent des informations sur la structure du composé flavonique.

➤ Relation fluorescence – structure

L'examen des pigments flavoniques en lumière ultraviolette est certainement l'un des procédés les plus utilisés pour la détermination de la structure, il fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. En dehors des isoflavones tous les composés flavoniques apparaissent en UV sous forme de spots colorés dont certains sont fluorescents (268). Le tableau 2 résume la relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes.

Tableau 2. Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes (267).

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7 tri- OH libres Flavonols 5, 7, 8 tri- OH libres
Brun-noir	3- OH absent ou 3- OH substitué
Violet	Flavones 5 - OH et 4' -OH Flavones 3- OR et 5-OH, 4'-OH Flavones 6- ou 8- OH Chalcones, isoflavones, flavonones.
Bleu-clair (fluorescent)	Flavones sans 5- OH libres Flavonols sans 5- OH libre avec 3- OH substitué
Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5- OH libre
Jaune vert brillant	5- OH libre ou 5- OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3- OH libre Aurones, chalcones, flavanones
Jaune pâle	Dihydroflavonols

➤ Relation Rf - structure

Les relations existantes entre le Rf et la structure des molécules peuvent également donner des renseignements sur la structure des flavonoïdes.

La mobilité d'un composé dans un solvant particulier est référée à sa valeur de Rf définie comme suit:

$$Rf = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

La comparaison des valeurs des Rf des composés flavoniques inconnus avec ceux des produits standards donne des informations préliminaires sur la structure du flavonoïde.

Le comportement chromatographique (Rf) des flavonoïdes en fonction de leur structure dans un solvant alcoolique ou aqueux nous permet de mentionner les premières indications concernant la substitution du squelette de la molécule flavonique. Quelques exemples de la relation Rf - Structure sont illustrés dans le tableau 3.

Tableau 3. Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes (267).

Structure flavonique	Rf
Augmentation des groupements hydroxyles	Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	Rf augmente dans un solvant aqueux. Rf diminue dans un solvant alcoolique.
Hydroxyle méthylés	Rf diminue en solvant alcoolique.
Méthylation d'un hydroxyle en 5	Rf diminue en solvant alcoolique.
Hétérosides de flavonols avec 3-OH libre	Rf nul dans l'eau.

I.5.2. Analyse spectrale infrarouge pour l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis

La technique de spectroscopie infrarouge est une méthode simple et rapide qui fournit des informations sur la nature des groupements fonctionnels (alcools "OH", composés aromatiques "C-H aromatique", cétones "C=O", ...) d'une molécule ou d'un mélange de molécules. Comme les extraits de propolis sont mous, les analyses ont été réalisées en milieu liquide. Pour cela, on écrase modérément une gouttelette de l'échantillon entre deux disques de NaCl (port-echantillon), sans intercalaires. Les spectres sont ensuite enregistrés par un spectrophotomètre infrarouge *Shimadzu 8400S*.

II. Animaux

II.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur des rats Albinos Wistar mâles provenant de l'institut Pasteur d'Alger (ALGERIE). Les animaux, pesant environ 150 g, sont élevés dans des cages de 10 rats chacun. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. L'animalerie est maintenue à une température ambiante (20-25°C), une hygrométrie de 60% et un cycle jour-nuit 12h-12h.

II. 2. Traitement des animaux

Notre travail est consacré pour l'étude de l'effet *in vitro* et *in vivo* de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur les fonctions mitochondriales et cytosoliques liées aux stress oxydants.

Les animaux sont répartis en quatre groupes chaque groupe contient plusieurs lots: Le premier groupe est consacré pour l'étude *in vitro*, le deuxième pour l'étude *in vivo* à long terme, le

troisième et le quatrième respectivement, pour l'effet préventif et curatif des deux extraits contre le stress induit par l'administration d'un anticancéreux; la doxorubicine.

II.2.1. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis in vitro sur mitochondries hépatiques

Les animaux utilisés pour ce type d'étude sont des animaux normaux et ne reçoivent aucun traitement. Les principes actifs à différentes concentrations (10^{-2} M, 10^{-4} M, 10^{-6} M et 10^{-8} M), sont donc mis en contact direct avec la mitochondrie ou le cytosol dans le but d'évaluer leurs effets directs ou effets in vitro, en absence de toutes transformations gastro-intestinales ou hépatiques pouvant résultées lors de l'administration.

II.2.2. Etude de l'effet d'un traitement à long terme par l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cytosolique

Cette étude de l'effet d'un traitement prolongé par ces principes actifs de la propolis sur la balance antioxydant-prooxydant a comme but, la recherche d'une intolérance probable ou d'un effet prooxydant suite à une administration à long terme. Les animaux sont répartis en 4 lots de 10 rats chacun:

Lot 1: Animaux témoins recevant 1ml d'eau distillée par voie orale chaque jour et pendant 2 mois.

Lot 2: Animaux recevant par gavage gastrique une dose quotidienne de 100mg /kg de l'extrait brut de la propolis, pendant 2 mois.

Lot 3: Animaux recevant 1ml de l'extrait des aglycones flavoniques à la dose quotidienne de 100mg /kg par voie orale pendant 2 mois.

Lot 4: Animaux recevant 1 ml de la quercétine (aglycone flavonique de référence) à la dose quotidienne de 33 μ g/kg par voie orale pendant 2 mois. La quercetine est préparée dans de l'eau distillée.

II.2.3. Etude de l'effet préventif de l'extrait brut et des aglycones flavoniques de la propolis contre le stress induit par la doxorubicine

Le but de cette étude est voir si ces principes actifs de la propolis peuvent prévenir le stress induit par la doxorubicine et de comparer leurs effets avec ceux de la quercétine comme flavonoïdes de référence. Les animaux consacrés à cette étude sont répartis en 5 lots de 10 rats chacun:

Lot 1: Animaux témoins recevant 1ml d'eau distillée par voie orale pendant un mois.

Lot 2: Animaux témoins recevant la doxorubicine à la dose quotidienne de 10mg/kg jours par voie intraveineuse, pendant les trois premiers jours puis 1 ml d'eau distillée jusqu'à un mois.

Lot 3: Les animaux reçoivent flavonoïdes de la propolis à la dose quotidienne de 100 mg/kg pendant un mois puis injectés par voie IV de la doxorubicine à 10 mg/kg/j pendant 3 jours.

Lot 4: Les animaux reçoivent 100 mg/kg/j de l'extraits des aglycones flavoniques pendant un mois puis injectés par voie intraveineuse de la doxorubicine à 10mg/kg/j pendant 3 jours.

Lot 5: Les animaux reçoivent 0.033 mg/kg/j de la quercetin pendant un mois puis injectés par voie IV de la doxorubicine (10mg/kg/j) pendant 3 jours.

II.2.4. Etude de l'effet curatif de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis contre le stress induit par la doxorubicine

Pour étudier la capacité de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis à corriger le stress oxydant induit par la doxorubicine, 5 lots de 10 rats chacun sont utilisés:

Lot 1: Animaux témoins recevant 1ml d'eau distillée par voie orale pendant un mois.

Lot 2: Animaux témoins recevant 10mg/kg/j de la doxorubicine pendant 3 jours par voie intraveineuse puis 1 ml d'eau distillée par jour jusqu'à un mois.

Lot 3: Animaux recevant une dose de 10mg /kg/j de la doxorubicine par voie intraveineuse pendant 3 jours. L'extrait de la propolis est administré à partir de 4^{ème} jour par voie orale à la dose quotidienne de 100 mg/kg. L'administration est poursuivie jusqu'à un mois.

Lot 4: Animaux recevant 10mg /kg/j de la doxorubicine par voie intraveineuse pendant 3 jours puis 100 mg /kg/j des l'extraits des aglycones flavoniques de la propolis par voie orale du 4^{ème} jour jusqu'à un mois.

Lot 5: Les animaux reçoivent une dose quotidienne de 10 mg/kg de la doxorubicine par voie intraveineuse pendant 3 jours puis 33µg/kg de la quercetin par voie orale à partir du 4^{ème} jour jusqu'à un mois.

II.3. Sacrifice des animaux et prélèvement de foie

A la fin des délais d'administrations, pour l'étude in vivo, les animaux sont sacrifiés, le foie est prélevé et divisé en trois fractions: La première est plongée dans le TSE et utilisée pour la préparation de la suspension mitochondriale utilisée pour le dosage des paramètres mitochondriaux (anion superoxyde, gonflement, MDA et enzymes antioxydantes), la seconde dans la solution du KCl sert pour le dosage du MDA et du GSH hépatique cytosoliques, la

troisième dans le tampon phosphate (0.1M, pH7.4) contenant du KCl à 1.17% et qui sert pour le dosage de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) cytosoliques.

III. Evaluation de l'activité antioxydante sur mitochondries et cellules hépatiques

III.1. Isolement des mitochondries hépatiques

L'extraction des mitochondries se fait selon la méthode décrite par Rustin et al (268). Il s'agit d'une centrifugation différentielle.

Après décapitation d'un rat de 150 g environ, 10g de foie sont prélevés et coupés finement dans du tampon TSE (250mM sucrose, 50mM tris, 5mM EGTA, pH 7.2 à 4°C). Les particules coupées sont ensuite lavées deux fois dans le même tampon et potées dans un potter de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA) avec 30 ml de TSE, ce qui permet la destruction des cellules et la libération des mitochondries.

L'homogénat récupéré est centrifugé une première fois à 1770 rpm pendant 10 mn (Centrifugeuse Sigma 6K15) permettant ainsi l'élimination des gros débris cellulaires. Le surnageant issu de cette centrifugation est centrifugé une deuxième fois à 9600 rpm à 4°C pendant 10 mn et le culot obtenu est resuspendu dans 15 ml du TSE et centrifugé à 9600 rpm pendant 10 mn. Le culot issu de cette dernière centrifugation est suspendu dans 15 ml du tampon TS (250 mM succrose, 50mM tris, pH7.2 à 20°C) et centrifugé pendant 10 mn à 9600 rpm. Le culot final constitué des mitochondries, est subdivisé en deux fractions égaux: La première est reprise dans 200µl du TS pour obtenir la suspension mitochondriale et la seconde dans la solution hypotonique (25 mM KH_2PO_4 , 5mM MgCl_2 , pH7.2) qui sert à l'étude enzymatique. Le protocole d'extraction des mitochondries hépatiques est représenté dans la figure 19 ci-dessous..

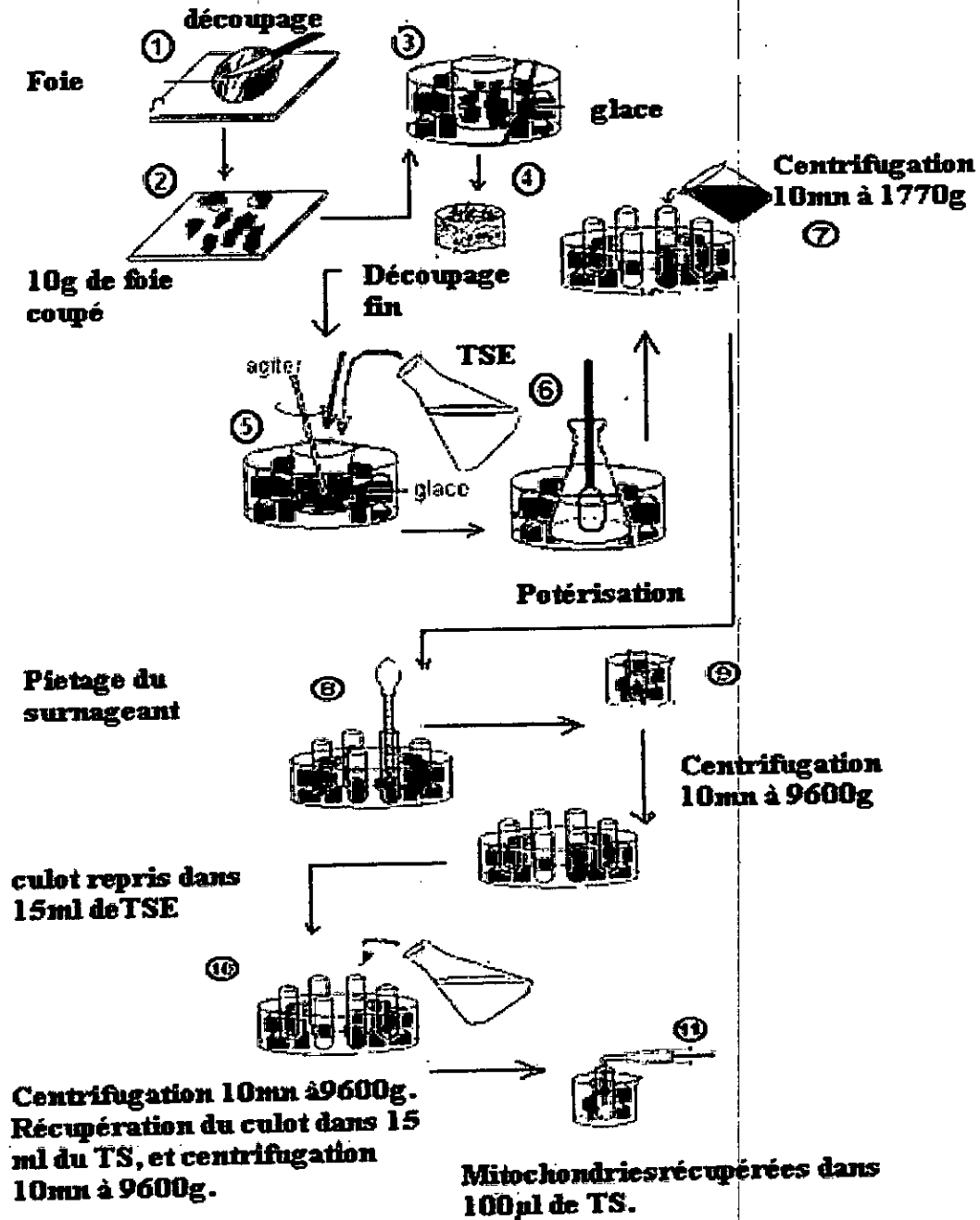


Figure 19 : Protocole d'extraction des mitochondries hépatiques.

III. 2. Préparation de la matrice mitochondriale

Un mélange de la solution hypotonique (25 mM KH_2PO_4 , 5mM MgCl_2 , pH7.2) et du culot mitochondrial (V/V) est congelé-décongelé de 6 à 8 fois avec potérisation accrue et répétée, afin d'éclater les mitochondries. Après centrifugation de 10 min à 9600 rpm, le surnageant est utilisé comme source d'enzymes. La concentration des protéines a été déterminée dans les deux suspensions en adoptant la méthode de Lowry (269).

III.3. Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal et al (270). Pour cela, 2 g de foie sont coupés et homogénéisés avec 3 volumes du tampon phosphate (0.1M, pH7.4) contenant du KCl à 1.17% à l'aide du broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 mn à 4°C pour séparer les débris nucléaires et le surnageant est centrifugé à 9600 rpm à 4°C, pendant 30 mn. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source d'enzymes.

III.4. Mesure de l'effet scavenger ou piègeur des ROS (méthode au DPPH°)

L'effet scavenger ou la capacité de piégeage des radicaux libres des extraits à tester est déterminé en utilisant la méthode au DPPH° comme elle est décrite en (271). Une méthode rapide, simple et peu coûteuse a la capacité de mesurer l'activité antioxydante des extraits en utilisant le radical libre stable (DPPH°), 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl.

Le DPPH° est largement utilisé pour tester la capacité des composés d'agir en tant qu'éboueurs des radicaux libres ou donneurs d'hydrogène. La méthode au DPPH° a été également employée ces dernières années pour mesurer les antioxydants dans des systèmes biologiques complexes.

Quand-t-il réagit avec un composé antioxydant qui peut donner les protons hydrogènes, le DPPH° est réduit (DPPH-H) et change donc de couleur (du violet vers le jaune), ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 515 nm. Les deux formes radicalaire (1) et réduite (2) du DPPH sont représentées ci-dessous.

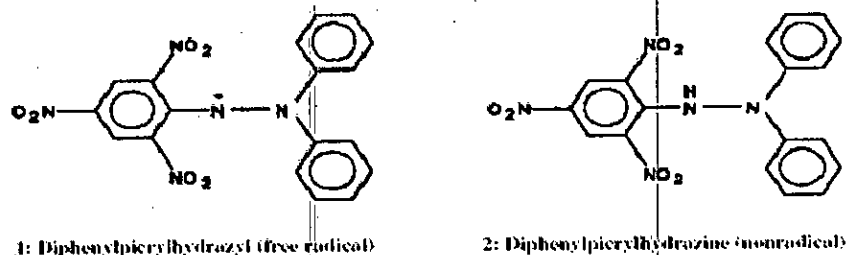


Figure 20. Formes radicalaire (1) et réduite (2) du DPPH°.

Pour réaliser ce test, la cuve de mesure contient : 1.5 ml de la solution éthanolique du DPPH° (100 µM) et 15 µl de l'extrait à tester aux différentes concentrations. La mesure de la DO s'effectue chaque 30 seconde pendant 5 mn à 515 nm à l'aide d'un pectrophotomètre (Ultrospec 100 pro). L'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction en prenant le 100% du control (DPPH° seul) selon la relation suivante:

$$\% \text{ de réduction} = [A_C - A_E / A_C] \times 100.$$

A_C : Absorbance du contrôle après 5mn.

A_E : Absorbance de l'essai après 5mn.

III.5. Mesure de la production mitochondriale de l'anion superoxyde

L'anion superoxyde est le principal radical libre généré par la mitochondrie notamment par les complex I et III de la chaîne respiratoire. La génération de superoxyde a été évaluée selon la méthode décrite dans (272), en mesurant la réduction du nitrobluetetrazolium (NBT⁺²) par le superoxyde en monoformazan, qui absorbe à 560 nm, selon la réaction suivant:



Dans un volume final de 1,2 ml de tampon respirant avec roténone (voir annexe), nous avons introduit 16.5 µl de la suspension mitochondriale à 1 mg/ml, 112µl de la cyclosporine à 1µM, 12µl du NBT⁺² à 100mM et enfin 12µl de l'extrait à tester à différentes concentrations. Après incubation pendant 1 min nous avons additionné 7,2µl de succinate à 6mM. La variation de l'absorbance est suivie à 560 nm pendant 4 minutes. Le pourcentage de production de l'anion superoxyde est calculé en prenant le 100% du control.

III.6. Mesure du gonflement mitochondrial " mitochondrial swelling"

Les changements du statut de la perméabilité mitochondriale ont été évalués spectrophotométriquement comme décrit par Kristal (273). Le gonflement est estimé en mesurant la décroissance de l'absorbance de la suspension mitochondriale à 540 nm.

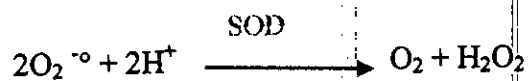
Dans un volume final de 1.8 ml du tampon respirant nous avons introduit 0,2 mg/ml de mitochondries, 10.8 µl du succinate à 6 mM et 18 µl de différentes concentrations de l'extrait à tester. Après une minute d'incubation nous avons ajouté 2.25 µl du Ca Cl₂ à 100 mM pour

induire le gonflement. La décroissance de l'absorbance est suivie à 540 nm chaque minute pendant 5 min.

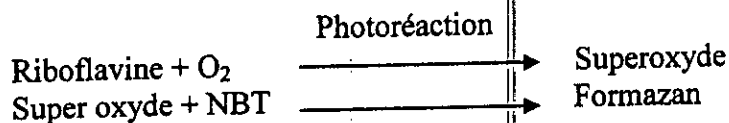
III.7. Evaluation de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes

III.7.1. Détermination de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase SOD

La SOD est une enzyme antioxydante très importante qui permet le maintien d'une basse concentration de l'anion superoxyde. Elle catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante:



L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de Friedrich et Beauchamp (1971) (274). Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitroblu-tetrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur l'électron comme la méthionine selon la réaction suivante:



La réduction du NBT par l'anion superoxyde en Formazan a été suivie à 560 nm. Une unité d'activité de la SOD est définie entant que la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50%.

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{\text{abs du control} - \text{abs de l'essai}}{\text{abs du control}} \right] \cdot 100$$

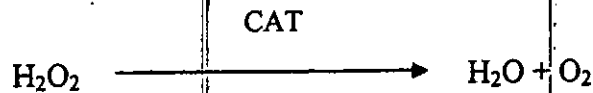
$$\text{SOD UI/ml} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35$$

Le mélange réactionnel contient 2 ml du milieu réactionnel (cyanide de sodium 10^{-2} M, solution du NBT $1,76 \times 10^{-4}$ M, EDTA 66×10^{-3} M et la riboflavine 2×10^{-6} M), 5 μ l de la source enzymatique (cytosol ou matrice mitochondriale) et 5 μ l de l'extrait à tester aux différentes concentrations. Le mélange a été irradié avec une lampe de 15 Watt pendant 10 mn.

Le contrôle est préparé dans les mêmes conditions mais sans source enzymatique. L'absorbance a été mesurée à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI/g de protéine.

III.7.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

C'est une enzyme antioxydante qui existe en forte concentration dans le foie et dans les globules rouges et qui agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante:



L'activité de la catalase a été déterminée en adoptant la méthode de " Clairbone 1985" comme décrite en (275). Le principe est basé sur la disparition de l' H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25° C. En bref, la cuve de mesure contient 1 ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1M, pH 7.2), 0.950 ml peroxyde d'hydrogène (0.019M), 0.025 ml de la source enzymatique et 0,025 ml de différentes concentrations de l'extrait à tester. La lecture de la DO est effectuée à 560 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'AE est exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

$$\text{UI/g de protéine} = (2,3033/T \cdot \text{Log } A_1/A_2) / \text{g protéine.}$$

Sachant que:

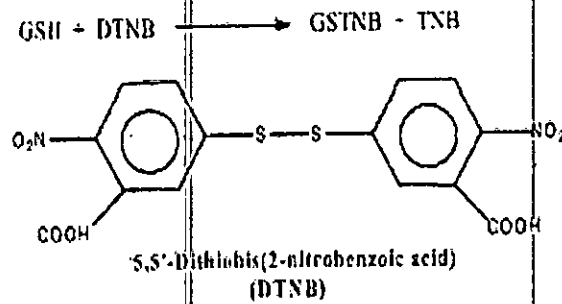
A_1 : Absorbance au temps 0 mn.

A_2 : Absorbance après 1 mn.

T : Intervalle de temps en mn.

III.8. Dosage du glutathion hépatique

Le glutathion est un tripeptide composé de trois aminoacides : 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. La mitochondrie contient environ 10-12 % du glutathion cellulaire (67). Pour le dosage du GSH nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (276) par le réactif DTNB (acide 5,5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque). Le principe de la réaction consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcaline présente une absorbance à 412nm selon la réaction suivante:



Pour cela, 1 g de foie est coupé et homogénéisé avec 3 volumes de l'acide trichloracétique TCA (5%) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. Homogénéisé et centrifugé à 2000 rpm, 50 μ L du surnageant sont ensuite dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH=8). 20 μ l du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 min 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%).

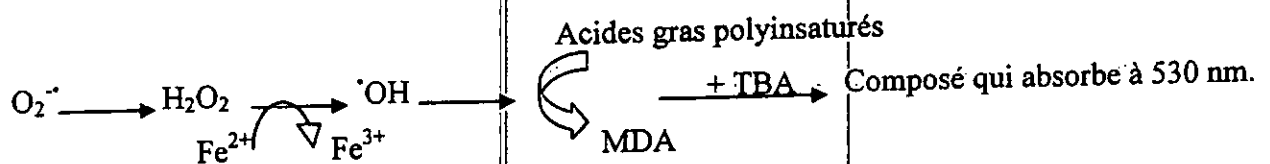
Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimées en millimoles de glutathion par gramme de foie.

III.9. Evaluation de l'activité antilipoperoxydative

III.9.1. Dosage du MDA mitochondriale

Le malondiadehyde (MDA) est l'un des produits terminaux formés lors de la peroxydation lipidique qui résulte de la coupure, médiée par les radicaux libres, des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois double liaisons.

Pour le dosage du MDA mitochondrial nous avons utilisé la méthode décrite en (272). In vitro, la peroxydation lipidique des membranes mitochondriales est induite par le $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ dont le principe est l'induction de la réaction de Fenton et la formation du radical hydroxyle qui attaque les acides gras polyinsaturés. Le MDA formé en présence de deux molécules de TBA et à chaud, donne un complexe rose qui absorbe à 530nm, comme le montre la réaction suivante :



Les mitochondries hépatiques sont suspendues dans le NaCl 0,9% de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 mg/ml. Trois tubes sont utilisés : Le premier tube, témoin contenant 800 μ l de la solution mitochondriale plus 100 μ l du NaCl 0.9%, le deuxième tube; blanc

contenant 200 µl de NaCl (0,9 %) avec 800 µl de la solution mitochondriale, le troisième est le tube de mesure portant 800 µl de la solution mitochondriale additionnée de 100µl de l'extrait à tester (différentes concentrations).

Après incubation de 10 min à 37°C, nous avons ajouté dans chaque tube 100µl de la solution du fer (50 µl FeCl₂ 1m M/50 µl de FeCl₃ à 3mM) , à l'exception du blanc et ce pour induire la peroxydation lipidique. 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) V/V, est ajouté à 1 ml du surnageant. Finalement, le mélange est incubé pendant 30 min à 97°C, refroidit, et la DO est lue à 530 nm. Les concentrations du MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant le tétraethoxypropane.

NB: Pour le dosage du MDA mitochondrial in vivo, on n'ajoute pas la solution du fer.

III.9.2. Dosage du MDA cytosolique

La méthode de Okhawa et al 1979 (277), est utilisée pour ce dosage. Le principe de dosage est le suivant: Le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) dans un milieu acide (pH 2 à 3) et à chaud 100°C pour donner un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n- butanol.

Pour ce dosage nous avons utilisé 1g de foie additionné de 3 ml de la solution de KCL (1,15 %) puis broyé par un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA). A 0.5ml de l'homogénat nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique à 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.67%. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4 ml de n-Butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm.

Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les même conditions en utilisant une solution du tétraethoxypropane (TEP) qui donne après leur hydrolyse du MDA.

IV. Traitement des résultats

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne \pm écart type. Tous les paramètres soumis à l'étude sont qualitatifs par conséquent, il est requis d'appliquer des méthodes statistiques quantitatives.

IV.1. Test de Student

Les normes européennes utilisent le test -t de student pour évaluer les différences entre le groupe témoin et les groupes traités (278). Pour ce fait, nous avons utilisé ce test avec un seuil de signification supérieur à 95 % ($P < 0.05$).

- ($p > 0.05$), effet non significatif.
- ($p < 0.05$), désigne un effet significatif.
- ($p < 0.01$), désigne un effet très significatif.
- ($p < 0.001$), désigne un effet hautement significatif.

VI.2. La corrélation

Nos résultats de l'étude in vitro sont vérifiés par le calcul de la corrélation entre les concentrations des extraits et les paramètres étudiés en calculant le coefficient de PEARSON ou de corrélation "r". Si la valeur de r est voisine à zéro la corrélation est très faible, plus le r tends vers "1" plus la corrélation est forte, si $r = 1$ la corrélation est parfaite.

RESULTATS & INTERPRETATION

RESULTATS & INTERPRETATION

I. Etude phytochimique

Au cours de notre travail, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires de la propolis, les flavonoïdes. La méthodologie de l'étude phytochimique a été essentiellement fondée sur la combinaison de quelques méthodes, test chimique d'identification des aglycones flavoniques, dosage des flavonoïdes, chromatographie sur couche mince et analyse spectrale infrarouge.

I.1. Identification (mise en évidence) des aglycones flavoniques et dosage des flavonoïdes

Le test chimique d'identification des aglycones flavoniques, réaction de *Shibata*, était positif. Il montre une coloration rouge ce qui confirme la présence des aglycones flavoniques aussi bien dans l'extrait éthanolique que dans l'extrait éther diéthylique. Le dosage des flavonoïdes montre que la teneur des flavonoïdes est d'environ 370 mg/g de propolis.

I.2. Chromatographie sur couche mince

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. Le système solvant utilisé est l'éthanol-Eau (6-4) v/v pour l'extrait brut, et le dichlorométhane-Eau (9-1) pour les aglycones flavoniques. Les spots obtenus dans le chromatogramme sont délimités sous lumière UV à 336 nm. Les valeurs des Rf ainsi que la fluorescence des spots figurent dans les tableaux 4 et 5 suivants.

Tableau 4. Comportement chromatographique sur couche mince de l'extrait éthanolique de la propolis.

Rf	0.51	0.60	0.70	0.82	0.89
Fluorescence	Jaune	Violette	violette	Bleu	Jaune

Tableau 5. Comportement chromatographique sur couche mince des aglycones flavoniques de la propolis.

Rf	0.36	0.52	0.6	0.71	0.8	0.89
Fluorescence	Bleu	Jaune	violette	violette	violette	Jaune pâle

Cette analyse par chromatographie nous a permis de révéler la présence de flavones et de flavonoles dans les extraits de propolis. La fluorescence jaune et jaune pâle en UV ainsi que les valeurs de Rf dans le système éthanol-Eau (6-4) ou dichlorométhane-Eau (9-1) sont en faveur

d'une structure flavone. Alors que la fluorescence Bleu et violette en UV est probablement en faveur d'une structure flavonole.

Après développement, les plaques sont pulvérisées avec une solution éthanolique de $AlCl_3$ à 1 % puis séchées. Dans le visible, on observe une coloration jaune. Alors que l'observation du chromatogramme à la lumière UV à 336 nm nous a donné une fluorescence allant du bleu au brun. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène du carbonyle en 4 et OH en 5 et/ou en 3 ou bien entre les deux OH libre en position ortho des flavonoïdes ce qui indique la nature aglycone des flavonoïdes.

I.3. Spectres infrarouges

Les spectres infrarouges enregistrés pour l'extrait brut et les aglycones flavoniques de la propolis sont donnés dans les tableaux 21 et 22 respectivement.

Pour l'extrait brut, les vibrations d'élongation "ν" de la fonction (OH) apparaissent entre 3300-3400 cm^{-1} , ceux de la fonction (C-H) aromatique à 3000 cm^{-1} et de la fonction (C=O) à 1650 cm^{-1} . Les vibrations d'élongation de la fonction (C-C) aromatique apparaissent entre 1200-1450 cm^{-1} et ceux de la fonction (C-O) à 1150 cm^{-1} . Ces fonctions détectées dans le spectre sont tous présentes dans la structure de base des flavonoïdes. Les mêmes fonctions apparaissent dans le spectre des aglycones flavoniques mais avec des bandes plus intenses et plus claires.

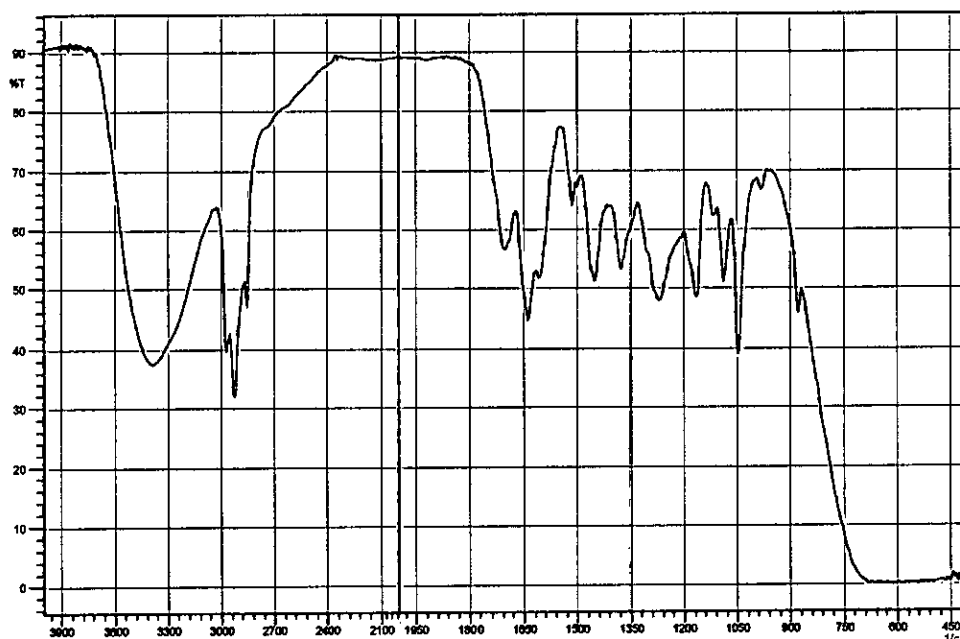


Figure 21. Spectre infrarouge de l'extrait éthanolique de la propolis.

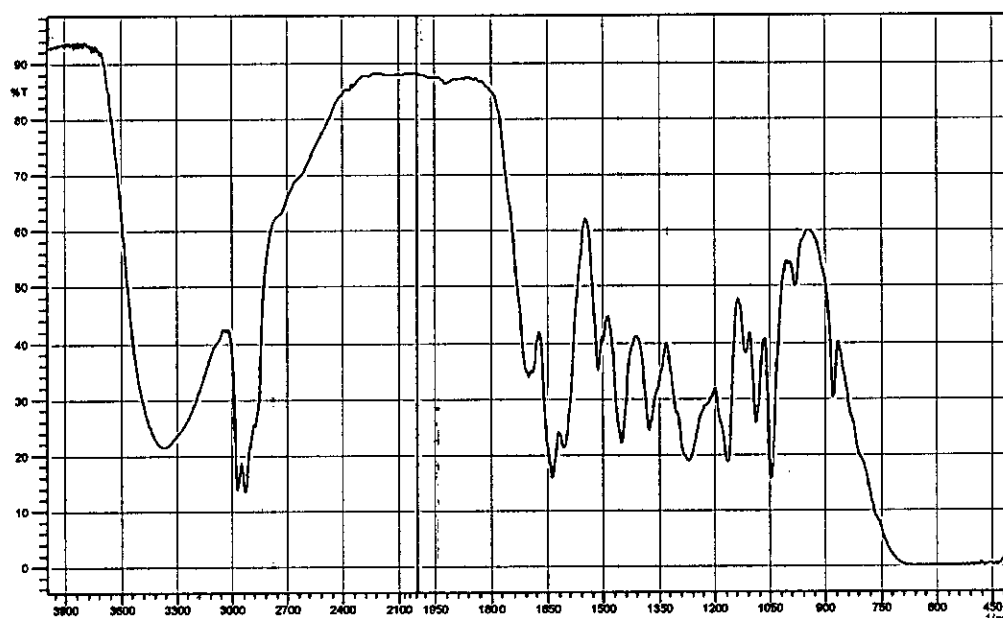


Figure 22. Spectre infrarouge des aglycones flavoniques de la propolis.

II. Etude in vitro de l'effet de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cellulaire:

I.1. Evaluation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de la propolis, nous avons mesuré la capacité de piégeage des radicaux libres in vitro en déterminant le pourcentage de réduction du DPPH° (2,2-diphényl,1-picrylhydrazyl), radical libre stable.

Dans le tableau 6 et la figure 23, on a regroupé les variations de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis, de ses aglycones flavoniques et de la vitamine E à différentes concentrations molaires vis-à-vis de ce radical libre.

On constate que l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques, de la propolis ont un effet scavenger très puissant. Ces extraits sont actifs à des concentrations allant jusqu'à 10^{-8} M. En effet les deux extraits ont un effet piègeur maximal à 10^{-2} M, atteint 91,22 % et 90,33 % respectivement contre 43,44 % seulement avec la vitamine E. Ces pourcentages peuvent être considérée comme inhibition totale du DPPH° car à la fin de la réaction, la solution finale possède toujours une couleur jaunâtre. À 10^{-3} M, l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques possèdent un pourcentage de réduction de 81,11 % et 81,33 % respectivement contre 35 % seulement avec la vit E.

Comparant ces résultats, les deux extraits de propolis sont beaucoup plus efficace ($p < 0,001$) que la vitamine E, l'antioxydant de référence et qui est connue comme le chef de fil des

antioxydants piègeurs des radicaux libres. A 10^{-2} M, les deux extraits sont deux fois plus actifs que la vit E. Il apparaît également que cet effet scavenger de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques est fortement lié à la concentration ($r= 0.94$) et ($r= 0.97$) respectivement.

Tableau 6. Variation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques, de la propolis et de la vitamine E à différentes concentrations molaires vis-à-vis du radical libre DPPH° in vitro.

		Concentrations des extraits (M)						
Extraits		10 ⁻² -M	10 ⁻³ -M	10 ⁻⁴ -M	10 ⁻⁵ -M	10 ⁻⁶ -M	10 ⁻⁷ -M	10 ⁻⁸ -M
% de réduction du DPPH°	Extrait éthanolique de la propolis	91.22%	86.11%	85 %	75 %	56.88%	53.5 %	25.77%
	Aglycones flavoniques de la propolis	90.33%	81.33%	60.33%	54.44%	49.66%	14.66%	13.55%
	Vitamine E	43.44%	35 %	22.4 %	14.83%	10.8%	4%	4%

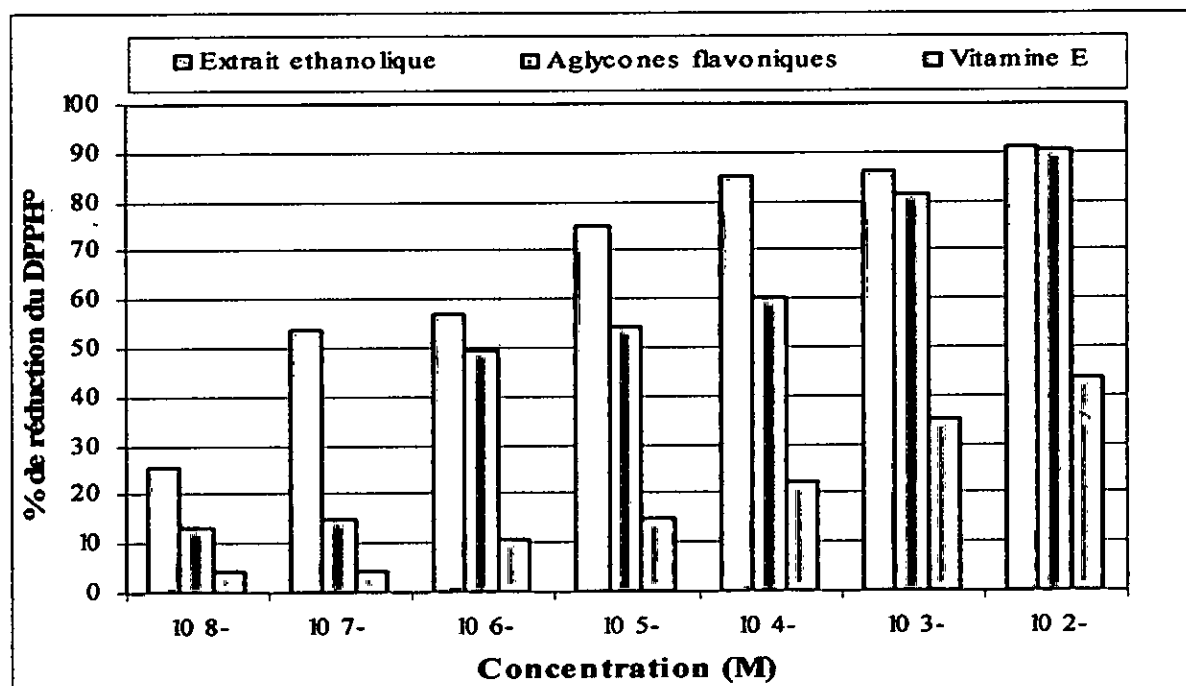


Figure 23. Variation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques, de la propolis et de la vitamine E à différentes concentrations molaires vis-à-vis du radical libre DPPH° in vitro.

II.2. Evaluation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde

La mesure de la production de l'anion superoxyde par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale constitue le paramètre le plus important dans l'étude du stress oxydant, car le superoxyde est le principal précurseur des autres espèces réactives de l'oxygène responsables de l'induction du stress oxydant.

Les résultats obtenus quant à l'effet des différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques, de la propolis sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde sont représentés dans le tableau 7 et la figure 24.

L'extrait éthanolique de la propolis entraîne une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de la production mitochondriale de l'anion superoxyde de 10^{-2} M à 10^{-4} M et très significative ($p < 0,01$) à 10^{-5} M et 10^{-6} M. Ainsi cette production est de 44,8 % à 10^{-2} M, avec un pourcentage d'inhibition de la production de plus de 55 % par rapport au témoin.

De même, les aglycones flavoniques inhibent la production mitochondriale de l'anion superoxyde de façon hautement significative ($p < 0,001$) aux concentrations 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M, atteint à 10^{-2} M 30,8 % avec une inhibition d'environ 70 %, et de façon significative ($p < 0,01$) à 10^{-7} M. Cependant à 10^{-8} M, les deux extraits n'ont pas d'effet significatif ($p > 0,05$) sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde. On constate que cette production est inversement corrélée avec la dose ($r = -0,94$) et ($r = -0,96$) pour l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques respectivement. Comparant ces résultats, on constate que l'effet inhibiteur des aglycones flavoniques sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde est supérieur ($p < 0,01$) à celui obtenu avec l'extrait éthanolique aux concentrations de 10^{-2} M à 10^{-6} M.

Tableau 7: Variation de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat en présence de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis in vitro.

		Concentration des extraits (M)						
Extraits		10 ⁻² -M	10 ⁻³ -M	10 ⁻⁴ -M	10 ⁻⁵ -M	10 ⁻⁶ -M	10 ⁻⁷ -M	10 ⁻⁸ -M
% de production de l'O ₂ ⁻	Extrait éthanolique de la propolis	44.8% ***	%48 ***	%69.2 ***	70.8% **	72.0% **	82.8% *	83.4% ns
	Aglycones flavoniques de la propolis	30.8 % ***	%36.4 ***	%39 ***	%47.4 ***	%59.6 ***	80 % *	82.01% ns

Témoin: 100%. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif (p > 0.05), (*) désigne un effet significatif (p < 0.05), (**) désigne un effet très significatif (p < 0.01), (***) désigne un effet hautement significatif (p < 0.001).

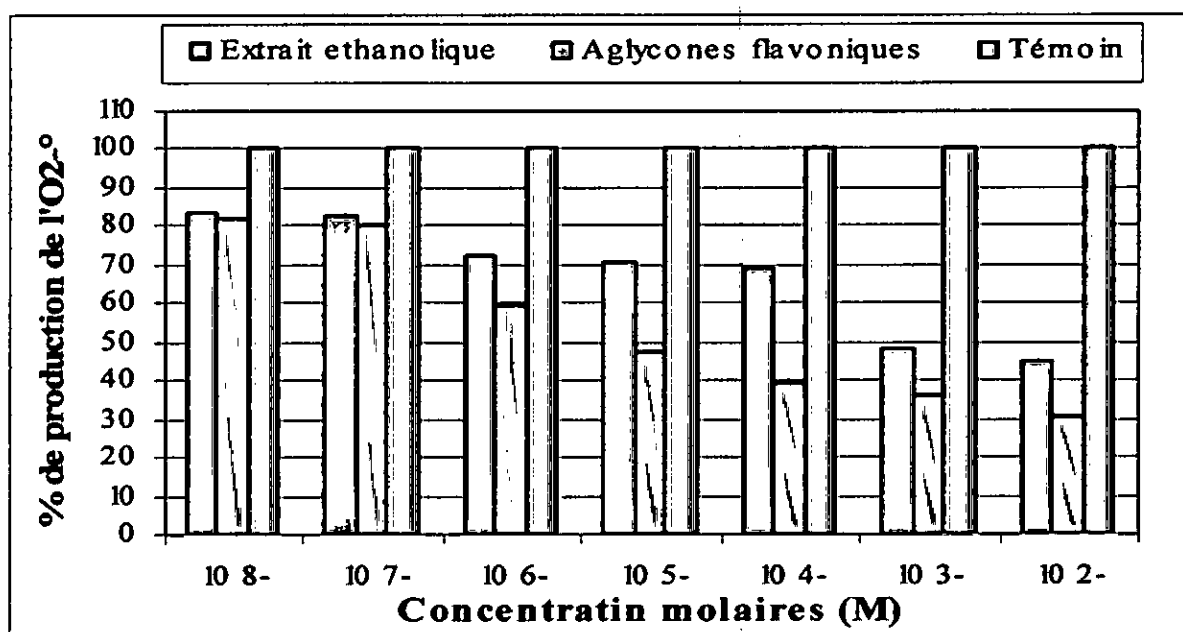


Figure 24. Variation de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat en présence de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis in vitro.

II.3. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale induite in vitro par le fer

Le dialdéhyde molonique (MDA) est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment pour la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage.

L'incubation des mitochondries hépatiques de rat avec l'extrait éthanolique ou les aglycones flavoniques de la propolis à différentes concentrations molaires étudiées, de 10⁻² M à 10⁻⁸ M.,

conduit à une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) des taux du MDA issu de la peroxydation lipidique des membranes mitochondriales induite in vitro par le $FeCl_2/FeCl_3$ comme il est montré dans le tableau 8 et la figure 25. Cette diminution est fortement corrélée avec les concentrations des principes actifs ($r = -0.96$) et ($r = -0.98$) pour l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques respectivement. En effet, à 10^{-2} M le taux du MDA est de $5,20 \pm 1,70$ nmoles/g de protéines avec l'extrait éthanolique contre 25.01 ± 9.31 nmoles/mg de protéines du control et représente une inhibition de 80 % de la peroxydation lipidique. Avec les aglycones flavoniques, le taux du MDA à 10^{-2} M est de $3,06 \pm 1,19$ nmoles /mg de protéines soit une réduction de la peroxydation par 88 %. Même à 10^{-8} M, les deux extraits inhibent la peroxydation lipidique et ce par 33,71 % et 58,45 % avec l'extrait éthanolique et les aglycones respectivement. On enregistre également que les aglycones flavoniques sont plus efficaces ($p < 0,01$) que l'extrait éthanolique sur l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Tableau 8. Variation des taux du MDA mitochondrial généré suite à la peroxydation lipidique induite in vitro par le $FeCl_2/FeCl_3$ en présence de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis.

		Concentration molaire des extraits (M)						
		10 ⁻² -M	10 ⁻³ -M	10 ⁻⁴ -M	10 ⁻⁵ -M	10 ⁻⁶ -M	10 ⁻⁷ -M	10 ⁻⁸ -M
Concentration du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines)	Extrait éthanolique de la propolis	5.20 ± 1.07 ***	5.79 ± 0.99 ***	9.31 ± 2.97 ***	9.07 ± 2.11 ***	11.05 ± 7.01 ***	16.54 ± 4.36 ***	16.58 ± 10.78 ***
	Aglycones flavoniques de la propolis	3.06 ± 1.19 ***	4.01 ± 1.22 ***	6.55 ± 1.52 ***	8.52 ± 2.77 ***	8.96 ± 3.14 ***	11.55 ± 3.08 ***	14.67 ± 9.53 ***

Témoin: 25.01 ± 9.31 nmoles/mg de protéines. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 10$ dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

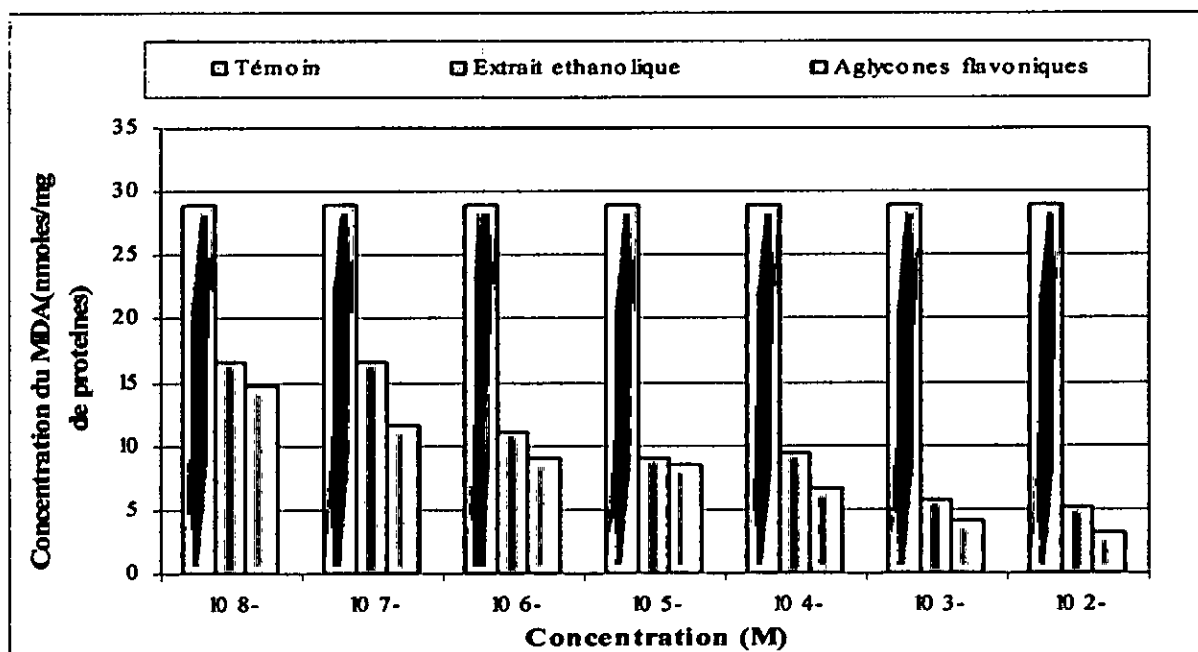


Figure 25. Variation des taux du MDA mitochondrial généré suite à la peroxydation lipidique induite in vitro par le FeCl₂/FeCl₃ en présence de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis.

II-4- Evaluation du gonflement Mitochondrial in vitro "Mitochondrial Swelling"

Le gonflement mitochondrial est le résultat de l'ouverture d'un pore ou d'un canal au niveau de la membrane mitochondriale dont le diamètre à l'ouverture complète est de 3 nm "pore géant de la mitochondrie". Cette ouverture conduit à une augmentation rapide de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne vis-à-vis des molécules de poids moléculaire inférieur à 1500 daltons, de l'eau et des électrolytes responsables du gonflement. Ce phénomène se traduit par une diminution progressive de l'absorbance de la suspension mitochondriale à 540 nm.

Les résultats de l'effet des différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur le gonflement mitochondrial ou sur l'induction ou l'inhibition de l'ouverture du (PTP) in vitro, sont représentés dans les tableau 9 et 10 et la figure 26.

L'incubation des mitochondries hépatiques de rat dans le tampon respirant en présence de succinate (6Mm) comme substrat de complexe II suivie par l'addition de 100 µM de CaCl₂ aboutit à une diminution accrue de la DO à 540 nm chez le témoin. Cette diminution de la densité optique traduit l'augmentation du volume de la matrice mitochondriale suite à l'ouverture du pore de transition de perméabilité membranaire par le calcium.

On enregistre que l'extrait éthanolique et les aglycones entraînent une diminution du gonflement mitochondrial de façon hautement significative ($p < 0,001$) avec les quatres concentrations

étudiées, de 10^{-2} M à 10^{-8} M. En effet, à 10^{-2} M on enregistre un gonflement de 24,52% et 31,97% successivement avec l'extrait éthanolique et les aglycones, par rapport aux témoins, soit une réduction du gonflement mitochondrial par 75,48 % et 68,03 % successivement. A 10^{-8} M, on enregistre un gonflement de 64,31% et 65,05 % successivement avec l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques, soit une réduction minimale de 35,69 % et 34,95 % respectivement. Il apparaît que cette réduction du gonflement est fortement corrélée avec les concentrations des deux extraits ($r= 0.99$) et ($r = 0.91$) pour l'extrait brut et les aglycones respectivement.

Comparant ces résultats, on constate que l'extrait éthanolique a un effet sur le gonflement mitochondrial supérieur ($p<0,01$) à celui des aglycones flavoniques.

Tableau 9. Variation du gonflement des mitochondries hépatiques de rat in vitro en fonction de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique de la propolis.

	Témoin	EEP 10 2-M	EEP 10 4-M	EEP 10 6-M	EEP 10 8-M
Absorbance (chaque mn pendant 5 mn)	-0.067± 0.002	-0.013± 0.003	-0.036± 0.008	-0.030± 0.005	-0.050 ±0.005
	-0.100± 0.036	-0.035± 0.007	-0.051± 0.007	-0.061± 0.002	-0.076± 0.003
	-0.155± 0.060	-0.046± 0.008	-0.600± 0.008	-0.078± 0.002	-0.104 ±0.005
	-0.197± 0.080	-0.054 ±0.005	-0.075± 0.004	-0.096± 0.007	-0.133± 0.002
	-0.219 ±0.069	-0.064± 0.005	-0.096±0.002	-0.116± 0.006	-0.149± 0.003
	-0.269± 0.053	-0.066± 0.002	-0.114± 0.001	-0.141± 0.006	-0.173± 0.002
% du gonflement	100%	24.52 % ***	42.37 % ***	52.41 % ***	64.31 % ***

EEP : Extrait éthanolique de la propolis. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

Tableau 10. Variation du gonflement des mitochondries hépatiques de rat in vitro en fonction de différentes concentrations molaires des aglycones flavoniques de la propolis.

	Témoin	AFP 10 2-M	AFP 10 4-M	AFP 10 6-M	AFP 10 8-M
Absorbance (chaque mn pendant 5 mn)	-0.067± 0.002	-0.019± 0.004	-0.030 ±0.007	-0.030± 0.023	-0.040 ±0.029
	-0.100± 0.036	-0.031± 0.011	-0.041± 0.008	-0.058± 0.012	-0.081± 0.032
	-0.155± 0.060	-0.043± 0.010	-0.056± 0.006	-0.074 ±0.031	-0.074 ±0.075
	-0.197± 0.080	-0.055± 0.012	-0.086± 0.016	-0.104± 0.040	-0.140± 0.088
	-0.219 ±0.069	-0.067±0.015	-0.095± 0.024	-0.129± 0.079	-0.165± 0.098
	-0.269± 0.053	-0.086 ±0.012	-0.110± 0.052	-0.162± 0.054	-0.175± 0.091
% du gonflement	100%	31.97% ***	55.76 % ***	60.22 % ***	65.05 % ***

AFP: Aglycones flavoniques. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

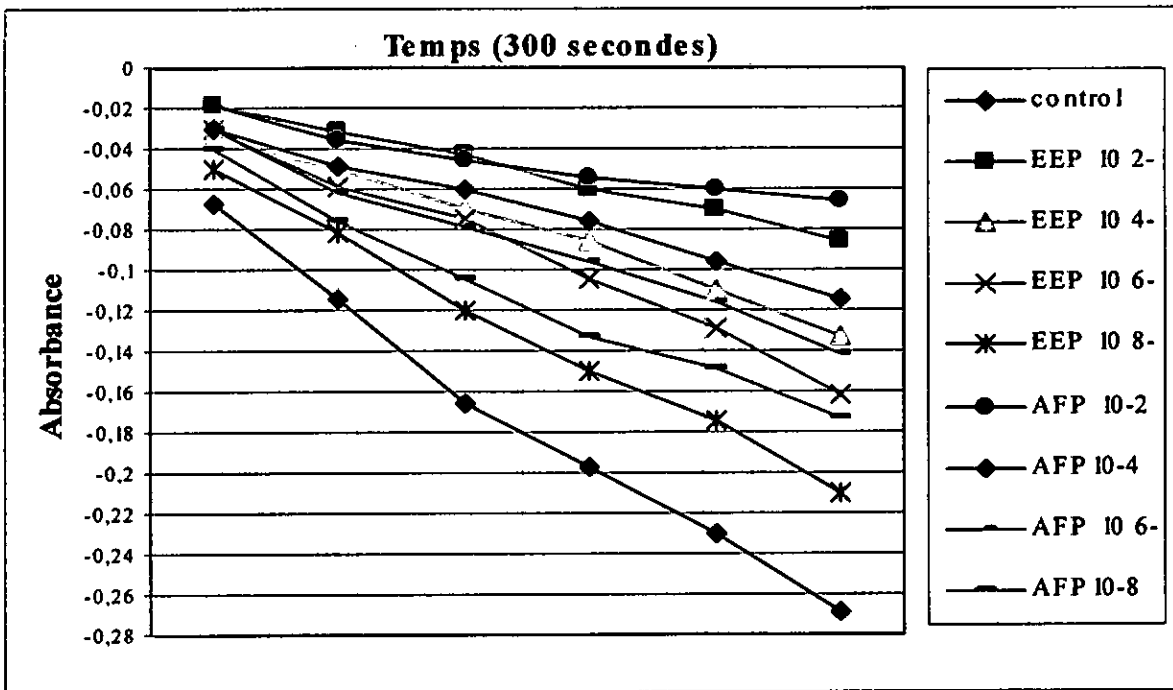


Figure 26. Variation du gonflement des mitochondries hépatiques de rat in vitro en fonction de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanologique et des aglycones flavoniques de la propolis. EEP : Extrait éthanologique de la propolis. AFP: Aglycones flavoniques.

II.5. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

L'évaluation de l'effet de nos extraits sur l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes permet de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces principes actifs.

II.5.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale

Les variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanologique et des aglycones flavoniques de la propolis in vitro sont représentées dans le tableau 11 et dans les figures 27 et 28 respectivement.

On constate que l'extrait éthanologique entraînent une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale ou Mn-SOD, aux concentrations 10^{-2} , 10^{-4} et 10^{-6} M, alors que à 10^{-8} M l'augmentation est non significative ($p > 0,05$). Avec les aglycones flavoniques, on enregistre une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique à 10^{-2} et 10^{-4} M. On constate également, une corrélation positive entre l'activité enzymatique et la concentration des extraits ($r = 0,97$) et ($r = 0,96$) pour l'extrait éthanologique et les aglycones successivement.

De même pour la SOD cytosolique ou Cu/Zn-SOD. on constate une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique ($p < 0,001$) à 10^{-2} M et 10^{-4} M avec es 2 extraits. À 10^{-6} M et 10^{-8} M, l'extrait éthanolique et les aglycones de la propolis n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique. L'augmentation de l'activité enzymatique est fortement corrélée avec la concentration des extraits ($r = 0,99$) et ($r = 0,93$) pour l'extrait éthanolique et les aglycones respectivement.

Tableau 11. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations molaire de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis in vitro.

		Concentration molaire des extraits (M)			
Extraits		10 ⁻² -M	10 ⁻⁴ -M	10 ⁻⁶ -M	10 ⁻⁸ -M
SOD cytosolique (UI /g de protéines)	Extrait éthanolique de la propolis	2454.22 ± 673.76 ***	2212.41 ± 629.3 ***	1915.09 ± 603 ns	1742.29 ± 505.73 ns
	Aglycones flavoniques de la propolis	2444.24 ± 593.75 ***	2300.75 ± 692.3 ***	1920.35 ± 601.3 ns	1960.43 ± 693.8 ns
SOD mitochondriale (UI /g de protéines)	Extrait éthanolique de la propolis	1763.75 ± 1123.2 ***	1175 ± 923.5 ***	1014.12 ± 827.06 ***	890 ± 230 ns
	Aglycones flavoniques de la propolis	1928.49 ± 1028.01 ***	1328.49 ± 901.3 ***	783.5 ± 230.1 ns	887.21 ± 220 ns

Témoin SOD mitochondriale ou Mn-SOD : 881.46 ± 32.9 UI/g de protéines.

Témoin SOD cytosolique ou Cu/Zn-SOD : 1924.48 ± 420 (3102 ± 920.01) UI/g de protéines.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0,05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,001$).

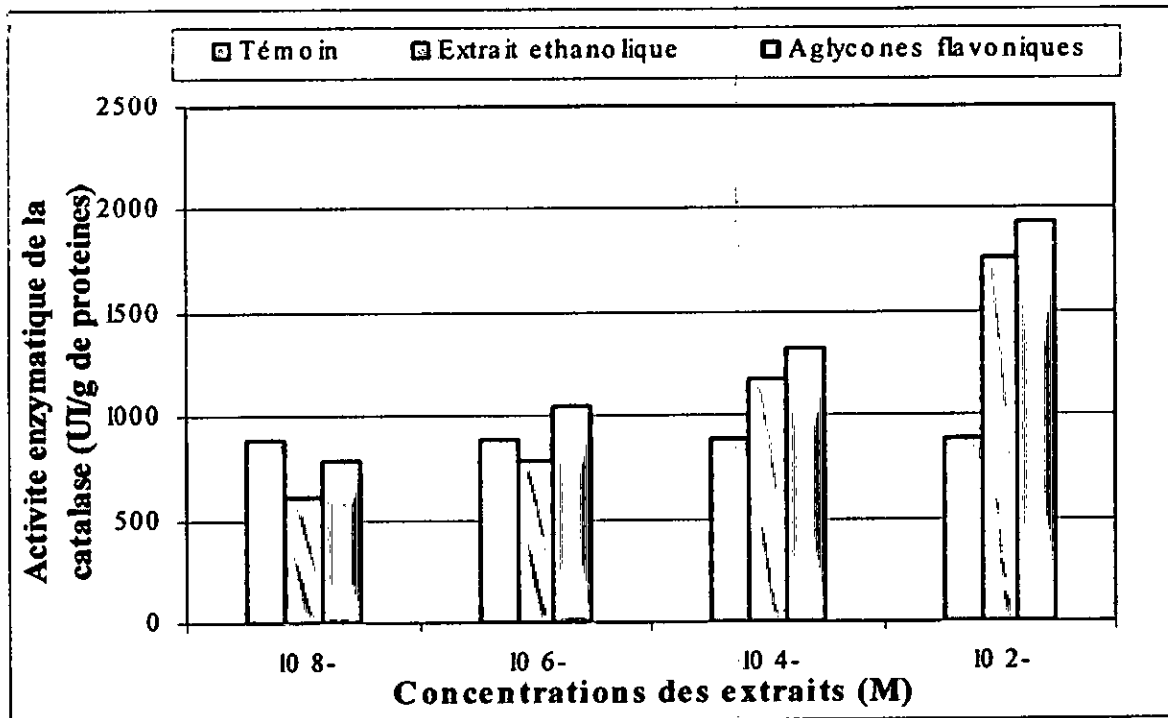


Figure 27. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale en présence de différentes concentrations molaire de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis in vitro.

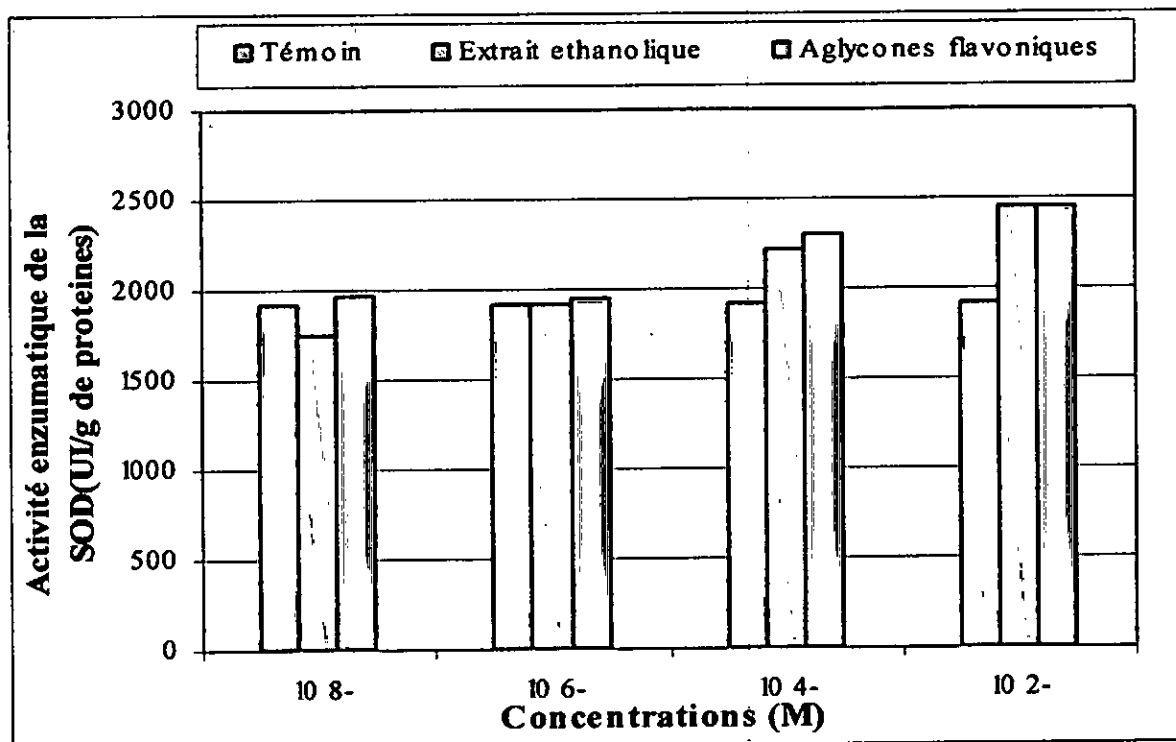


Figure 28. Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique in vitro en présence de différentes concentrations molaire de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis.

II-5-2-Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale

Les variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique en fonction de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques in vitro sont représentées dans les figures 29 et 30 respectivement et dans le tableau 12.

Pour l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale une augmentation non significative ($p > 0,05$) de l'activité enzymatique est observée à 10^{-8} M des deux extraits. Dès la concentration 10^{-6} M, on constate une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique avec les deux extraits, les résultats obtenus avec les deux extraits sont comparables ($p > 0,05$). De plus, il existe une forte corrélation positive entre l'activité enzymatique et la concentration de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques ($r = +0,90$) et ($r = 0,94$) respectivement.

On constate une augmentation très significative ($p < 0,01$) de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique à 10^{-2} M de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques atteint, $3994,05 \pm 1173,76$ et $4304,91 \pm 1193,2$ UI/g de protéines respectivement, alors que à 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8} M ces extraits n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique ($p > 0,05$). Cette augmentation de l'activité enzymatique est fortement corrélée avec la concentration de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques ($r = +0,98$) et ($r = +0,94$) respectivement.

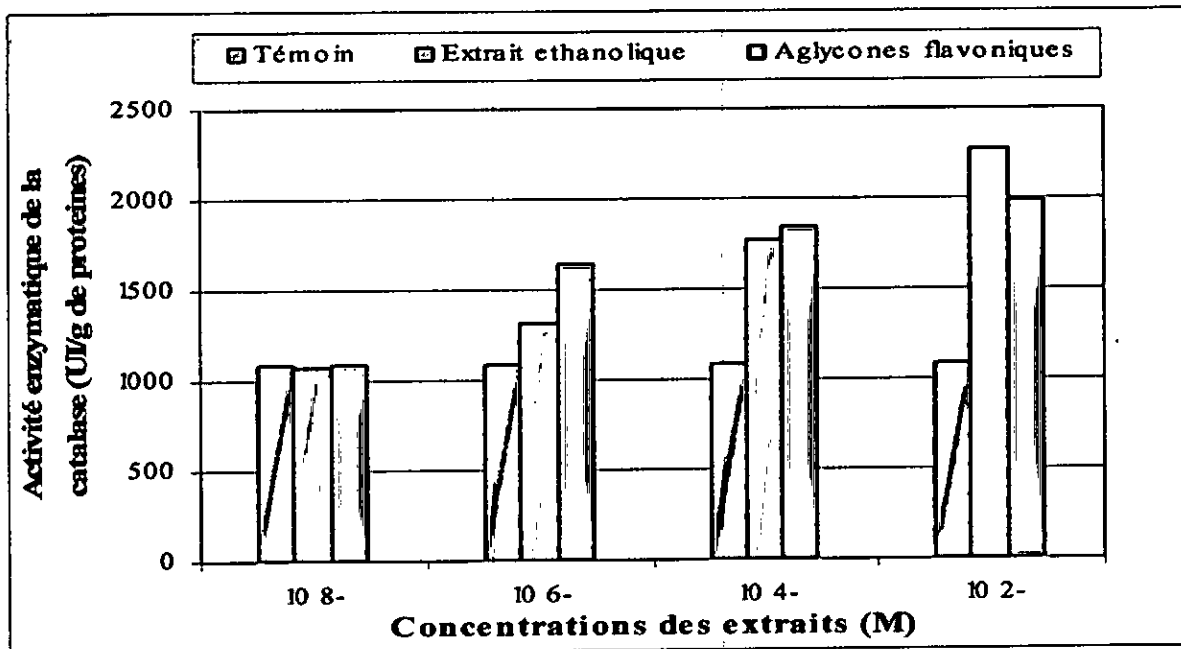


Figure 29. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale in vitro en présence de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis.

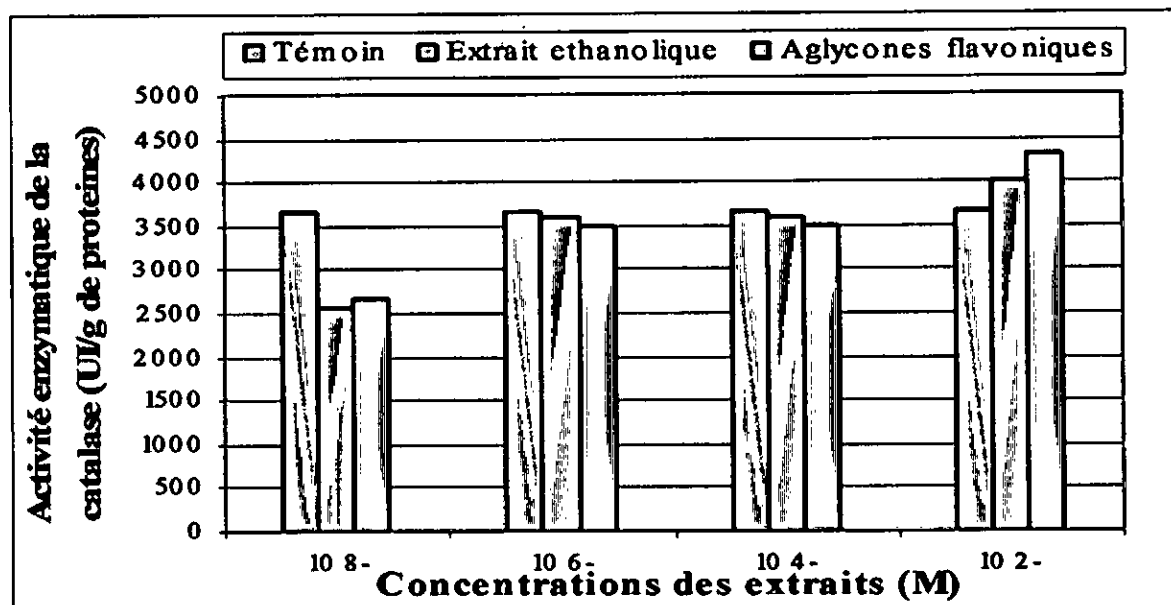


Figure 30. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale in vitro en présence de différentes concentrations molaire de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis.

Tableau 12. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique in vitro en présence de différentes concentrations molaire de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis.

Activité enzymatique	Extraits	Concentration des extraits (M)			
		10 ⁻² -M	10 ⁻⁴ -M	10 ⁻⁶ -M	10 ⁻⁸ -M
Catalase cytosolique (UI /g de protéines)	Extrait éthanolique de la propolis	3994.05±1173.76 **	3612.72±929.13 ns	3610.15±853.2 ns	1071.79±503.42 ns
	Aglycones flavoniques	4304.91±193.72 ***	3498.44±893.13 ns	3504.39±703.51 ns	1079.29±188.8 ns
Catalase mitochondriale (UI/g de protéines)	Extrait éthanolique de la propolis	2178.4±103.45 ***	1777.31±90.42 ***	1308.79±713.79 ***	1071.79±503.42 ns
	Aglycones flavoniques	1989.23±103.23 ***	1842.56±213.2 ***	1442.56±197.23 ***	1079.29±188.8 Ns

Témoin catalase cytosolique : 3666.1 ± 1023 UI/ g de protéines.

Témoin catalase mitochondriale : 1088.18 ± 92.75 UI/ g de protéines.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif (p > 0.05), (*) désigne un effet significatif (p < 0.05), (**) désigne un effet très significatif (p < 0.01), (***) désigne un effet hautement significatif (p < 0.001).

III. Etude de l'effet de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cellulaire in vivo à long terme

III.1. Evaluation de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques

Les résultats obtenus concernant l'effet de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis (100 mg/kg/jour pendant 2 mois) sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde sont représentés dans le tableau 13 et la figure 31.

On constate une réduction hautement significative ($p < 0.001$) de la production mitochondriale de l'anion superoxyde après 2 mois de traitement par l'extrait éthanolique et par les aglycones flavoniques de la propolis. Le pourcentage de production est identique pour les deux extraits, il est de 7.77% et est comparable ($p > 0.05$) à celui obtenu avec la quercétine (9.77%). Le pourcentage de réduction est de 92.23 % et 90.23 % successivement.

Tableau 13. Effet à long terme de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis administrés par voie orale à la dose de (100 mg/kg/j) et de la quercétine à (0.033 mg/kg/j) pendant deux mois sur la production de l'anion superoxyde par le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale.

	Témoin	Extrait éthanolique de la propolis (100 mg/kg)	Aglycones flavoniques de la propolis (100 mg/kg)	Quercétine (0.033mg/kg)
Absorbance (Chaque minute /4mn)	0.110 ± 0.01	0.078 ± 0.029	0.047 ± 0.004	0.016 ± 0.012
	0.190 ± 0.03	0.061 ± 0.022	0.039 ± 0.002	0.03 ± 0.024
	0.250 ± 0.05	0.051 ± 0.026	0.031 ± 0.001	0.037 ± 0.021
	0.360 ± 0.07	0.043 ± 0.031	0.032 ± 0.003	0.039 ± 0.018
	0.450 ± 0.06	0.035 ± 0.030	0.035 ± 0.001	0.044 ± 0.021
% de production	100 %	7.77 % ***	7.77 % ***	9.77 % ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

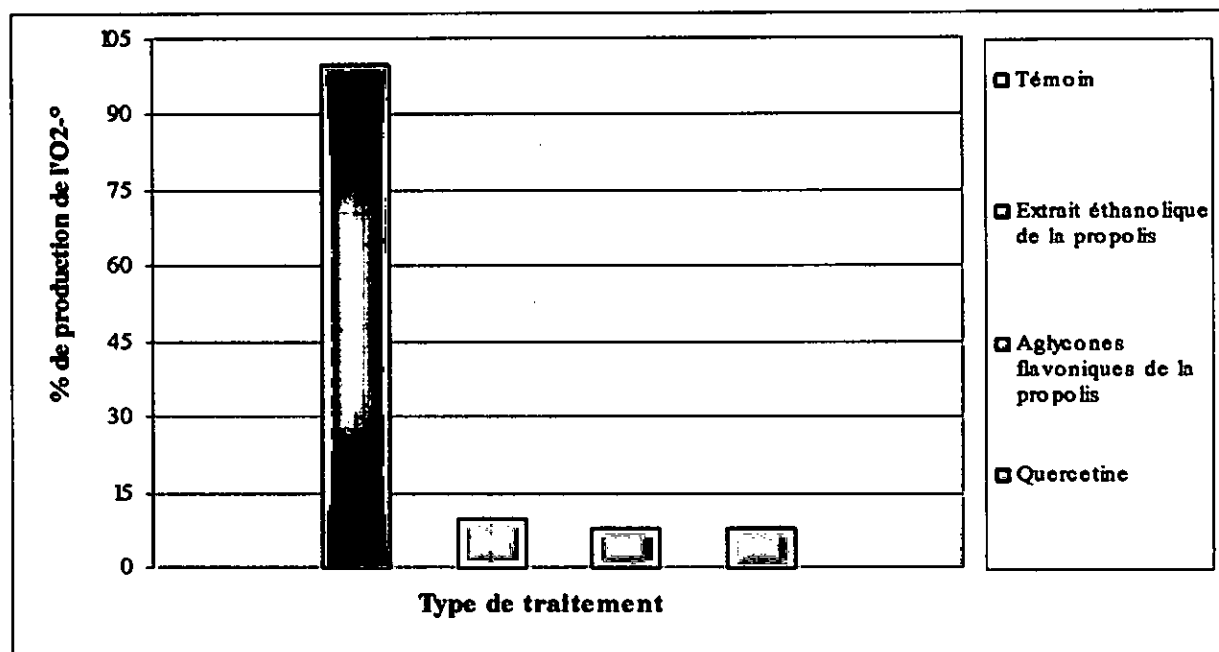


Figure 31. Effet à long terme de l'extrait éthanologique, des aglycones flavoniques de la propolis administrés par voie orale à la dose de (100 mg/kg/j) et de la quercetine à (0.033 mg/kg/j), pendant deux mois sur la production de l'anion superoxyde par le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale.

III.2. Evaluation du gonflement mitochondrial "mitochondrial Swelling"

Les résultats de l'effet du traitement par l'extrait éthanologique et par les aglycones flavoniques de la propolis (100 mg/kg / j) pendant 2 mois, sur le gonflement mitochondrial, sont représentés dans le tableau 14 et la figure 32.

On enregistre un gonflement mitochondrial de 30.85% avec l'extrait éthanologique de la propolis par contre avec les aglycones flavoniques un gonflement de 16,2% seulement contre le 100% du témoin. En effet, l'extrait éthanologique et les aglycones flavoniques inhibent le gonflement mitochondrial de façon hautement significative ($p < 0,001$) d'où un effet antiapoptotique. Cette inhibition est de 69,15% et 83,8% respectivement. D'après les valeurs obtenues, on constate que les aglycones flavoniques de la propolis ont un effet inhibiteur du gonflement 2 fois plus que celui obtenues avec l'extrait éthanologique.

Tableau 14. Effet à long terme de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis administrés par voie orale à la dose de (100 mg/kg/j) et de la quercétine à (0.033 mg/kg/j), pendant deux mois sur le gonflement des mitochondries hépatiques de rat.

	Témoin	Extrait éthanolique de la propolis (100 mg/kg)	Aglycones flavoniques (100 mg/kg)
Absorbance (Chaque minute /5mn)	-0.067 ± 0.002	-0.005 ± 0.002	-0.005 ± 0.006
	-0.160 ± 0.036	-0.014 ± 0.020	-0.024 ± 0.018
	-0.155 ± 0.060	-0.033 ± 0.017	-0.025 ± 0.014
	-0.197 ± 0.080	-0.042 ± 0.019	-0.028 ± 0.005
	-0.219 ± 0.069	-0.064 ± 0.037	-0.035 ± 0.008
	-0.269 ± 0.053	-0.083 ± 0.046	-0.047 ± 0.007
% du gonflement	100 %	30.85 % ***	16.2 % ***

Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe.

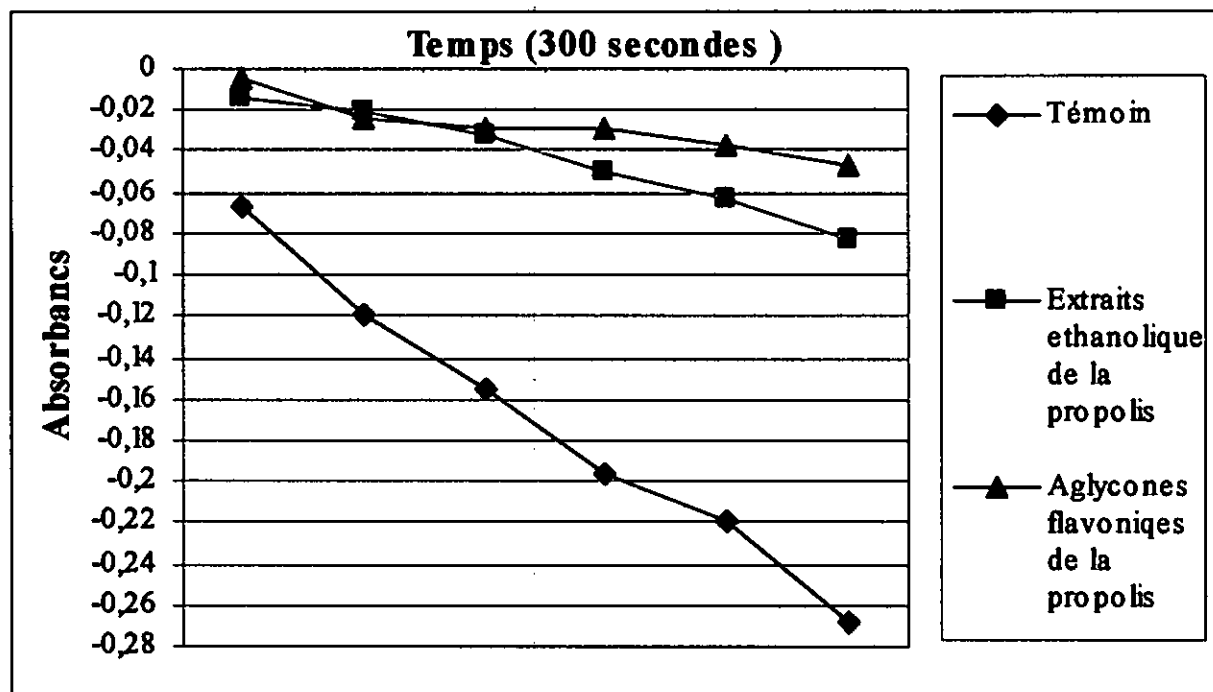


Figure 32. Effet à long terme de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis administrés par voie orale à la dose de (100 mg/kg/j) et de la quercétine à (0.033 mg/kg/j), pendant deux mois sur le gonflement des mitochondries hépatiques de rat.

III.3. Evaluation de la peroxydation lipidique

Les variations des taux du MDA mitochondrial et cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanolique, par les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100

mg/kg/j) et par la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois, sont représentées dans le tableau 15 ci-dessous.

Tableau 15. Variation des taux du MDA mitochondrial et cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

	Témoin	Extrait éthanolique de la propolis (100 mg/kg)	Aglycones flavoniques (100 mg/kg)	Quercetine (0.033 mg/kg)
Concentration du MDA cytosolique (nmoles/g de foie)	34.3 ± 1.4	14.5 ± 3.85 ***	13.5 ± 2.93 ***	17.22 ± 1.08 ***
Concentration du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines)	25 ± 8.31	5.76 ± 0.38 ***	5.57 ± 0.5 ***	5.59 ± 0.16 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

III.3.1. Evaluation des taux du MDA mitochondriale

La figure 33 représente les variations des taux du MDA mitochondrial hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

Après 2 mois de traitement on constate une diminution hautement significative ($p < 0.001$) des taux du MDA mitochondrial atteint $5,76 \pm 0,38$ et $5,57 \pm 0,5$ nmoles/mg de protéines avec l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis respectivement contre $25 \pm 8,31$ nmoles/ mg de protéine chez le témoin, avec un pourcentage de réduction de 76,96 et 77,92% respectivement. L'inhibition obtenue avec le flavonoïde de référence est de 77,64%. On constate également que les deux extraits donnent le même effet sur le taux du MDA et qui est comparable ($p > 0,05$) à celui de la quercétine.

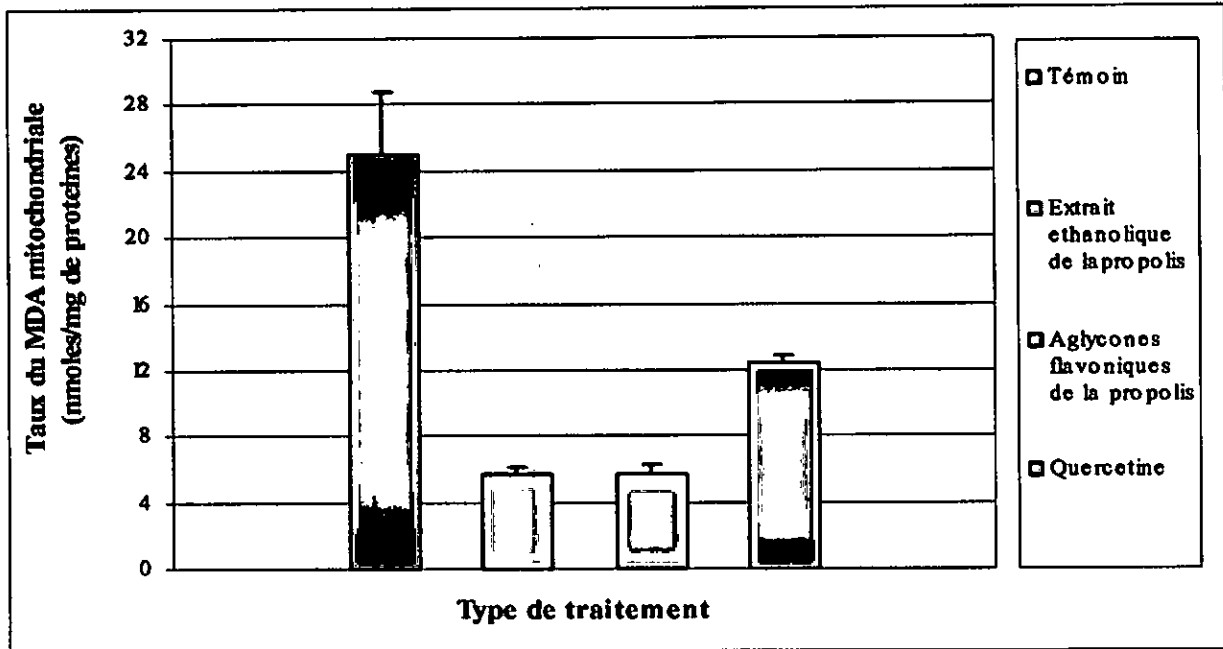


Figure 33. Variation des taux du MDA mitochondrial hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

III.3.2. Evaluation des taux du MDA cytosolique

L'effet de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur le taux du MDA cytosolique à long terme, est illustré dans la figure 34.

On constate une diminution hautement significative ($p < 0,001$) des taux du MDA cytosolique après 2 mois de traitement par l'extrait éthanolique et par les aglycones flavoniques de la propolis par rapport au témoin, atteint respectivement $14,5 \pm 3,85$ et $13,5 \pm 2,93$ nmoles/g de foie, contre $34,3 \pm 1,14$ nmoles/g de foie chez les témoins. Cette réduction de la peroxydation lipidique qui est de l'ordre de 57,33% et 60,65% avec l'extrait éthanolique et les aglycones successivement est supérieur ($p < 0,01$) à celle obtenue avec la quercétine (49,8% seulement).

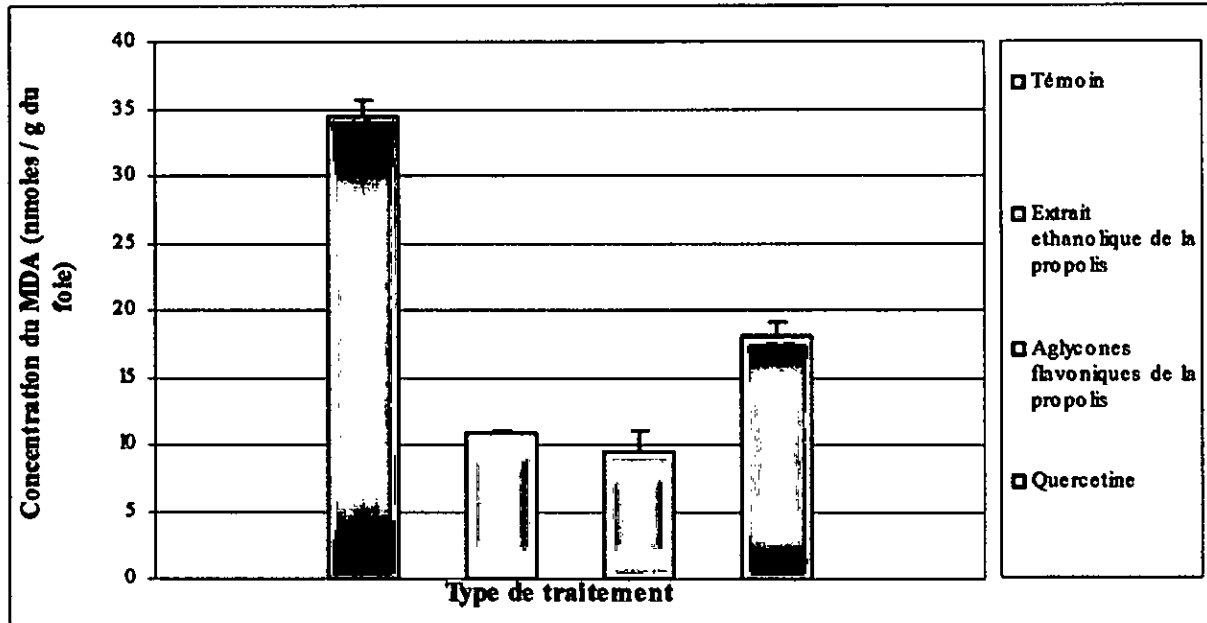


Figure 34. Variation des taux du MDA cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanologique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

III.2.4. Evaluation des taux de glutathion hépatique

Le taux du GSH cytosolique, après 2 mois de traitement par l'extrait éthanologique et par les aglycones flavoniques de la propolis (100 mg/kg/j) est représenté dans le tableau 16 et la figure 35.

On constate une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) du taux de GSH, sous l'effet de l'extrait éthanologique et des aglycones flavoniques qui atteint $1,75 \pm 0,1$ et $2,05 \pm 0,9$ mmole/g de foie respectivement, avec $0,95 \pm 0,22$ mmole/g de foie chez le groupe témoin et $1,43 \pm 0,13$ mM avec la quercétine. Comparant ces résultats, on constate que les deux extraits de propolis ont un effet supérieur ($p < 0,001$) à celui de la quercétine.

Tableau 16. Variation des taux des taux de GSH cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanologique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

	Témoin	Extrait éthanologique de la propolis (100mg/kg)	Aglycones flavoniques De la propolis (100mg/kg)	Quercétine (0.033mg/kg)
[GSH] mM/g de tissus	0.95 ± 0.22	1.75 ± 0.13 ***	2.05 ± 0.9 ***	1.43 ± 0.13 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

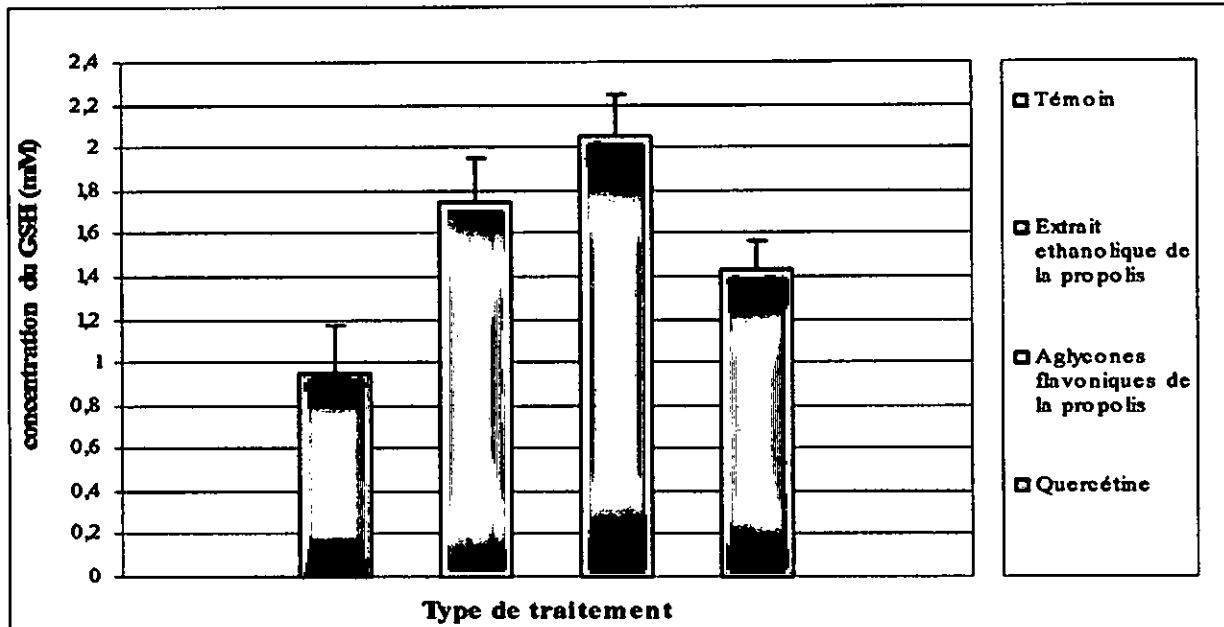


Figure 35. Variation des taux des taux de GSH cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanologique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

III.2.5. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

III.2.5.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale

La figure 36 représente les valeurs de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique ou Cu/Zn-SOD, après 2 mois de traitement par les flavonoïdes et par les aglycones flavoniques de la propolis.

Le traitement par l'extrait éthanologique et par les aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg /j pendant 2 mois conduit à une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique, atteint $3840,56 \pm 1121,12$ et $4537,57 \pm 1119$ UI/g de protéines respectivement, contre $3102 \pm 920,01$ UI/g de protéines chez le témoin et $3808,16 \pm 1120$ UI/g de protéines avec la quercétine. Ainsi, cette activité enzymatique est de l'ordre de 124,26 %, 146,27 % et 122,76 % avec l'extrait éthanologique, les aglycones flavoniques et la quercétine respectivement. L'activité enzymatique maximale est enregistrée avec les aglycones flavoniques qui présentent un effet supérieur ($p < 0,01$) à celui de la quercétine.

Les résultats concernant l'effet des deux extraits de la propolis sur l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale sont illustrés dans la figure 37.

Une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale est obtenue après 2 mois de traitement par les extraits de propolis (100 mg/kg/j). Elle atteint 3057.4 ± 1021.16 et 3186.75 ± 1193.2 UI/g de protéines, avec l'extrait éthanologique et les aglycones flavoniques respectivement. Cette activité de la SOD qui atteint 175,29 % avec

l'extrait éthanolique de la propolis est comparable ($p > 0,05$) à celle obtenue avec la quercétine. Alors que les aglycones flavoniques donnent une activité enzymatique de l'ordre de 182,71 %, supérieur ($p < 0,01$) à celle obtenue avec le flavonoïde de référence.

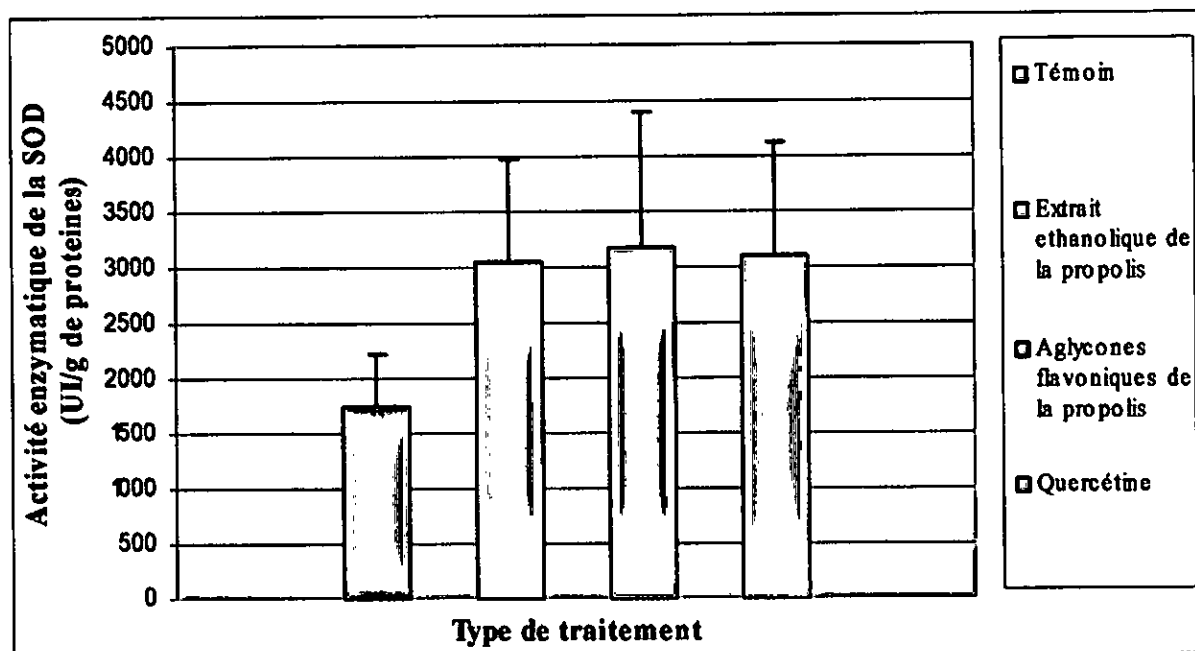


Figure 36. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale hépatique Mn-SOD après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

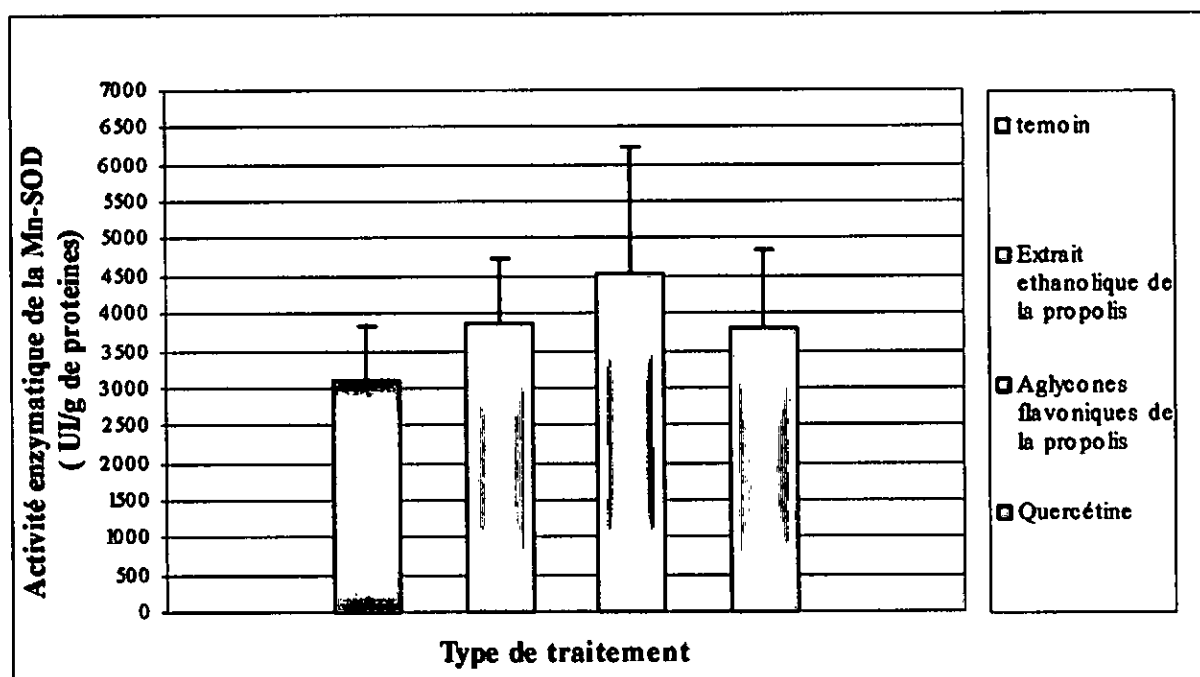


Figure 37. Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique Cu/Zn-SOD après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

Le tableau 17 regroupe les résultats de l'effet à long terme des deux extraits de la propolis sur l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique.

Tableau 17. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial et cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

	Témoin	Extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg)	Aglycones flavoniques de la propolis (100mg/kg)	Quercetine (0.033mg/kg)
SOD cytosolique (UI/g de protéines)	3102 ± 920.01	3854.56 ± 1121.2 ***	4537.57 ± 1119 ***	3808.16 ± 1120 ***
SOD mitochondriale (UI/g de protéines)	1744.11 ± 920.23	3057.4 ± 1021.16 ***	3186.75 ± 1193.2 ***	3103.57 ± 1803.2 ***

Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe.

III.2.5.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique:

Les variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatiques après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois sont illustrés dans les figures 38 et 39 respectivement.

Après 2 mois de traitement par l'extrait éthanolique et par les aglycones flavoniques à (100mg/kg/j) par voie orale, l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale augmente de façon hautement significative ($p < 0,001$) avec les deux extraits, atteint 3466.40 ± 903.21 et 2740.68 ± 970.312 UI/g de protéines respectivement. En effet cette activité est de l'ordre de 134,17 % et 106,50 % avec l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques successivement et de 106,08 % avec la quercetine. On constate que l'extrait éthanolique de la propolis a un effet supérieur ($p < 0,01$) à celui de la quercétine, alors que l'effet des aglycones flavoniques est comparable ($p > 0,05$) à celui de la quercétine.

Pour la catalase cytosolique, une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique a été enregistrée après le traitement à long terme par l'extrait éthanolique et par les aglycones flavoniques de la propolis (100mg/kg/j). Cette activité est de l'ordre de 115,2% et

113,25% successivement par rapport au témoin. Ces valeurs sont similaires ($p > 0,05$) à celles enregistrées avec la quercétine (111, 20 %).

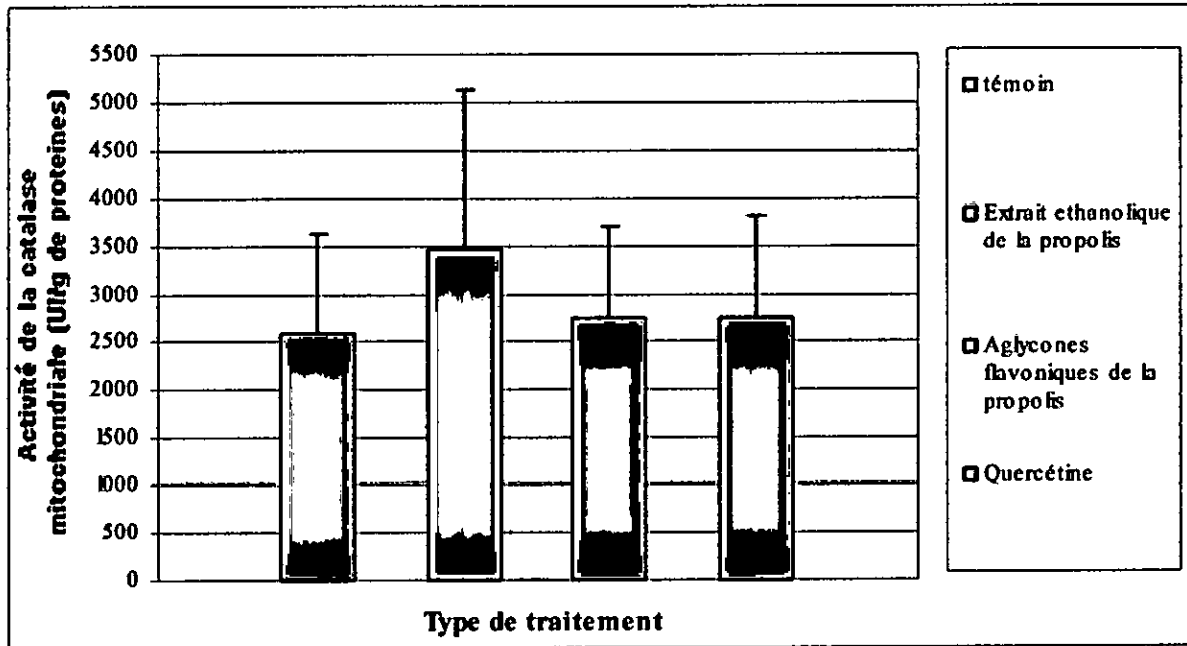


Figure 38. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanologique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

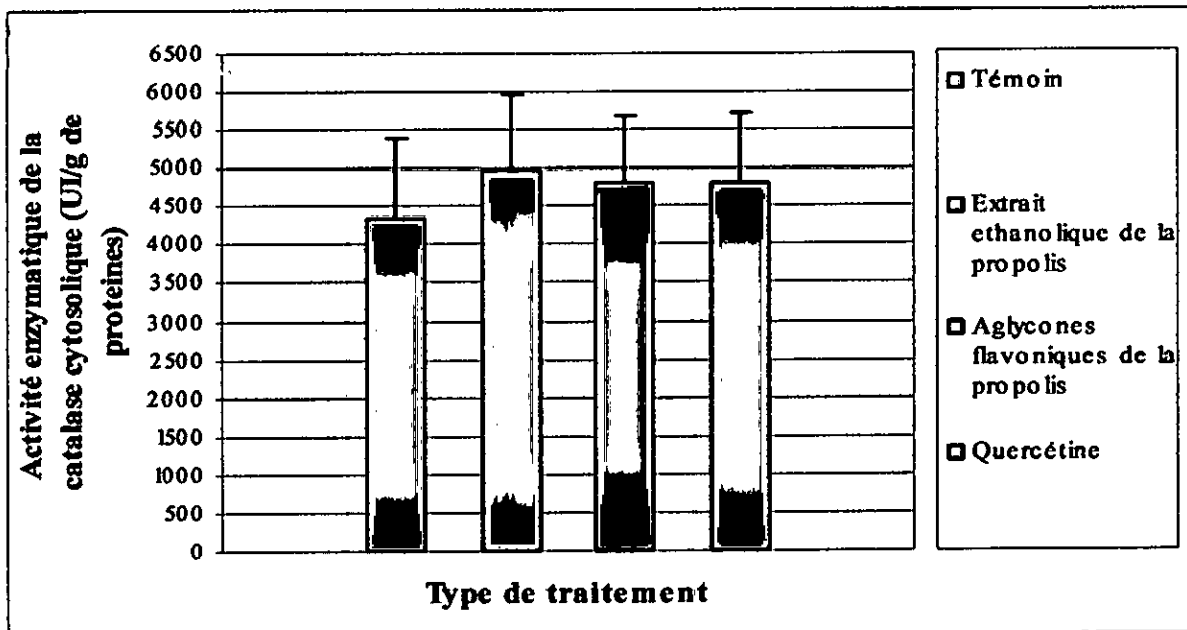


Figure 39. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanologique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

Le tableau 18 regroupe les résultats de l'effet à long terme des deux extraits de la propolis sur l'activité enzymatique de la CAT mitochondriale et cytosolique.

Tableau 18. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatique après administration prolongée par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques de la propolis à la dose de (100 mg/kg/j) et la quercétine à la dose de (0.033 mg/kg/j) par voie orale pendant deux mois.

	Témoin	Extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg)	Aglycones flavoniques de la propolis (100mg/kg)	Quercetine (0.033mg/kg)
catalase cytosolique (UI/g de protéines)	4319.13 ± 101.2	4989.89± 1103.3 **	4891.79 ± 2901.1 **	4803.19±1201 **
catalase mitochondriale (UI/g de protéines)	2583.5 ± 1030	3466.40 ± 903.21 ***	2740.68± 970.31 ***	2751.51±797.9 ***

Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe.

IV. Etude de l'effet préventif de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/kg contre le stress oxydant mitochondrial et cellulaire induit par la doxorubicine

IV.1. Evaluation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde :

Les variations de la production mitochondriale de l'anion superoxyde après administration de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis à la dose quotidienne de 100 mg/kg et la quercétine à 0.033 mg/kg par voie orale pendant un mois suivie de la doxorubicine à 10 mg/kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours sont représentés dans le tableau 19 et la figure 40.

On constate que le doxorubicine administrée à 10 mg/kg par voie intraveineuse augmente la production mitochondriale de l'anion superoxyde, cette production atteint 127 % par rapport au témoin. Le prétraitement par l'extrait éthanolique et par les aglycones flavoniques de la propolis a diminué de façon hautement significative ($p < 0,001$) cette production, qui est de l'ordre de 18,2 % et 21,11 % respectivement contre 36,22 % avec la quercétine. En effet, le pourcentage de production obtenu avec les extraits de propolis est significativement inférieur à celui obtenu

avec la quercétine. Le pourcentage de réduction de la production est de 81,8% pour l'extrait éthanolique, 78,89% avec les aglycones flavoniques et de 63,78% seulement avec la quercétine.

Tableau 19. Variation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde après administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à la dose quotidienne de 100 mg/kg et la quercétine à 0.033 mg/kg par voie orale pendant un mois suivie de la doxorubicine à 10 mg/kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours.

	Témoin	Doxorubicine (10mg/kg)	Extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)	Aglycones flavoniques (100mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)	Quercetine (0.033mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)
DO (Chaque minute /4mn)	0.110 ± 0.01	0.110 ± 0.018	0.056 ± 0.001	0.048 ± 0.005	0.094 ± 0.011
	0.190 ± 0.03	0.260 ± 0.020	0.061 ± 0.006	0.078 ± 0.053	0.131 ± 0.029
	0.250 ± 0.05	0.383 ± 0.009	0.069 ± 0.001	0.071 ± 0.022	0.149 ± 0.032
	0.360 ± 0.07	0.440 ± 0.045	0.077 ± 0.017	0.083 ± 0.002	0.159 ± 0.036
	0.450 ± 0.06	0.570 ± 0.070	0.082 ± 0.008	0.095 ± 0.059	0.163 ± 0.04
% de production de l'O ₂ ^{-o}	100 %	127 % *	18.2 % ***	21.11 % ***	36.22 % ***

Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif (p > 0.05), (*) désigne un effet significatif (p < 0.05), (**) désigne un effet très significatif (p < 0.01), (***) désigne un effet hautement significatif (p < 0.001). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe.

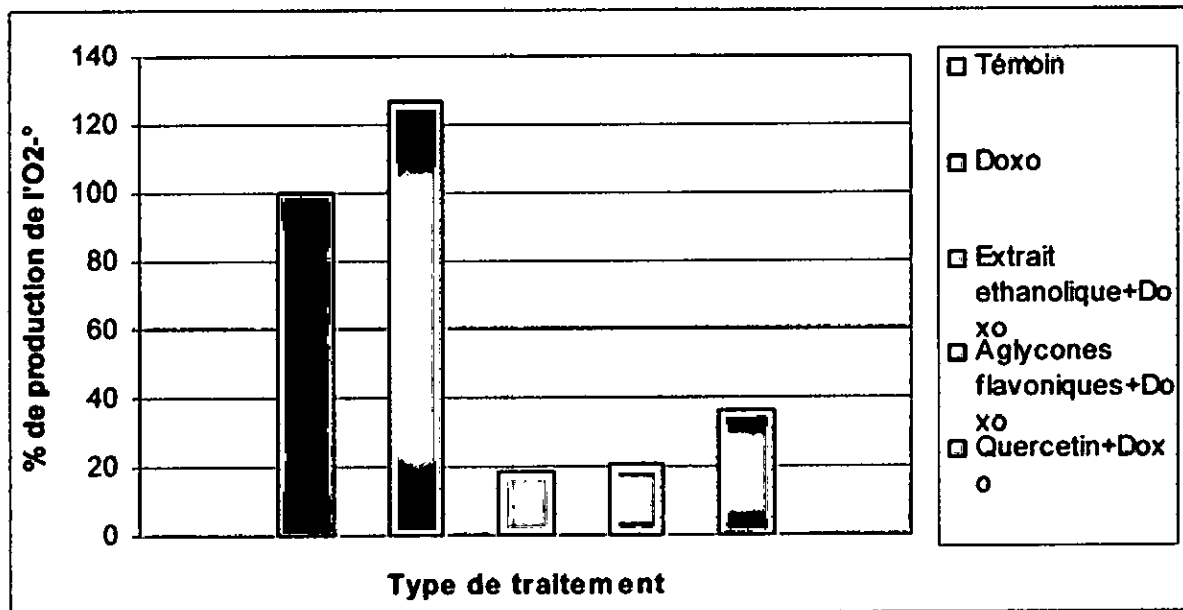


Figure 40. Variation du pourcentage de la production mitochondriale de l'anion superoxyde après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

IV.2. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale et cytosolique.

Les concentrations en MDA ont été déterminées aussi bien sur un homogénat de foie que sur les mitochondries du même organe.

Les figures 41 et 42 représentent les résultats du traitement par la doxorubicine seule (10mg / kg) ou en association avec l'extrait éthanolique ou avec les aglycones flavoniques de la propolis, sur la concentration du MDA mitochondrial et cytosolique respectivement.

Chez les rats recevant la doxorubicine seul, le taux du MDA aussi bien mitochondrial que cytosolique, augmente de façon hautement significative ($p < 0,001$). Cette concentration atteint 124,56% et 137,44% respectivement par rapport au témoin.

Le prétraitement par l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis à (100 mg /kg) pendant un mois entraîne une diminution hautement significative ($p < 0,001$) des taux du MDA cytosolique qui atteint $18,26 \pm 2,7$ et $14,67 \pm 2,17$ n moles / g de foie respectivement contre $46,73 \pm 8,42$ n moles / g de foie chez les traités par le médicaments seule. La réduction des taux du MDA est de l'ordre de 46,3 % et 56,8% avec l'extrait éthanolique et les aglycones successivement. Cette réduction est maximale avec les aglycones flavoniques qui donne un effet mieux ($p < 0,01$) que celui de la quercétine; l'aglycone flavoniques de référence. Les mêmes effets sont obtenus avec le MDA mitochondrial ou' le prétraitement par l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques prévient l'augmentation des taux de MDA par un pourcentage de 55,76% et 76% respectivement. De même l'effet préventif maximal est obtenu avec les aglycones flavoniques qui donnent un effet comparable ($p > 0,05$) à celui de l'aglycone de référence. Ainsi le tau du MDA est de $11,06 \pm 4,34$ nmole / mg de protéine avec les aglycones flavoniques contre $10,05 \pm 3,33$ n moles/mg de protéines avec la quercétine.

Le tableau 20 regroupe les résultats du traitement par la doxorubicine seule (10 mg /kg) ou associée aux extraits de propolis sur le taux du MDA mitochondrial et cytosolique.

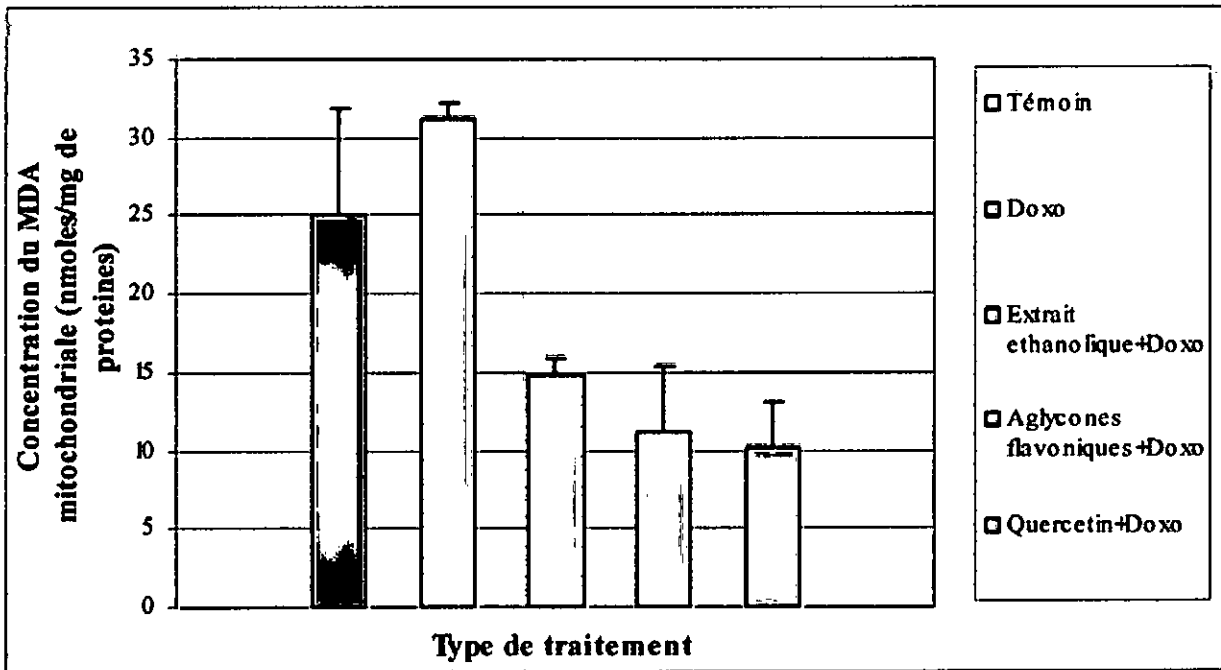


Figure 41. Variation des taux de MDA mitochondrial après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanologique de la propolis, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercetine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

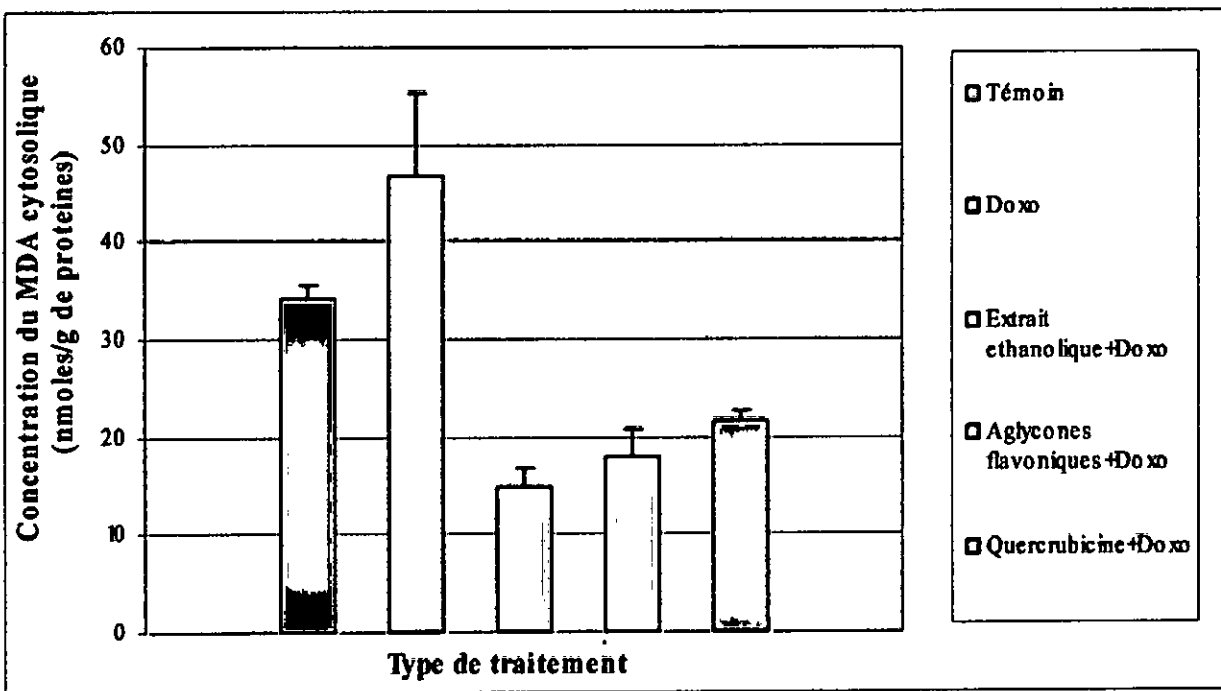


Figure 42. Variation des taux de MDA cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanologique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercetine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

Tableau 20. Variation des taux du MDA cytosolique et mitochondrial après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercetine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine (10mg/kg)	Extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)	Aglycones flavoniques (100mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)	Quercetine (0.033mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)
Concentration du MDA cytosolique (nmoles/g de foie)	34 ± 1.4	46.73 ± 8.42 ***	18.26 ± 2.7 ***	14.67 ± 2.17 ***	21.7 ± 1.09 ***
Concentration du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines)	25 ± 6.8	31.14 ± 1.1 ***	14.72 ± 1.17 ***	11.06 ± 4.34 ***	10.05 ± 3.33 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif (p > 0.05), (*) désigne un effet significatif (p < 0.05), (**) désigne un effet très significatif (p < 0.01), (***) désigne un effet hautement significatif (p < 0.001).

IV.3. Evaluation des taux du GSH cytosolique hépatique:

Les résultats du traitement par la doxorubicine (10 mg/kg) seul ou en association avec l'extrait éthanolique ou les aglycones flavoniques de la propolis, sur la concentration du GSH hépatique, sont représentés dans le tableau 21 et la figure 43.

Les rats recevant le médicament seul présentent une diminution hautement significative (p < 0,001) de la concentration hépatique du glutathion, atteint 0,73 ± 0,09 mmole/g de foie contre 0,95 ± 0,22 mmole/g de foie chez le témoin.

Par contre chez les rats prétraités par l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis, on constate une augmentation hautement significative (p < 0,001) de taux du GSH hépatique par rapport à ceux recevant le médicament seul, atteint 1,19 ± 0,07mM et 1,54 ± 0,05 mmoles/g de foie respectivement.

On constate également que le taux de GSH obtenue chez les rats prétraités par l'extrait éthanolique et ceux traités par les aglycones flavoniques dépasse celui des rats témoins. En effet, l'augmentation maximale est obtenue avec les aglycones flavoniques (62,1%) qui donne un effet supérieur (p < 0,01) à celui de que la quercetine. Ceci nous laisse pensé à un recouvrement des capacités de synthèse du GSH par les hépatocytes après élimination de la doxorubicine.

Tableau 21. Variation des taux de GSH cytosolique hépatique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine (10 mg/kg)	Extrait éthanolique de la propolis (100 mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)	Aglycones flavoniques de la propolis (100mg/kg) + Doxoubicine (10mg/kg)	Quercétine+ (0.033mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)
Taux de GSH (mmoles/g de foie)	0.95 ± 0.22	0.73 ± 0.09 ***	1.19 ± 0.07 ***	1.54 ± 0.05 ***	1.05 ± 0.03 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif (p > 0.05), (*) désigne un effet significatif (p < 0.05), (**) désigne un effet très significatif (p < 0.01), (***) désigne un effet hautement significatif (p < 0.001).

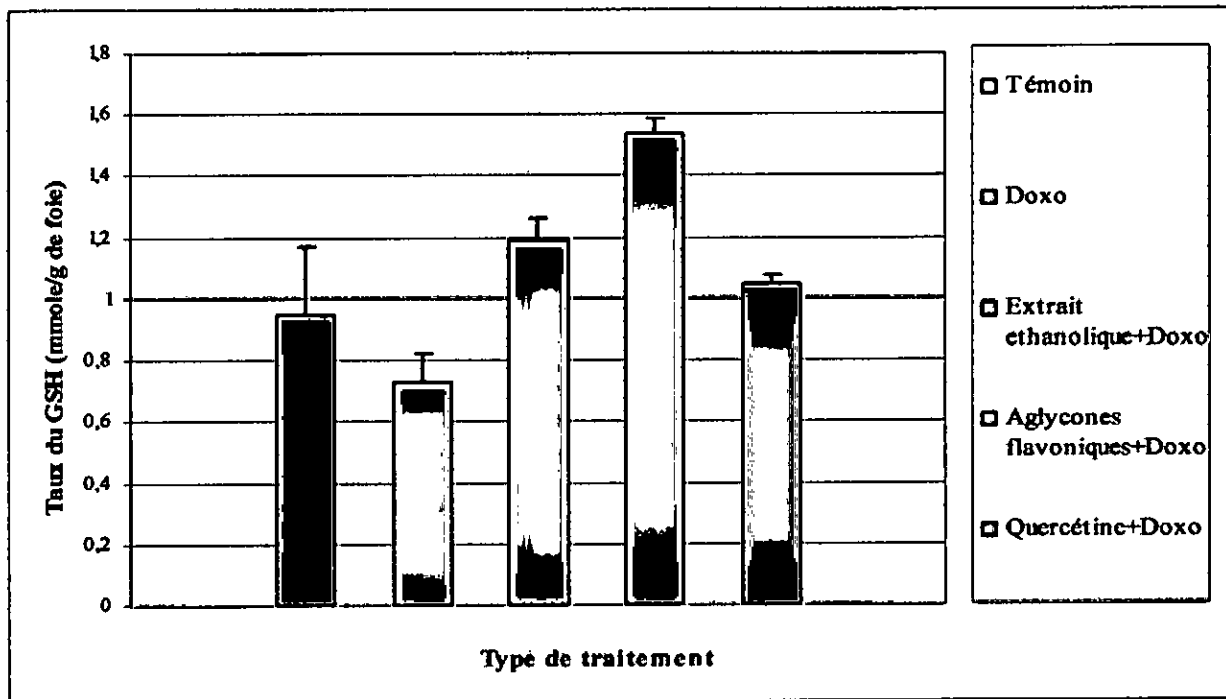


Figure 43. Variation des taux de GSH cytosolique hépatique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

IV.4. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes mitochondriales

Le rôle protecteur des extraits de propolis peut être confirmé par leur effet sur l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes à savoir la SOD et la CAT mitochondriales.

IV.4.1. La SOD mitochondriale

L'effet du traitement par la doxorubicine (10mg/kg) seule ou en association avec l'extrait éthanolique ou les aglycones flavoniques de la propolis sur l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale est représenté dans la figure 44.

Chez les rats traités par doxorubicine seule l'activité enzymatique est diminuée de façon hautement significative ($p < 0,001$) atteint $1257 \pm 1002,3$ UI /g de protéines contre $1544 \pm 31,2$ UI /g de protéines chez les rats non traités. Cette diminution est de l'ordre de 20%.

Lors du prétraitement par l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques et la quercétine, on constate une augmentation hautement significative de l'activité enzymatiques de la SOD mitochondriale atteint, $2122,54 \pm 880$, 2416 ± 793 et $2392,99 \pm 793,99$ UI / g de protéines respectivement. Cette augmentation est successivement de l'ordre de 137,47%, 156,51% et 154,98%. Comparant ces résultats, on constate que l'activité maximale est obtenue avec les aglycones flavoniques et est comparable ($p > 0,05$) à celle obtenue avec la quercétine.

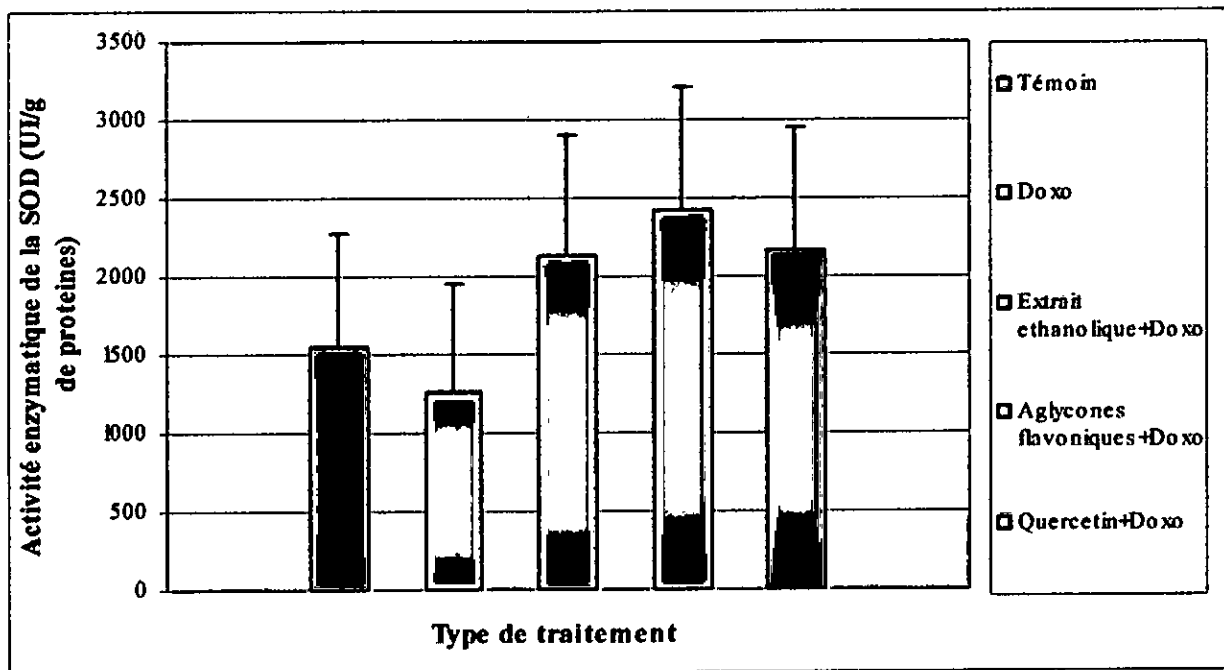


Figure 44. Variation des l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale hépatique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

IV.4.2. La catalase mitochondriale

La figure 45 représente l'effet du traitement par la doxorubicine (10mg /kg) seule ou associée à extrait éthanolique ou aux aglycones flavoniques de la propolis pendant un mois sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale.

L'activité enzymatique de la catalase mitochondriale trouve effondrer de façon hautement significative chez les animaux traités par le médicament seul atteint $1874,83 \pm 303$ UI / g de protéines contre $2583,51 \pm 870$ UI / g de protéines chez les animaux témoins, par contre, le prétraitement par l'extrait éthanolique de la propolis augmente l'activité enzymatique de façon très significative ($p < 0,01$), cette activité représente 111,6%. Avec les aglycones flavoniques, on constate une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique qui représente 127,73% alors que le prétraitement par la quercétine permet de maintenir cette activité enzymatique à des valeurs comparables ($p > 0,05$) à celles du témoin. De même, on constate que l'activité maximale est obtenue avec les aglycones flavoniques de la propolis et est supérieure à celle obtenue avec la quercétine.

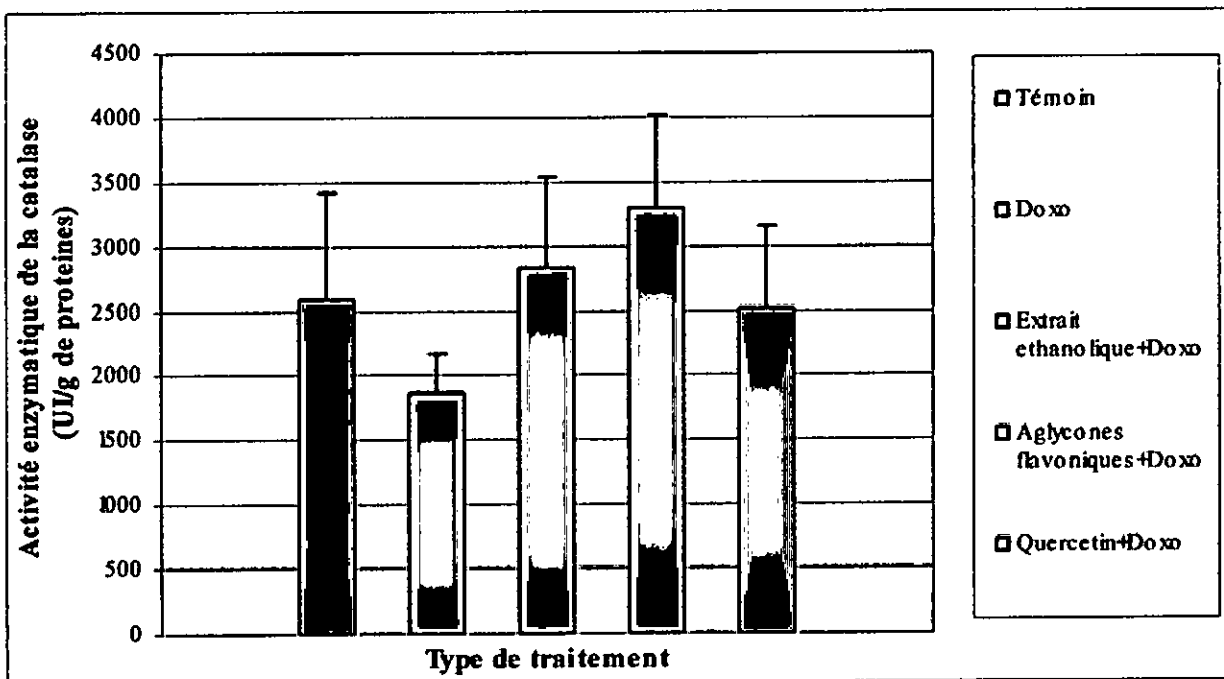


Figure 45. Variation des l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

Le tableau 22 représente les variations de l'activité enzymatique de la catalase et de la superoxyde dismutase mitochondriales après administration de la doxorubicine seule à

10 mg/kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

Tableau 22. Variation des l'activité enzymatique de la catalase et de la superoxyde dismutase mitochondriales après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie IV pendant trois jours ou précédée par administration de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j ou de la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine (10mg/kg)	Extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)	Aglycones flavoniques + Doxorubicine (100mg/kg)	Quercetine (0.033mg/kg) + Doxorubicine (10mg/kg)
SOD (UI/g de protéines)	1544± 931.2	1257± 72.3 ***	2122.54 ± 880.1 ***	2416.57± 793 ***	2392.99±793.99 ***
Catalase (UI/g de protéines)	2583.51± 870	1874.83±303 **	2883.71 ± 807 **	3299.94 ± 720 ***	2501.38± 650 **

Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM, $n = 10$ dans chaque groupe.

V. Etude de l'effet curatif de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis administrés à 100 mg/kg contre le stress oxydant mitochondrial et cellulaire induit par la doxorubicine

V.1. Evaluation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde

Les résultats de l'effet curatif de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis (100 mg / kg) sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde après un traitement par la doxorubicine à (10 mg / kg), sont représentés dans le tableau 23 et la figure 46.

Le traitement des animaux par la doxorubicine (10mg/kg /j) pendant 3 jours suivie d'un mois de traitement par l'extrait éthanolique par les aglycones flavoniques de la propolis à (100mg/kg /j) ou par la quercétine à (0,033 mg/kg/j), permet une diminution hautement significative de la production mitochondriale de l'anion superoxyde, le pourcentage de production est de 7,11%, 10,66% et 23,55% respectivement par rapport au témoin.

Par contre le traitement par le médicament seul, entraîne une augmentation hautement significative de la production mitochondriale de anion superoxyde estimé à 127% par rapport au témoin. Comparant ces résultats, on constate que la production observée avec la quercétine est 2

fois supérieure à celle obtenue avec l'extrait éthanolique et avec les aglycones flavoniques. Ceci confirme l'effet inhibiteur de ces deux extraits sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde.

Tableau 23. Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/kg/j pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait brut, des aglycones flavoniques de la propolis, à 100 mg/Kg/j ou la quercetine à 0.033 mg/Kg/j par voie orale pendant un mois sur la production de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat.

	Témoin	Doxorubicine (10 mg/kg)	Doxorubicine (10 mg/kg) + Extrait éthanolique de la propolis (100 mg/kg)	Doxorubicine (10 mg/kg) + Aglycones flavoniques (100 mg/kg)	Doxorubicine (10 mg/kg) + Quercetine (0.033 mg/kg)
DO	0.110 ± 0.01	0.110 ± 0.018	0.014 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0.066 ± 0.003
(Chaque minute /4mn)	0.190 ± 0.03	0.260 ± 0.020	0.019 ± 0.007	0.019 ± 0.006	0.075 ± 0.005
	0.250 ± 0.05	0.383 ± 0.009	0.024 ± 0.004	0.024 ± 0.019	0.086 ± 0.001
	0.360 ± 0.07	0.440 ± 0.045	0.031 ± 0.006	0.037 ± 0.012	0.098 ± 0.060
	0.450 ± 0.06	0.570 ± 0.070	0.032 ± 0.007	0.048 ± 0.008	0.106 ± 0.008
% de production	100%	127% ***	7.11 % ***	10.66% ***	23.55% ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif (p > 0.05), (*) désigne un effet significatif (p < 0.05), (**) désigne un effet très significatif (p < 0.01), (***) désigne un effet hautement significatif (p < 0.001).

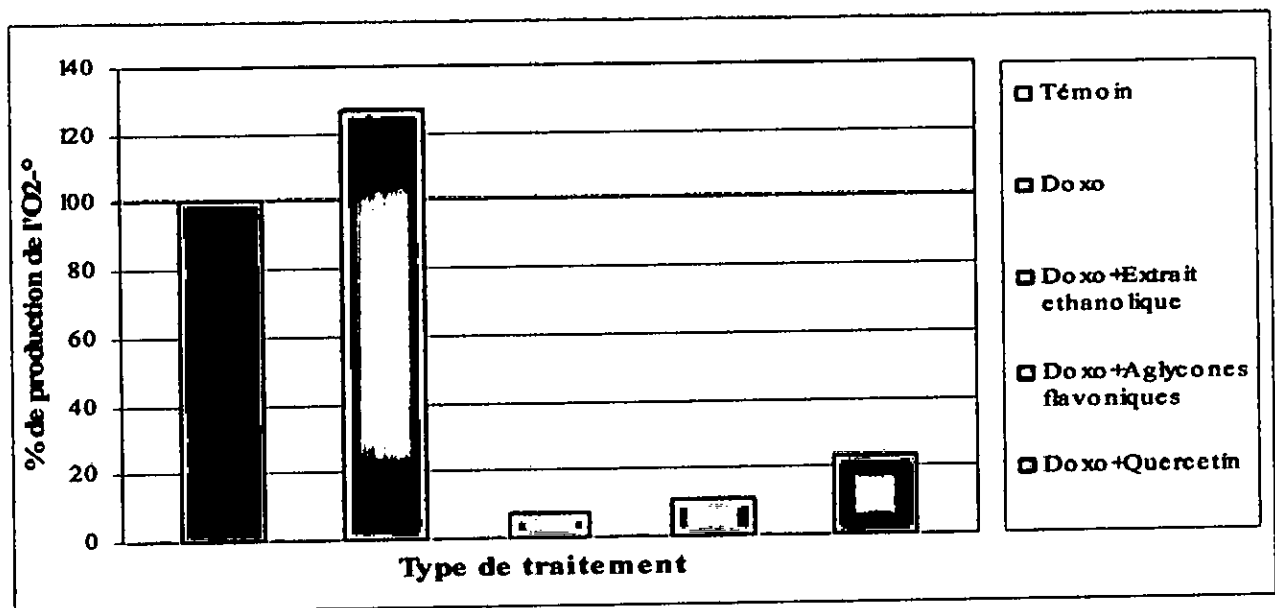


Figure 46. Effet de la doxorubicine administrée seule à 10 mg/Kg/j pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait brut, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg/j ou la quercetine à 0.033 mg/Kg/j par voie orale pendant un mois sur la production de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques de rat.

V.2. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale et cytosolique

Les résultats de l'effet curatif de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques à (100 mg /kg /j) pendant un mois, sur le taux du MDA mitochondrial et cytosolique après un traitement par la doxorubicine (10 mg/kg), sont représentés dans les figures 47 et 48 respectivement.

On constate que le traitement des animaux par la doxorubicine seule entraîne une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) des taux du MDA aussi bien mitochondrial que cytosolique. Cette augmentation est de l'ordre de 37,44% et 24,56% respectivement par rapport au témoin. Le traitement par la doxorubicine suivie de l'extrait éthanolique ou des aglycones flavoniques de la propolis entraîne une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration du MDA cytosolique atteint $20,1 \pm 5,4$ nmoles/g de foie et $15,92 \pm 2,7$ nmoles/g de foie respectivement contre $34 \pm 1,4$ nmoles/g de foie chez le témoin. En effet, cette réduction des taux du MDA est de l'ordre de 50,89% pour l'extrait éthanolique, de 53,18% pour les aglycones flavoniques et de 46% avec la quercétine. La réduction maximale est obtenue avec les aglycones flavoniques qui ont donné un effet supérieur à celui de la quercétine.

Les mêmes effets sont observés avec le MDA mitochondrial qui tend à diminuer de façon hautement significative lors du traitement par la doxorubicine (10 mg/kg) suivie du traitement par l'extrait éthanolique ou par les aglycones flavoniques atteint $10,43 \pm 0,54$ et $10,08 \pm 0,34$ nmoles /mg de protéines respectivement. Le pourcentage de réduction est de 58,28% avec l'extrait éthanolique, 59,68% avec les aglycones flavoniques et 40,4% seulement obtenue lors du traitement par la quercétine. Comparant ces résultats, on constate que les deux extraits de propolis ont un effet comparable ($p > 0,05$) sur la réduction des taux du MDA mitochondrial.

Dans le tableau 24, on a regroupé les résultats de l'effet curatif des flavonoïdes, des aglycones flavoniques et de la quercétine sur le taux du MDA mitochondrial et cytosolique après un traitement par la doxorubicine à (10 mg / kg).

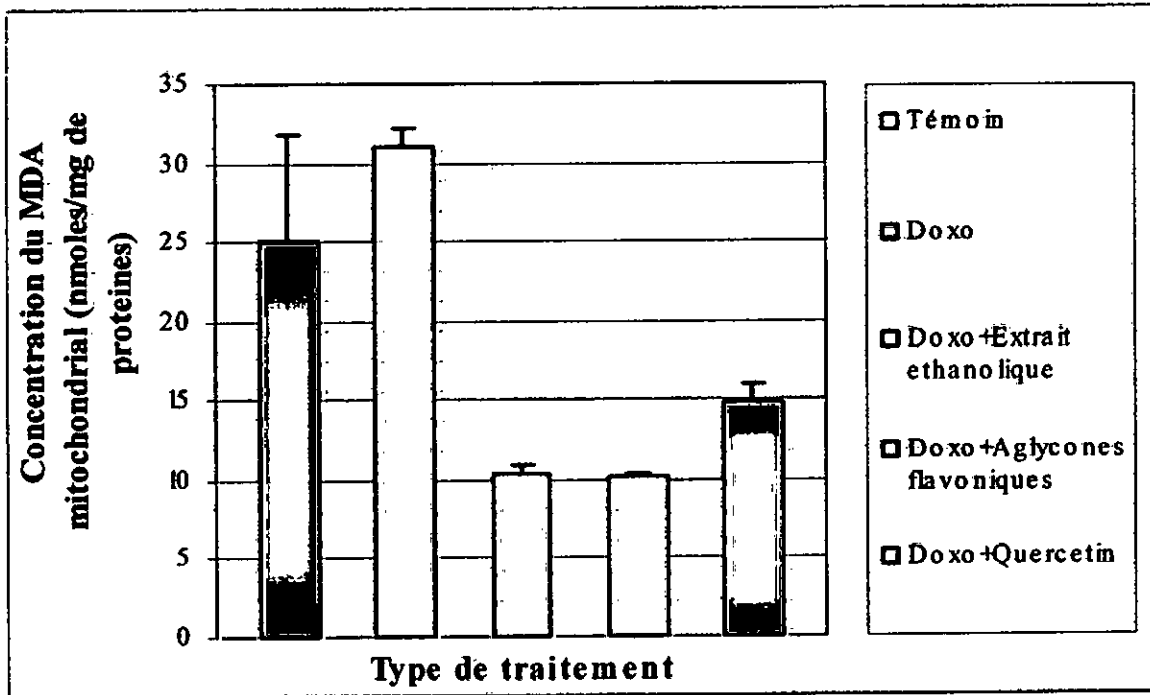


Figure 47. variation des concentration en MDA mitochondrial hépatique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait brut, des aglycones flavoniques de la propolis, à 100 mg/kg/ j ou la quercétine à 0. 033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

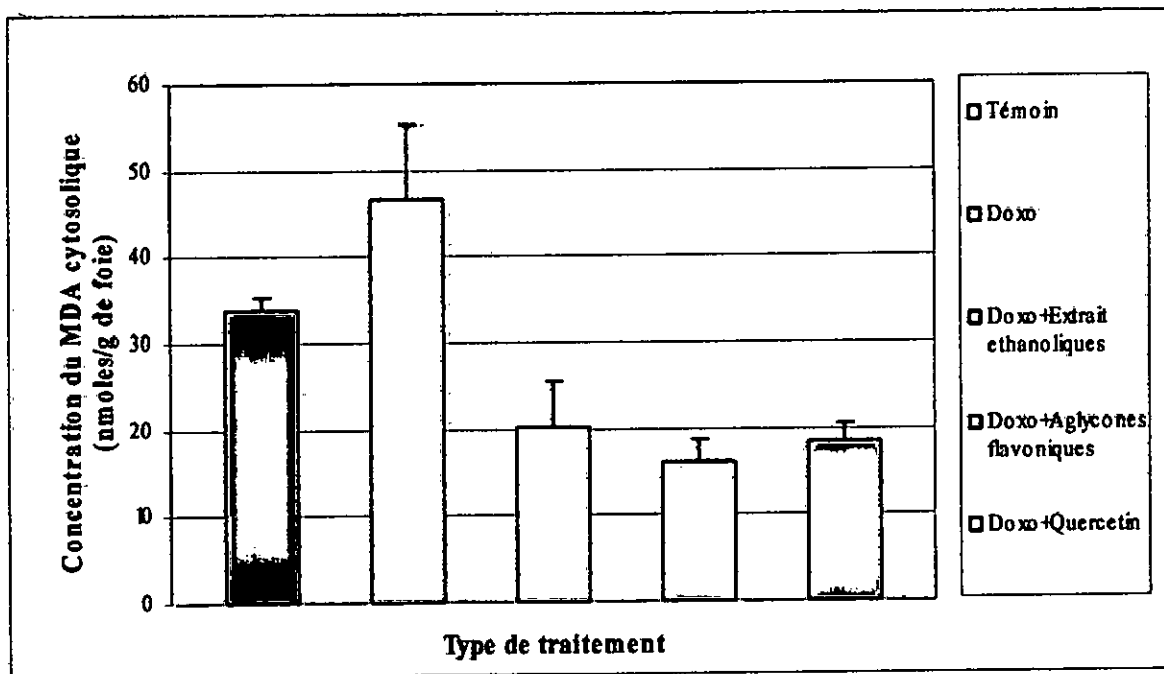


Figure 48. variation des concentration en MDA hépatique cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait brut, des aglycones flavoniques de la propolis, à 100 mg/kg/ j ou la quercétine à 0. 033 mg/Kg par voie orale pendant un mois.

Tableau 24. . variation des concentration en MDA hépatique mitochondrial et cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours ou suivie par administration de l'extrait brut, des aglycones flavoniques, de la propolis à 100 mg/kg/j ou la quercétine à 0.033 mg/kg/j par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine (10 mg/kg)	Extrait éthanolique De propolis (100 mg/kg) + Doxorubicine (10 mg/kg)	Aglycones flavoniques (100mg/kg) + Doxorubicine (10 mg/kg)	Quercétine (0.033mg/kg) + Doxorubicine (10 mg/kg)
Concentration du MDA cytosolique (nmoles/g de foie)	34 ±1.4	46.73±8.42 ***	20.1 ± 5.4 ***	15.92 ± 2.7 ***	18.36± 2.17 ***
Concentration du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines)	25 ± 6.8	31.14 ± 1.1 ***	10.43 ±0.54 ***	10.08 ± 0.34 ***	14.9 ± 1.08 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

V.3. Evaluation des taux de GSH cytosolique hépatique :

Les résultats de l'effet curatif de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur le taux du GSH cytosolique, après un traitement par la doxorubicine à (10 mg/kg) sont représentés dans le tableau 25 et la figure 49.

On constate que les rats recevant la doxorubicine seule présentent une diminution du taux de GSH atteint $0,73 \pm 0,09$ mmoles/g de foie contre $0,95 \pm 0,22$ mmoles/g de foie chez le témoin. L'administration de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques chez les rats préalablement traités par la doxorubicine empêche cette diminution, mais également, entraînent une augmentation des taux de GSH par rapport à ceux des animaux témoins non traités par la doxorubicine. Cette augmentation est de l'ordre de 17.89%, 29.47% et 10.52% observé avec l'extrait éthanolique, les aglycones flavoniques et la quercétine successivement. Comparant ces résultats, on trouve que l'augmentation maximale est obtenue avec les aglycones flavoniques et qui montre un effet supérieur ($p < 0,01$) à celui obtenu avec les animaux recevant la quercétine.

Tableau 25. variation des concentration en glutathion hépatique cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours ou suivie par administration des flavonoides, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg/j ou la quercetine à 0. 033 mg/Kg/j par voie orale pendant un mois.

	Témoin	Doxorubicine (10mg/kg)	Doxorubicine (10mg/kg) + Extrait brut de la propolis (100 mg/kg)	Doxorubicine (10mg/kg) + Aglycones flavoniques (100 mg/kg)	Doxorubicine (10mg/kg) + Quercetine (0.033mg/kg)
GSH (mmoles/g de foie)	0.95 ± 0.22	0.73 ± 0.09 ***	1.12 ± 0.05 ***	1.23 ± 0.04 ***	1.05 ± 0.03 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM, n = 10 dans chaque groupe. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif (p > 0.05), (*) désigne un effet significatif (p < 0.05), (**) désigne un effet très significatif (p < 0.01), (***) désigne un effet hautement significatif (p < 0.001).

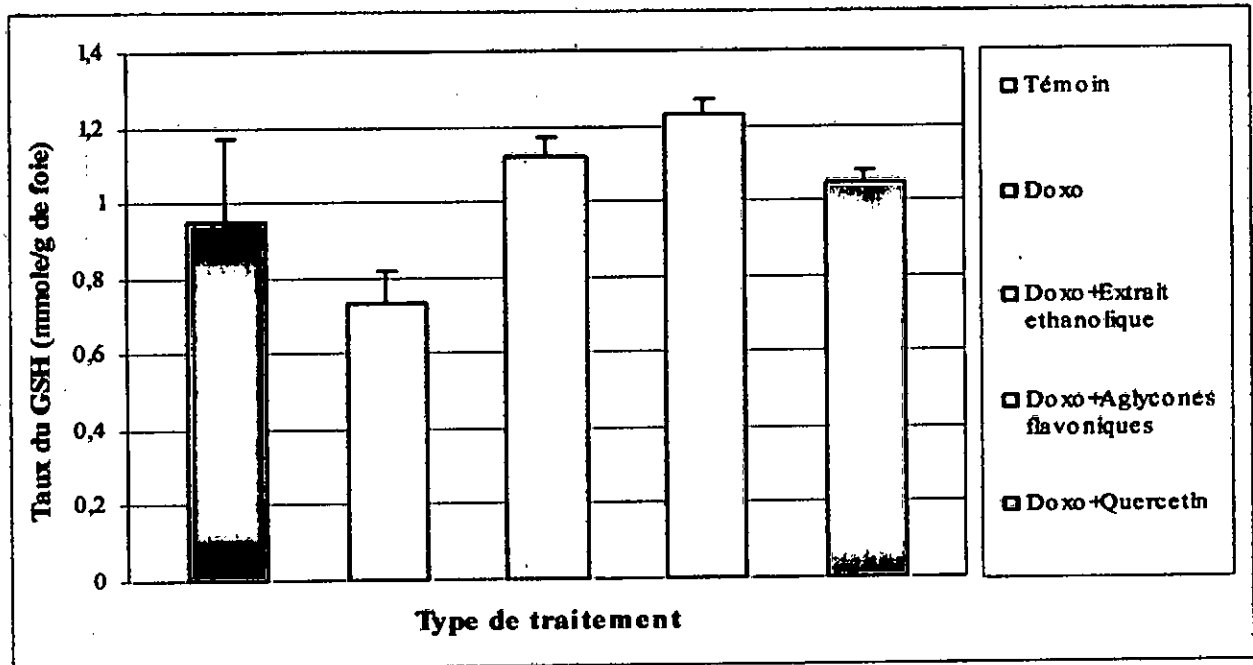


Figure 49. variation des concentration en glutathion hépatique cytosolique après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/Kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours ou suivie par administration des flavonoides, des aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/Kg/j ou la quercetine à 0. 033 mg/Kg/j par voie orale pendant un mois.

V.4. Evaluation de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes mitochondriales

Les variations de l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT mitochondriales hépatiques après administration de la doxorubicine seule à 10 mg/kg/j par voie intraveineuse pendant trois jours ou suivie de l'extrait brut de la propolis ou de ses aglycones flavoniques à la dose de 100 mg/kg/j ou la quercetine à 0. 033 mg/Kg/j par voie orale pendant un mois, sont représentées dans le tableau 26 ci-dessous.

DISCUSSION

DISCUSSION

Outre son rôle pivot dans la synthèse d'ATP, la mitochondrie est considérée comme la principale source des espèces réactives de l'oxygène. La chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence ces entités qui sont potentiellement toxiques pour l'organisme, car elles peuvent inactiver les protéines, induire des cassures au sein de l'ADN et initier les processus de la peroxydation lipidique (279). C'est pourquoi aujourd'hui, le stress oxydatif mitochondrial est de plus en plus impliqué pour expliquer les dégâts cellulaires observés dans les états inflammatoires, le vieillissement, le cancer, les troubles consécutifs à l'ischémie-réperfusion, le diabète ou les maladies neurodégénératives (280).

Plusieurs agents endogènes ou exogènes peuvent également provoquer ce déséquilibre de la balance antioxydant-prooxydant. Le métabolisme des médicaments anticancéreux constitue un facteur exogène type conduisant à ce déséquilibre au niveau hépatique (53). C'est pourquoi la protection des fonctions mitochondriales constitue le souci des recherches pharmacologiques actuelles, visant à protéger les tissus contre les dégâts oxydatifs.

Afin de prévenir ces maladies, de limiter les effets toxiques des radicaux libres et de protéger les fonctions mitochondriales, différentes substances antioxydantes sont actuellement utilisées, en particulier les flavonoïdes. L'étude des activités de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs, car elle est riche en propriétés thérapeutiques: Activité antibactérienne, antiinflammatoire, anticancerigène, hépatoprotectrice, antivirale, et antioxydante (174). Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a été faite sur l'effet d'un traitement prolongé par les flavonoïdes de la propolis sur la balance antioxydant-prooxydant, aucun mécanisme moléculaire n'a été proposé pour expliquer leurs effets antioxydants. Leurs interactions avec les fonctions mitochondriales en relation avec le stress oxydant, et avec le processus d'apoptose restent à déterminer également.

Les objectifs de notre travail réalisé sur un modèle de mitochondries et des cellules hépatiques, visent d'abord à évaluer l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis *in vitro* sur mitochondries isolées, de voir l'effet d'un traitement à long terme par ces principes actifs sur la balance antioxydant-prooxydant, en vue de la recherche d'une intolérance probable de l'organisme vis-à-vis de ces principes actifs. Notre étude vise également à comparer l'effet *in vitro* avec celui obtenu *in vivo* et l'effet de l'extrait brut avec celui

des aglycones flavoniques de la propolis et celui de la quercétine comme aglycone flavonique de référence. Dans cette perspective nous avons étudié également l'effet préventif et l'effet curatif de ces extraits de la propolis contre le stress induit par la doxorubicine.

Il est clairement admis aujourd'hui que lors d'un stress oxydant, la production mitochondriale du superoxyde augmente, comme dans le cas du stress induit lors d'un épisode d'ischémie-réperfusion. Cette production s'effectue principalement par les complexes I et III de la chaîne respiratoire à travers la formation des intermédiaires ubisemiquinones qui en réagissant avec l'oxygène donnent naissance à l'anion superoxyde. Ces deux complexes qui contiennent des quinones sont des sources potentielles de ROS (66.283). Certains flavonoïdes agissent par action sur la production des ROS (181). Il est clairement démontré aujourd'hui que certains de ces flavonoïdes possèdent des propriétés à fois antioxydantes⁰ et prooxydantes, selon la concentration, la source du radical libre mais aussi la structure de la molécule flavonique. A cet égard, l'activité antioxydante des flavonoïdes est utilisée pour la protection des cellules et des tissus des différents agents proapoptotiques, tandis que les concentrations prooxydantes peuvent servir en tant qu'inhibiteurs de la prolifération des cellules tumorales par leur capacité d'induire l'apoptose (283.284.285).

Dans notre étude réalisée *in vitro* sur un modèle de mitochondries hépatiques, nous avons trouvé que les extraits de propolis réduisent significativement la production de l'anion superoxyde par le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale et ce de façon concentration dépendante (de 10^{-8} M à 10^{-2} M) aussi bien avec l'extrait éthanolique qu'avec les aglycones flavoniques. L'effet de ces derniers était plus élevé que celui de l'extrait éthanolique. En effet, la réduction de la production du superoxyde à 10^{-2} M est de 55% et 70% avec l'extrait éthanolique et les aglycones respectivement.

Lors du stress induit par la doxorubicine, une augmentation de la production mitochondriale de l'anion superoxyde a été enregistrée chez les animaux traités par le médicament par rapport aux témoins non traités. Cette augmentation est un indicateur de la toxicité de la doxorubicine. En effet, la mitochondrie joue un rôle important dans la formation des radicaux oxygénés issus de l'action toxique des médicaments (164.285.286). Le métabolisme de la doxorubicine est catalysé par plusieurs enzymes y compris la cytochrome P450 réductase, NADH dehydrogenase associée au complexe I mitochondrial et la NO synthase (55.56). Cette augmentation des taux de superoxyde est liée également à la structure quinonique de ce médicament qui lui permet de se

comporter comme accepteur des électrons dont l'addition d'un électron libre transforme la quinone en radical libre semiquinonique avec libération des anions superoxydes qui auraient alors des effets délétères directes sur l'ADN et les macromolécules. En présence d'oxygène, ils se forment également des radicaux superoxydes, hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène qui seront également toxiques et conduisant à un état du stress oxydatif (57).

Ce résultat est en parfait accord avec ceux de Gervasi et al (1986). Ses travaux réalisés sur des préparations mitochondriales cardiaques montrent également que les dérivés de la doxorubicine augmentent la production du superoxyde par la NADH déhydrogenase mitochondriale (287). De même une étude réalisée par Chacon et al (1991) montre que le traitement par la doxorubicine induit un déséquilibre dans l'homéostasie du Ca^{++} mitochondrial conduisant à la production excessive des ROS. Les dérivés de la doxorubicine, selon une étude récente réalisée par Clementi et ses collaborateurs, entraînent l'inhibition de la chaîne respiratoire au niveau du complexe I (288).

Le traitement par l'extrait éthanolique ou les aglycones flavoniques de la propolis à 100 mg/kg/j pendant un mois avant ou après le traitement par la doxorubicine réduit de façon hautement significative la production mitochondriale du superoxyde. Le même résultat est enregistré avec la quercétine, aglycone flavonique de référence. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lahouel réalisés avec l'extrait éthanolique de la propolis (268) et renforcent ceux de Huk et ses collaborateurs montrant qu'en présence de la quercétine, le taux de l'anion superoxyde formé par la chaîne respiratoire mitochondriale diminue de façon significative dans un modèle animal ischémique (289).

Cette réduction de la production mitochondriale de l'anion superoxyde est due, probablement, à la contribution de deux phénomènes ou mécanismes. Le premier, consiste à l'inhibition partielle des complexes I et/ou III de la chaîne respiratoire, par l'extrait éthanolique et par les aglycones flavoniques de la propolis. Le mécanisme d'inhibition du complexe III peut impliquer une compétition entre les flavonoïdes de l'extrait brut ou les aglycones flavoniques et le decylubiquinone au niveau du cycle Q, en captant les électrons cédés du cytochrome b_{562} inhibant ainsi la formation de la forme radicalaire semiubiquinone, ce qui prévient ou diminue la production de l'anion superoxyde (290). En effet, une étude récente réalisée *in vitro* (66), montre que le trans-resvératrol, un polyphénol qui développe plusieurs propriétés antioxydantes de capture et d'inactivation des ROS et qui semble être à l'origine de plusieurs effets pharmacologiques (3.291), empêche la production mitochondriale du superoxyde à travers

l'inhibition partielle (20%) de l'activité du complexe III et plus précisément à l'interaction avec le cycle Q. Cette étude montre également que l'inhibition totale de ce complexe par l'antimycine A stoppe totalement la consommation d'oxygène et amplifie la production du superoxyde (66.147.292). De la même manière, la nicotine protège les fonctions mitochondriales dans un model d'anoxie-réoxygénation en inhibant partiellement le complexe I, et par conséquent réduire la production de l' $O_2^{\cdot-}$ (66.293.294).

Le deuxième mécanisme expliquant la réduction des taux de l' $O_2^{\cdot-}$ serait l'effet piègeur du superoxyde produit par la chaîne respiratoire ou la neutralisation de la forme radicalaire semiubiquinone résultante lors de la captation du decylubiquinone d'un électron du cytochrome b_{562} ou lors du départ d'un électron de l'ubiquinol vers le centre Fe-S, par les extraits de la propolis. Cette activité antiradicalaire est confirmée par notre étude in vitro avec les deux extraits de propolis qui présentent un effet scavenger mieux que celui obtenu avec la vitamine E.

Pour l'étude de cet effet scavenger nous avons utilisé une méthode basée sur la réduction du radical 1,1 diphényle 2- pycrylhydrazyl (DPPH°). Nos résultats révèlent que l'extrait brut et les aglycones flavoniques de la propolis montrent un effet piègeur très puissant contre ce radical libre. Les deux extraits sont très actifs à des concentrations allant jusqu'à 10^{-8} M et présentent un effet scavenger total du DPPH° à 10^{-2} M. Cet effet éboueur des radicaux libres observé avec les deux extraits de propolis était concentration dépendant. Les deux extraits sont également beaucoup plus efficaces que la vitamine E qui est connue comme le maître des antioxydants participant à la neutralisation des radicaux libres. A 10^{-2} M l'extrait éthanolique de la propolis montre un effet piègeur de 91.22 %, les aglycones flavoniques de la propolis de 90.33 % contre 43.44 % seulement avec la vitamine E.

Cette activité est probablement due à la diversité des constituants dans l'extrait éthanolique de la propolis. Ainsi, selon la littérature, l'étude chimique a identifié jusqu' à présent plus de 300 constituants dans différentes propolis entre autres : Les résines et les baumes, les huiles essentielles, les traces de minéraux, les traces de vitamines et les flavonoïdes (246.247.248). Mais les principaux constituants sont de la classe des flavonoïdes de type aglycones. Notre propolis contient 370 mg de flavonoïdes par gramme de propolis dont la plupart sont de type aglycones identifiés par le test de Shibata. La chromatographie monodimensionnelle sur couche mince a révélé sept types d'aglycones dans notre extrait. Cette richesse de la propolis en flavonoïdes aglycones explique également les résultats comparables obtenus avec l'extrait brut et les aglycones flavoniques de la propolis. En fait, les abeilles par leur enzymes salivaires, les B-

glucosidases, modifient la composition de la propolis en hydrolysant des composés phénoliques comme les flavonoïdes hétérosidiques lors de la collection de la propolis libérant ainsi les flavonoïdes aglycones afin d'améliorer et d'augmenter les actions pharmacologiques de leur propolis (233.234.239). Chimiquement les aglycones flavoniques de la propolis sont les flavones, les flavonoles, les flavonones, dihydroflavonols et chalcones (242.250).

Nos résultats confirment le rôle antiradicalaire de la propolis cité par plusieurs auteurs (256.257.258). Ils sont également en accord avec ceux de la littérature montrant que les flavonoïdes ont la capacité de capter et de désactiver les radicaux libres (210.211.212.213.214.293). En effet, la quercétine et l'artépine C, composés essentiels de la propolis Brésilienne, et les catéchines protègent les tissus des effets nocifs des ROS principalement par leur effet scavenger ou éboueur des ROS (294). Le piégeage des dérivés de l'oxydation des protéines et des lipides a un grand intérêt (295.296).

En fait, cette activité antiradicalaire est due à la capacité des flavonoïdes à réduire les radicaux libres comme l'anion superoxyde, peroxyde et l'hydroxyle et ce par transfert d'hydrogène. De nombreuses études ont établies la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres. Cette activité antiradicalaire nécessite trois critères : La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons, la double liaison C2- C3 conjuguée avec la fonction 4-oxo et les hydroxyles en C3 (182.217). L'analyse chimique de la propolis de Kaous a révélé la présence des aglycones flavonoles, et qu'elle est composée essentiellement de diosmine et de quercétine. Notre étude chimique a révélé la présence des flavones et des flavonoles dans les deux extraits de propolis. Ces composés présentent les éléments de structure décrits ci-dessus et sont de ce fait des piégeurs efficaces de ROS (297).

Si la mitochondrie est considérée comme la principale source de ROS, elle est surtout la principale cible. Les ROS peuvent avoir une réaction directe sur l'activité mitochondriale. Ainsi, l' O_2^{\bullet} peut réagir avec le NO et produire le peroxyde d'azote ($ONOO^{\bullet}$) qui peut inhiber la chaîne respiratoire et endommager les différents composants de la mitochondrie (complexes de la chaîne respiratoire, membrane, ADN,...). Une altération de l'ADN mit ainsi qu'une oxydation accrue des phospholipides membranaires mitochondriaux pourrait donc altérer le fonctionnement mitochondrial de la chaîne respiratoire et déclencher un cercle vicieux augmentant la production de ROS et les dégâts oxydatifs mitochondriaux impliqués dans les phénomènes de mort

cellulaire par apoptose et dans la plupart des maladies (28). Les ROS peuvent donc potentiellement réagir avec chaque composé cellulaire et provoquent son oxydation. Cependant les cibles préférentielles des ROS sont les lipides suivit par les protéines et les bases constitutives du matériel génétique. (46.64).

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes induisant une altération irréversible du fonctionnement cellulaire, pouvant aller jusqu'à la lyse complète de la cellule. Les réactions en chaîne prolongent les effets intramembranaires des radicaux libres, même si l'agression radicalaire s'estompe. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques, le MDA (malondialdéhyde), marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène (298).

Les modèles de lipoperoxydation hépatique impliquant le fer sont de loin les plus utilisés et les mieux étudiés. Il existe une formidable quantité d'articles qui s'intéressent au pouvoir prooxydant du fer. Dans la plupart des modèles, on utilise la surcharge en fer pour créer un débalancement en faveur des prooxydants cellulaires et ainsi induire un stress oxydatif. Lorsque le fer est sous forme libre et catalytiquement accessible, il permet la réaction de Fenton (64). Notre étude montre que les deux extraits de propolis inhibent la peroxydation lipidique induite par le $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ in vitro, et par la doxorubicine in vivo. En effet, à 10^{-2}M les aglycones flavoniques et l'extrait éthanolique montrent une réduction de 88% et 80% respectivement.

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 perte de la fluidité membranaire, la destruction de la microarchitecture membranaire, la peroxydation lipidique et l'augmentation des niveaux de malondialdéhyde. De plus, ce médicament appartient à la famille des anthracyclines qui présentent une forte affinité pour les phospholipides chargés négativement (57). La réduction des taux du MDA observée dans les groupes d'animaux recevant l'extrait éthanolique ou les aglycones flavoniques de la propolis, avant ou après le traitement médicamenteux prouve l'effet préventif et curatif des flavonoïdes de la propolis contre le stress hépatique induit par la doxorubicine. Dans le même sens, une étude récente a été portée sur les tissus endommagés par l'ischémie-réperfusion chez des modèles animaux présentant des dommages rénales, montre que le prétraitement par 50 mg/kg de la

quercétine 60mn avant l'ischémie ou traitement après 30 mn d'ischémie avec la même dose, atténue de manière significative les marqueurs typiques des dommages ischémiques, entre autre le MDA (299.300). Cette capacité protectrice des membranes est bien établie et dépend essentiellement de la capacité de ces molécules à pénétrer dans la bicouche lipidique (301). Cette capacité est en relation directe avec les coefficients de répartition des flavonoïdes dans la phase lipidique (217.302). Ainsi, la quercétine avec un coefficient de répartition de 2.8 constitue un bloqueur des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (303).

Cet effet protecteur est peut être du à la captation des molécules du MDA par les principes actifs de la propolis ou bien à l'inhibition des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique au niveau mitochondrial et cytosolique. Les deux extraits de propolis donnent un effet comparable à celui de la quercétine. Ceci nous laisse penser que ces extraits ont le même mécanisme que celui de la quercétine. En effet, la quercétine présente une activité antilipopéroxydative par son effet piègeur vis à vis des radicaux peroxydes (304.305), par son pouvoir chélateur des ions (306) et sa capacité à réduire le Fe^{+2} inhibant ainsi la réaction de fenton et la peroxydation des acides gras polyinsaturés (307). Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont au nombre de trois, un noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3- hydroxyle et 4-oxo du cycle C et, les groupes 4- oxo et 5- hydroxyle entre les cycles A et C (182.193).

Des études récentes montrent également que la quercétine et la rutine comme composant de la propolis sont capables de stopper les réactions radicalaires par l'inhibition de la formation de l'anion superoxyde, du radical hydroxyle et des radicaux peroxyde lipidiques (181). De même, l'acide phenyl ester caféique (CAPE), composé actif de la propolis, présente un effet hépatoprotecteur puissant à travers la réduction de la lipopéroxydation, la réduction des taux de ROS et l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (306). Nos résultats sont similaires à ceux obtenues par plusieurs autres auteurs (285.309.310.311).

La production excessive de ROS peut avoir une action directe sur la mitochondrie conduisant au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale qui serait le point de départ du processus d'apoptose (147). En effet, la mitochondrie a un rôle central dans la transduction du message apoptotique : Dans la majorité des cas, elle constitue un passage obligé, mais parfois, seulement un lieu de potentialisation de l'apoptose. Au cours de ce type de mort cellulaire, on observe une perturbation dans la chaîne de transport d'électrons, dans la phosphorylation oxydative et aussi dans la production d'ATP. Ces perturbations mitochondriales favorisent la libération de facteurs proapoptotiques et des radicaux oxygénés responsables de la mort

cellulaire. Lors de l'apoptose, on remarque souvent un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale où serait impliqué le pore mitochondrial de transition de perméabilité (PTP) (7.8.120). Nous avons évalué l'effet des extraits de propolis dans la prévention de l'ouverture de ce pore qui constitue le point du non retour du processus apoptotique.

Plusieurs 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. Le stress oxydant stimule la libération du réticulum endoplasmique qui peut être pris par les mitochondries et provoque le MMPT (312.313).

Dans notre étude le Ca^{++} est utilisé comme inducteur de ce pore sous forme de CaCl_2 à 100 μM . Il est bien admis que le mécanisme d'ouverture du PTP consiste à l'oxydation des groupements thiol de l'adénine nucléotide translocase (ANT) en présence du Ca^{++} (314.315). En effet, l'augmentation des taux du Ca^{++} mitochondrial peut inhiber la chaîne de transport des électrons et la phosphorylation oxydative, mais aussi active les enzymes responsables de la production des ROS. Ces ROS comme le radicale hydroxyle vont oxyder les groupements thiols de l'ANT provoquant ainsi l'ouverture du PTP. L'entrée massive d'eau et des électrolytes conduit au gonflement mitochondrial, première étape déclenchante du processus apoptotique et qui a des conséquences dramatiques sur la cellule (312.316.317). Des études *in vitro* et *in vivo* ont prouvé que la doxorubicine stimule des perturbations dans l'homéostasie du Ca^{++} cellulaire et mitochondrial qui sont critique pour sa toxicité (58.318).

Plusieurs molécules proapoptotiques agissent par ce mécanisme, ainsi la curcumine et ses dérivés agissent par induction du PTP et du gonflement d'où son activité antiproliférative. En effet, la curcumine réduit les ions Fe^{+3} en Fe^{+2} qui réagissent alternativement avec le peroxyde d'hydrogène formant ainsi les radicaux hydroxyles qui participent à l'oxydation des groupements SH et l'ouverture du PTP (164). La figure 52 ci-dessous montre le mécanisme d'ouverture du PTP par les prooxydants en présence du calcium (exemple de la curcumine).

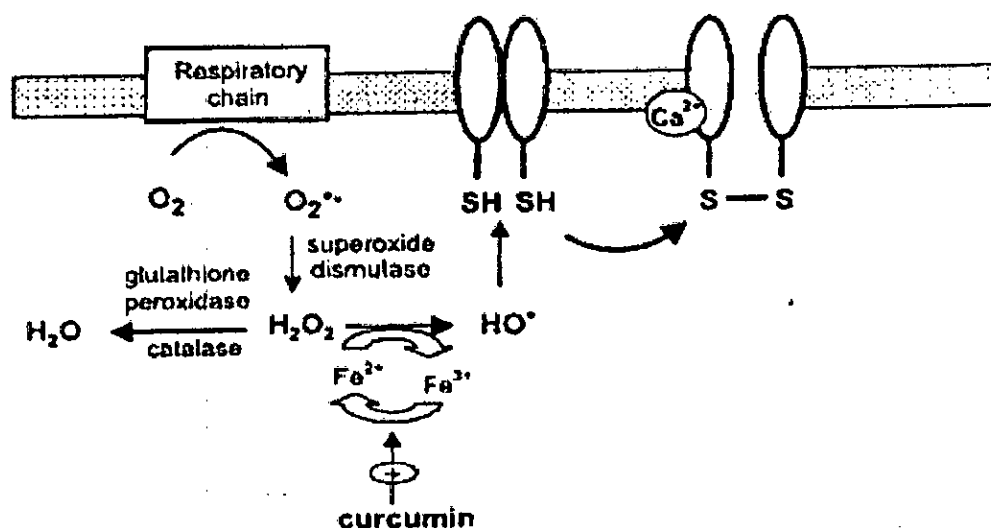


Figure 52. Mécanisme d'ouverture du pore géant par la curcumine (molécule prooxydante) (164).

Notre étude réalisée *in vitro* montre que l'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis entraînent une réduction hautement significative et de façon concentration dépendante du gonflement mitochondrial induit par le $CaCl_2$ à $100 \mu M$. En effet, à $10^{-2} M$, on enregistre une réduction de l'amplitude du gonflement par 75,48% et 68,03% respectivement. De même, l'étude réalisée *in vivo* montre que les deux extraits de la propolis inhibent l'effet du Ca^{++} sur le volume mitochondrial de façon hautement significative. Cette capacité des extraits de propolis à inhiber le gonflement mitochondrial aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* confirme l'effet antiapoptotique des flavonoïdes (181).

La réduction de l'amplitude du gonflement mitochondrial peut être expliquée par le fait que les principes actifs de la propolis entrent en compétition avec le site liant le Ca^{++} et par conséquent empêche l'ouverture du PTP (antagoniser la liaison du Ca^{++} intramitochondrial), comme c'est le cas de l'acide bongkrelique qui en se liant sur l'ANT inhibe le PTP et le gonflement mitochondrial (312), ou bien à la capacité de ces principes actifs à piéger les radicaux hydroxyyles responsable de l'oxydation des groupements thiol (SH) et l'ouverture du PTP. On peut proposer également que les flavonoïdes par son effet chélateur des ions Ca^{++} préviennent le gonflement mitochondrial, mais également en supprimant la réaction de Fenton, par la chélation des ions Fe^{+2} ou son oxydation en Fe^{+3} . Dans ce dernier cas les flavonoïdes de la propolis agissent par un mécanisme antiparallèle à celui de la curcumine (164).

L'activité antiapoptotique des extraits de propolis est partiellement responsable de leur fonction hépatoprotectrice obtenue *in vivo*. Une étude a été réalisée sur un modèle de mitochondries cérébrales montrant que la propolis administrée à 30 et 100 mg/kg inhibe le gonflement mitochondrial induit *in vitro*. Cette étude montre l'effet neuroprotecteur de la propolis contre les dommages de l'ischémie-réperfusion *in vivo* et l'apoptose induite *in vitro*, par son action antioxydante (inhibition de la peroxydation lipidique et de la formation des ROS) et antiapoptotique (inhibition du gonflement) (252).

La cellule dispose pour sa protection au glutathion, thiol intracellulaire vital qui constitue un acteur essentiel de la défense antioxydante cellulaire en se liant par son pôle SH aux métabolites toxiques. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes tel la Gpx (319.289). Outre l'importance du GSH total hépatique, un rôle vital est dévolu au GSH mitochondrial. Une déplétion du GSH mitochondrial déclenche une accumulation des radicaux libres, cette déplétion mitochondriale étant létale alors que celle du cytosol n'affecte pas la viabilité cellulaire. Cependant, les mitochondries n'ayant pas la capacité de synthétiser le GSH, elles l'importent du cytosol, d'où l'importance du GSH cytosolique (320).

Lors du traitement par la doxorubicine seule, les taux de GSH sont nettement diminués. Cette diminution est certainement due à l'effet toxique des métabolites réactifs instables du médicament qui sont fixés et neutralisés par le système de détoxification provoquant ainsi la baisse des concentrations de glutathion hépatique. Il est bien admis aujourd'hui que la formation des radicaux libres consomme du GSH quand elle est importante et que cela aboutit à une déplétion du GSH ce qui a pour principale conséquence, la peroxydation lipidique et l'oxydation des groupes thiols des protéines (147.286.309). Mais on peut éviter tous ces effets par l'apport de substances pouvant piéger les radicaux libres et / ou augmenter la synthèse de ce tripeptide "GSH". Le prétraitement par les extraits de propolis a empêché la diminution de GSH observée chez les animaux recevant le médicament seul, et donnent des taux de GSH supérieurs à ceux obtenus chez les témoins non traités. De même les animaux traités par la doxorubicine à 10 mg/kg suivie de la propolis ou de ses aglycones flavoniques à 100 mg/kg/j pendant un mois, présentent des taux de GSH supérieurs à ceux obtenus chez les animaux recevant le médicament seul. De plus, ces flavonoïdes de la propolis sont plus efficaces que la quercétine, flavonoïde aglycone pure. Ces résultats montrent l'effet préventif ainsi que curatif des flavonoïdes contre la déplétion du GSH induite par la doxorubicine. Cette augmentation des taux de GSH, est peut-être due à l'induction de sa synthèse, sa régénération ou aux deux effets.

Comme elle peut être due à l'effet scavenger des flavonoïdes c'est-à-dire au lieu que les métabolites réactifs toxiques du médicament se fixent sur le glutathion et le consomment, ils vont être captés par les flavonoïdes conservant de ce fait les taux de GSH.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs auteurs (321.322.323.324). En effet, une étude récente a montré que la propolis administrée à 50 et à 100 mg/kg prévient la cardiotoxicité induite par la doxorubicine (à 10 mg/kg) par l'amélioration des taux du GSH intracellulaire et sérique (325).

Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques cytosoliques et mitochondriaux figurent en première ligne la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT). Le radical superoxyde, première espèce toxique formé à partir de l'oxygène, est éliminé ou au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par la SOD qui catalyse sa disparition par dismutation. Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé est dismuté en oxygène et en eau par la catalase (67).

La réduction de l'activité de ces enzymes représente la cause de pas mal des désordres et de pathologies. En effet la diminution de l'activité de la SOD avec l'âge accélère le processus du vieillissement. Certains auteurs suggèrent même un rapport de cause entre l'activité des enzymes antioxydantes et la durée de vie des espèces animales. La forte relation existant entre de faibles niveaux de SOD et l'augmentation des symptômes d'asthme chez les patients suggère que la SOD pourrait être la première ligne de défense contre les crises d'asthme (326.327. 228).

Notre étude réalisée *in vitro*, montre que la propolis et ses aglycones flavoniques à 10^{-2} M et 10^{-4} M additionnés aux fractions mitochondriales, entraîne une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique des deux enzymes SOD et CAT mitochondriales et cytosoliques. L'explication probable de cet effet *in vitro* est l'activation de l'enzyme par les principes actifs de la propolis. Concernant l'effet préventif et curatif contre le stress induit par la doxorubicine, nous avons remarqué une réduction des activités enzymatiques chez les animaux traités par la doxorubicine seul. Cette réduction est peut être due à la destruction de ces enzymes suite au stress cellulaire induit par les métabolites toxiques du médicament ou encore suite à son oxydation par les ROS (229).

Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs études montrant la réduction de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes lors d'un stress (322.330). Des études ont observé que les niveaux de la SOD et d'autres antioxydants de l'organisme chutent brutalement immédiatement après le début d'une crise d'asthme. Cependant, Zwart et ses collaborateurs ont montré que lors d'un stress, aussi bien l'activité que l'expression des gènes codants pour ces

enzymes peuvent être augmenté (46). De plus, face aux stress oxydant la SOD se comportera de deux façons différentes. Dans un premiers temps, l'organisme réagira lors d'un stress modéré en surexprimant la SOD. Si le stress perdure et produit de façon massive les ROS toxiques, la SOD sera détruite et sa concentration chutera (331).

Dans les groupes d'animaux recevant l'extrait brut ou les aglycones flavoniques de la propolis avant ou après le traitement médicamenteux une nette augmentation de l'activité enzymatique de la catalase et de la superoxyde dismutase cytosoliques et mitochondriales a été observée. Ceci prouve l'effet préventif et curatif des flavonoïdes contre la toxicité de la doxorubicine. Cette amélioration de l'activité enzymatique est peut être due à l'induction de l'expression génétique ou à l'activation (stimulation) de ces enzymes. Les travaux de Paul Brookes et al (2002), montrent l'effet protecteur de la quercétine 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 (332).

Nos résultats sont en parfaite corrélation avec ceux obtenus par Alcalá et ses collaborateurs qui ont montré que la supplémentation avec 2% de la propolis améliore l'efficacité antioxydante chez les rats sénésant en augmentant l'activité enzymatique de la SOD, la CAT et la Gpx ainsi que les taux du GSH cérébral (327). Nos résultats confirment également ceux obtenus par plusieurs études montrant que les flavonoïdes améliorent l'activité des enzymes antioxydantes; l'augmentation de l'activité enzymatique de la Mn-SOD cérébrale des rats a été enregistrée après administration orale de la catéchine (333). La modulation de l'activité enzymatique de cette enzyme a été observée également avec la supplémentation par des polyphénols de thé. Néanmoins le mécanisme de cette modulation reste inconnu (334). L'héspéridine, un flavonoïde de citrus, améliore les taux de la SOD et de la CAT de façon significative (322). De même la vitamine E, A et C module le stress oxydatif cérébral à travers l'augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase qui sont diminués lors du stress (335).

Le traitement prolongé (2 mois) par la propolis ou par ses aglycones flavoniques à 100 mg/kg/j maintient et améliore l'équilibre de la balance antioxydant-prooxydant ce qui montre que la propolis est bien tolérée et dénuée de tout effet prooxydant à long terme.

Si on compare les résultats de l'étude *in vitro* et ceux de l'étude *in vivo* (à long terme, préventive ou curative), on constate que l'activité antioxydante obtenue par le contact direct des principes

actifs avec la mitochondrie (*in vitro*) est beaucoup moins importante à celle obtenue *in vivo*. Cela est expliqué en partie par le métabolisme splanchnique des flavonoïdes. Après leur administration par voie orale, les flavonoïdes peuvent donner des métabolites plus actifs que les principes actifs administrés. A titre d'exemple la quercétine et d'autres flavonoïdes subissent des conversions métaboliques pendant leur absorption dans les cellules intestinales avant d'atteindre le foie et la circulation sanguine (336, 337). Une étude réalisée par Chia-Nan et al (2004) a montré que l'administration de l'extrait éthanolique de la propolis d'Uruguay aux rats aboutit à l'identification, aussi bien dans le sang que dans les urines après analyse chromatographique, de sept types de flavonoïdes méthylés et /ou sulfatés. 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 (338).

Ces dernières années, plusieurs études ont montré le rôle de l'intestin grêle comme site essentiel de biotransformations des flavonoïdes. À l'intérieur de la cellule intestinale, les flavonoïdes sont transformés en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation,... (193.194.339). Ces molécules sont transformées également au niveau hépatique par des enzymes dites de conjugaison avant d'être distribuées vers les tissus pour avoir un effet biologique (197.198.240). De plus, les activités obtenues *in vivo* peuvent être dues à l'influence des flavonoïdes ou de leurs métabolites sur l'expression des gènes.

Mécanisme d'action proposé de l'effet prooxydant de la doxorubicine et l'effet antioxydant des flavonoïdes de la propolis

Certes, la toxicité de la doxorubicine a été étudiée par plusieurs auteurs (297). Néanmoins le mécanisme de cette toxicité surtout au niveau hépatique reste obscur. Les flavonoïdes de la propolis possèdent une activité antioxydante remarquable. D'après des études récentes, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre le piégeage direct des ROS, l'inhibition des enzymes responsables de la production des ROS et la protection des systèmes de défenses antioxydantes telle que l'augmentation des taux de glutathion (208.209).

Les résultats de notre étude confirment ces données et nous ont permis de proposer le mécanisme par lequel la doxorubicine intervient dans l'induction du stress hépatique d'une part, et d'autre part le mécanisme par lequel les principes actifs de la propolis interviennent dans la prévention et la correction du stress oxydant (figures 53 et 54).

La doxorubicine induit des dommages hépatiques sévères en interagissant avec les fonctions mitochondriales. administrée par voie intraveineuse à la dose de 10 mg/kg, les métabolites réactifs résultants du métabolisme de la doxorubicine essentiellement par le cytochrome P450

vont attaquer les membranes mitochondriales et cellulaires ce qui conduit à la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la libération massive du MDA. Ces métabolites vont altérer également la chaîne de transfert des électrons conduisant à la production massive des espèces réactives de l'oxygène. Ce qui mène à la consommation du GSH, à la destruction des enzymes antioxydantes à savoir la SOD et la CAT cytosoliques et mitochondriales, et à l'oxydation des groupements sulfidryles et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. La libération des facteurs proapoptotiques de l'espace intermembranaire ainsi résultante conduit au déséquilibre de la balance prooxydant-antioxydant et au déclenchement du processus apoptotique.

L'extrait éthanolique ou les aglycones flavoniques de la propolis ont montré une forte activité antioxydante aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ainsi qu'un effet préventif et curatif contre la toxicité de la doxorubicine. Ces activités sont dues à l'interaction de ces principes actifs avec les fonctions mitochondriales. D'une part, ils agissent directement sur les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale essentiellement le complexe III, réduisant de ce fait la fuite des électrons et la production de l'anion superoxyde. Ils atténuent ou inhibent l'ouverture du PTP et ainsi le gonflement mitochondrial à travers le piégeage et la neutralisation des radicaux libre et la captation des ions métalliques. D'autre part, Ces principes actifs protègent les membranes cellulaires et mitochondriales par atténuation ou inhibition de la peroxydation lipidique à travers le piégeage direct des métabolites et des espèces réactifs ou l'interruption des réactions en chaîne conduisant à la conservation des taux de GSH et des enzymes antioxydantes et ainsi le maintient de l'équilibre de la balance prooxydant-antioxydant. Ce qui conduit à la protection des fonctions mitochondriales et l'atténuation des processus apoptotiques.

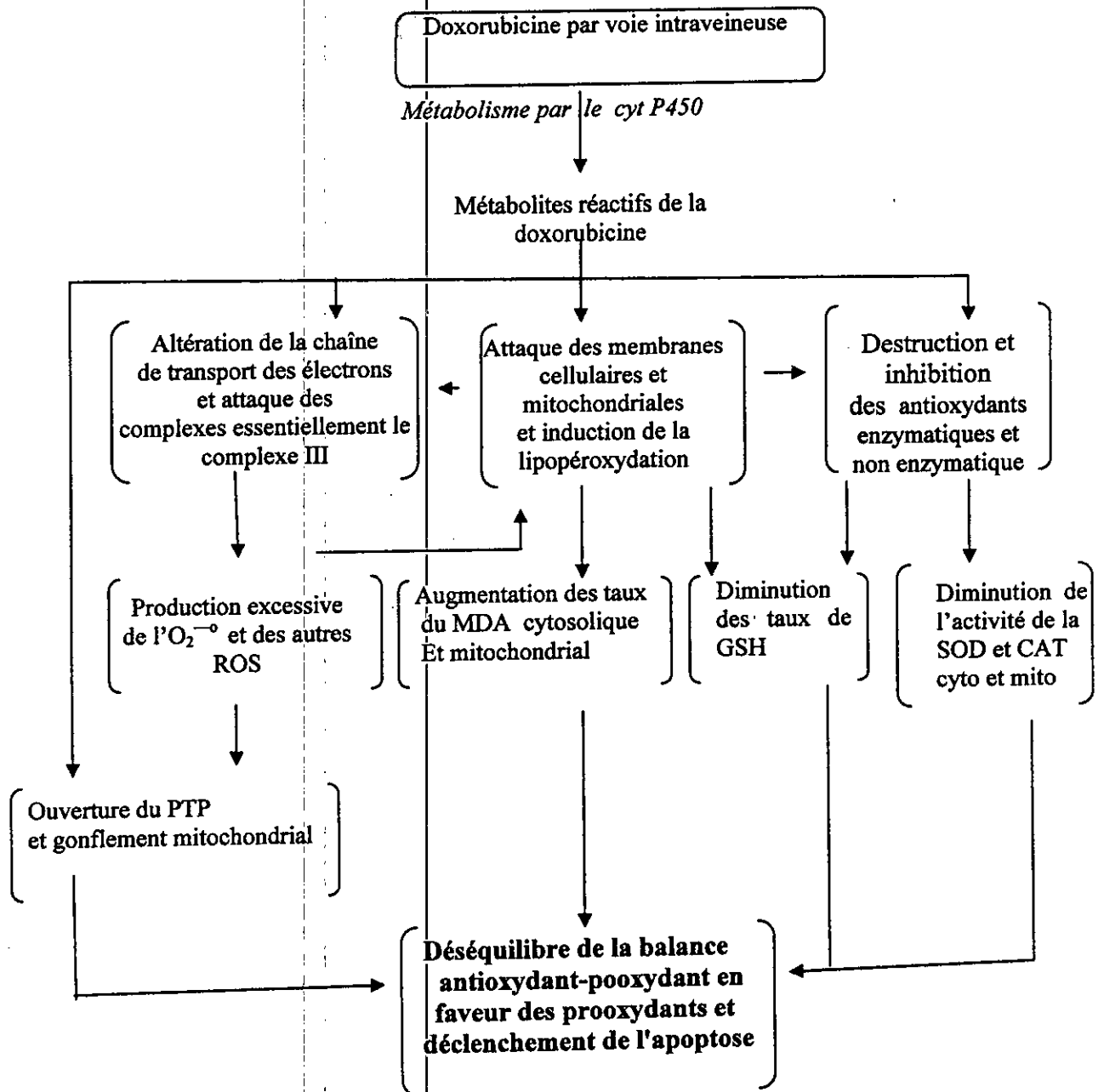


Figure 53. Mécanisme de l'effet prooxydant de la doxorubicine au niveau hépatique.

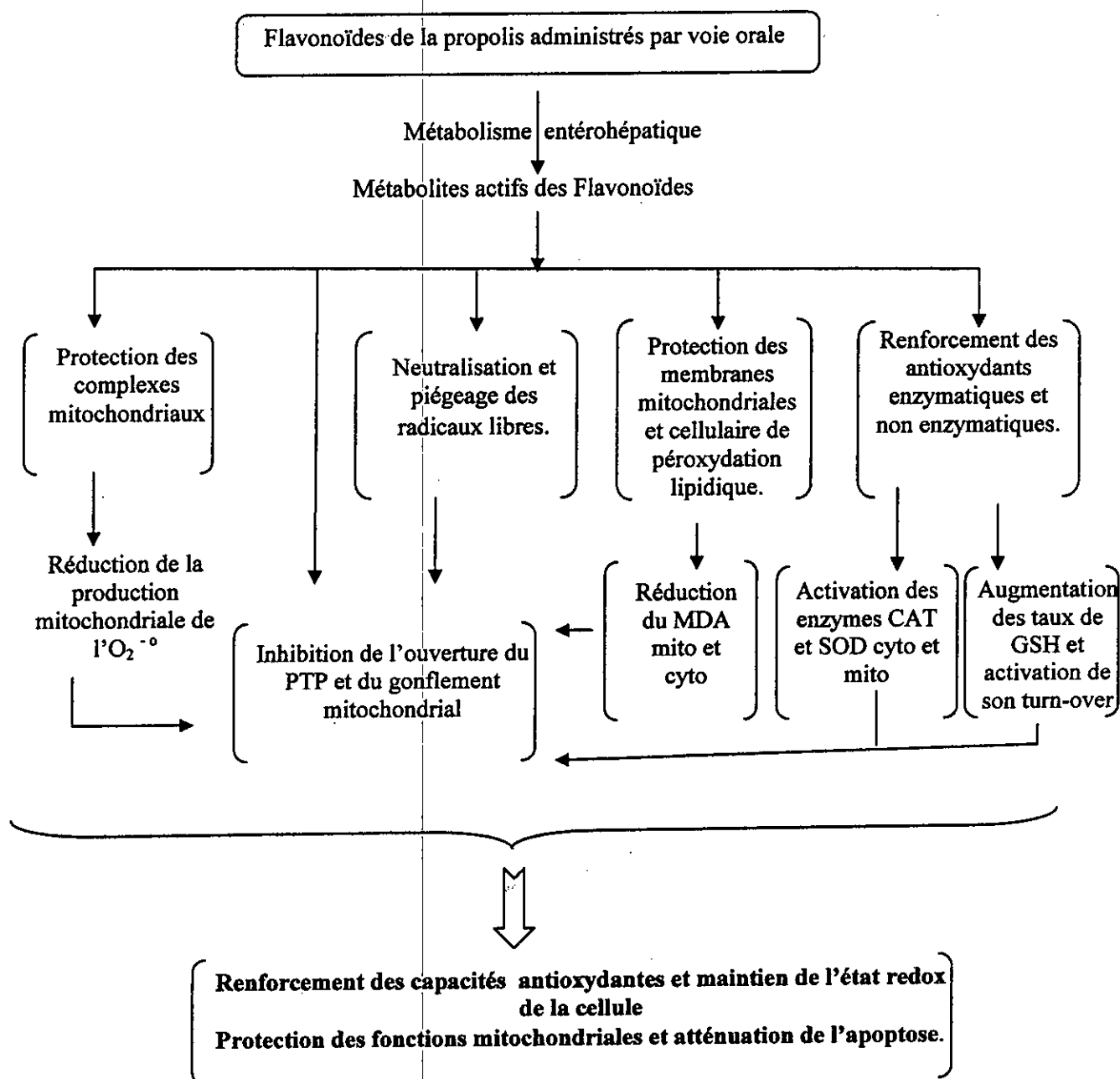


Figure 54. Mécanisme d'action des flavonoïdes de la propolis dans la protection contre le stress hépatique mitochondrial et cellulaire.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION

La mitochondrie constitue la plaque tournante dans la physiopathologie de nombreuses maladies; elle est à la fois la source majeure de la production des radicaux libres oxygénés et de la toxicité des médicaments anticancéreux mais également la première cible des effets délétères de ces derniers. La protection des fonctions mitochondriales et des systèmes antioxydants tant mitochondriaux que cellulaires par les molécules naturelles comme les flavonoïdes semble constituer une stratégie efficace afin de diminuer, combler, ou prévenir ces risques qui pouvant affecté considérablement les mécanismes cellulaires.

Il ressort clairement de notre étude que la propolis algérienne est un produit fort intéressant et riche en possibilités thérapeutique et ce par la protection des fonctions mitochondriales. Cette étude qui vise à évaluer les capacités antioxydantes de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis montre clairement que:

- La propolis et ses aglycones flavoniques administrés à 100 mg/kg/j pendant 2 mois, sont bien tolérés et dénués de tout effet prooxydant ou toxique à long terme mais plutôt maintiennent et améliorent l'équilibre de la balance *antioxydant-prooxydant* à l'état physiologique.
- L'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis présentent une activité antioxydante et antiradicalaire très puissante *in vitro* et *in vivo*. Ces activités étaient concentration dépendant et supérieures à ceux de quercétine et de la vitamine E.
- Les deux extraits présentent une activité antiapoptotique aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* en inhibant le gonflement mitochondrial, phase précoce de l'apoptose.
- Administré à la dose de 100 mg/kg, l'extrait éthanolique et les aglycones de la propolis limitent les effets délétères des ROS et permettent la prévention et la correction du stress oxydant mitochondrial et cellulaire induit par la doxorubicine administrée à 10 mg/kg d'où leurs efficacité préventive et curative et ce 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.

Notre étude nous a permis également de donner les mécanismes d'action par lesquels les flavonoïdes expriment ces capacités antioxydantes et antiapoptotiques, elles reposent principalement sur l'interaction avec les fonctions mitochondriales à travers :

- La neutralisation et le piégeage direct des radicaux libres confirmée par le test du DPPH°.
- L'inhibition de la production de l'anion superoxyde par la mitochondrie essentiellement par le complexe III de la chaîne respiratoire.
- La protection des membranes mitochondriales et cellulaires contre les effets nocifs des ROS par inhibition de la peroxydation lipidique et la réduction des taux du MDA.
- L'inhibition de l'ouverture du PTP par empêchement de l'oxydation des groupements thiols de pore de transition de perméabilité et ainsi l'inhibition du gonflement mitochondrial et de l'apoptose.
- Le renforcement des capacités antioxydantes, enzymatiques, par augmentation de l'activité enzymatique de la catalase et de la SOD cytosoliques et mitochondriales, et non enzymatiques, par la protection et la stimulation de la synthèse du GSH.

Ces résultats ont ouvert un large terrain d'investigation sur la régulation de l'équilibre prooxydant-antioxydant, ils sont pour nous remarquables car ils ouvrent beaucoup de perspectives cliniques et nous laissent espérer leur utilisation avec succès dans le traitement de divers pathologies. Néanmoins, d'autres études complémentaires seront nécessaires. Dans ce cadre et en perspective, on propose :

- L'étude polarographique pour bien déterminer le site d'action des flavonoïdes de la propolis sur les complexes de la chaîne respiratoire.
- Pour mieux comprendre le mécanisme antiapoptotique, nous pouvons proposer de compléter la gamme de paramètres évalués lors de notre travail par l'étude de la libération du cytochrome C, le potentiel membranaire, et l'activité des caspases.
- La détermination des doses et des concentrations prooxydantes dans le but d'une utilisation anticancéreuse.
- Confirmer cette activité antioxydante sur des cellules hépatiques et cardiaques en culture.
- Enfin, il sera intéressant de faire l'identification structurale des polyphénols de la propolis afin d'établir la relation *structure-activité antioxydante*, la pharmacocinétique et la biodisponibilité de ces substances naturelles sera plus que nécessaire.

ANNEXE

ANNEXE

Tampon respirant: QSP 100ml

Sucrose ultrapur.....	8.6g
KH ₂ PO ₄	68mg

pH7.2 à 25°C

100µl de la roténone à 10mM sont ajouté au tampon respirant juste avant l'emploi.

Tampon TS: QSP 500ml

Sucrose.....	42.8g
Tris.....	0.60g

pH7.2 à 25°C

Tampon TSE: QSP 500ml

Sucrose.....	42.8g
Tris.....	0.60g
EGTA.....	0.19g

pH7.2 à 25°C

Solution hypotonique: QSP 100ml

KH ₂ PO ₄	0.49g
Mgcl ₂	0.047g

pH7.2.

Composition du milieu réactionnel pour le dosage de l'activité enzymatique de la SOD**QSP 10ml du tampon phosphate NaH₂PO₄ Ph7.8.**

Cyanide de sodium 10 ⁻²	1ml
Solution du NBT 1,76 × 10 ⁻⁴ M.....	0.1ml
EDTA 66 × 10 ⁻³ M.....	1ml
Riboflavine 2 × 10 ⁻⁶ M.....	0.1ml

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Smith R A. J., Kelso G. F., Blaikie F. H., Porticoes C. M., Ledgerwood E. C., Hughest G., James A. F., Ross M. F. and Cochémé A. M., 2003.** Using mitochondria targeted molecules to study mitochondrial radical production and its consequences. *Biochem Soc Trans*, 31: 1295-1299.
2. **Tillement J.P. 2001.** Protection in vitro des fonctions mitochondriales cérébrales par le E-resveratrol dans les états d'anoxie suivie de réoxygénation. *Bull Acad Med*, 185(8) :1429-1445
3. **Livia C. H., 2005.** Reactive oxygen species in cardiac signaling from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Physiol Soc*, 36: 55-61.
4. **Turrens J. F., 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552: 335-344.
5. **Aurousseau B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: Conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod*, 15: 67- 82.
6. **Castronovo V., 2003.** Alimentation et cancer. *Rev Med Leig*, 58: 231- 239.
7. **Green D. R. and Reed J. C., 1998.** Mitochondrial and apoptosis. *Science*, 281: 1309-12.
8. **Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A., 1997.** Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 18: 44-51.
9. **Vanessa C., Christine M., Catherine B., Nicole C., 2003.** The splanenic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of compound. *Am Jphysiol*, 284: G980-988.
10. **Baldet I., Alban C. and Douce R., 1997.** Biotin synthesis in higher plants purification and characterisation of biogene product equivalent from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli* and its subcellular localisation in pea leaf cells. *FEBS Lett*, 419: 206-210.
11. **Tovar J., Fisher A. and Clark C. G., 1999.** The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the mitochondrial parasite *Entameba hutolytica*. *Mol Microbiol*, 32: 1013-1021.
12. **Lang B. F., Gray M. W. and Burger C., 1999.** Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 33: 351-397.
13. **Anderson S. G. and Kurland C. G., 1999.** Origin of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Opin Microbiol*, 2: 535-554.

14. **Bui E. T., Bradley P. J. and Jhoson P. J., 1996.** A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci*, 93: 9651-9659.
15. **Hausler T., Strurhof Y. D., Blattner J. and Clayton C., 1997.** Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal protein form the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *Eur J Cell Biol*, 73: 240- 251.
16. **Marc M., 2000.** Biologie cellulaire. *MASSON, Paris, 8^{ème} éd.* pp 279-311.
17. **Overly C. C., Rieff H. I. and Hollenbeck P. J., 1996.** Organelle motility and metabolism in axons VS dendrites of cultured hippocampal neurons. *J cell Sci*, 109: 971- 980.
18. **Bereiter-Harn, J. Vothm., 1994.** Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes. Dislocations, fusion and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, 27, 198-219.
19. **Shnept E., 1992.** Origins of plastids. *Leuvin RA éd, London.* pp. 53-76.
20. **Gray N. W., Buger G. and lang B. F., 1999** .Mitochondrial evolution . *Science*, 283: 1476- 1481.
21. **Taylor F.J. 1979.** Symbioticism revisited: a discussion of the evolutionary impact of intracellular symbiose. *Proc R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 204: 267-286.
22. **Callen J. C., 1999.** Biologie cellulaire des molécules aux organismes. *Dunod éd, Paris*, pp 52-72.
23. **Wallace D. C., Broion M. D. and Lott M. T., 1997.** Mitochondrial genetics. In: Rimón D.L., Cannon J.M., ryeriz R.E., Emaergy AEH éd, principles and practice of medical genetics. *Churcill Livingstone, London*, pp 277-332.
24. **Scheffer I. F., 2001.** Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliver Rev*, 49: 3- 26.
25. **Larsson N. G., Wang J. and Wilhelmsoon H., 1998.** Mitochondrial transcription factor A is necessary for mt DNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genet*, 18: 231-236.
26. **Andreurs R., Kubaka I. M., chinnery P. F., lightowlers R. N., Iurnbull D. M. and Houvell N., 1999.** Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genet*, 23:147.
27. **Beckman K. B., Aanes B. N., 1999.** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 78: 547- 581.
28. **Servais S., 2004.** Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. *thèse de doctorat, Université Claude Bernard- Lyon 1, France*, pp.19-35.

29. Shechter E., rossignol B., 2000. Biochimie et biophysique des membranes. *Dunod éd, 2^{ème} édition*, pp 211- 271.
30. Peter N., Campbell A., Anthony D., 2002. Biochimie illustrée. *Maloine éd*, pp 213-238.
31. Sarate M., 1999. oxidative phosphorylation at the fin of the siecle. *Science*, 283: 1488-1493.
32. Smeitink J., Van den H. and Dimauro S., 2001. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet*, 2: 342-352.
33. Robert S., Balaban, Shino N. and Toren F., 2005. Review: mitochondria and aging. *J Cell*, 120: 483-495.
34. Duchem M. R., 1999. Contribution of mitochondria to animal physiology: From homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J.Physiol*, 516: 1-17.
35. Kroemer G. and Reed J. C., 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6: 613-519.
36. Zamzami N., 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 183: 1533-1544.
37. Brenner G., Marzo I., Zamzanu N., Susin S. and Vieiral Kroemer G. 1998. Cooperation mortelle entre Bax et le ANT pour le contrôle mitochondrial de l'apoptose. *Med Science*, 14: 1399-13401.
38. Larsson N.G. and Clayton D. A., 1995. Molecular genetic aspects of humaines mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet*, 29: 151- 178.
39. Raha S. and Robinson B. H., 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*, 25(10): 502-8.
40. Fang Y. Z., Yang S., Wu G., 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutr*, 18: 872-890.
41. St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S. J. and Brand M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biochem*, 277: 44784- 44790.
42. Liu Y., Fiskum G. and Schubert D, 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Biochem*, 80: 780-787.
43. Gutteridge. 1993 Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free radic Res commun*, 19:141- 158.
44. Crompton M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *J Biochem*, 341: 233- 249.

45. Steiman H. M., 1995. The b-Cl₂ encoprotein functions as a prooxidant. *J Biochem*, 270: 3487-3490.
46. De Moffarts N., Kirschvink J., Pincemail P., Lekeux., 2005. Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann Méd Vét*, 149, 1-9.
47. Kohen R. and Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reaction, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30: 620- 650.
48. Klein J.A. and Ackerman S.L., 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 111: 785-793.
49. Novelli G.P., 1997. Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol*, 48:517-527.
50. Chaudire J., 1994. Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in ling cell. *Free Radic Damag Control*, 25-65.
51. Favier A., 2003. Le stress oxydant : Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des machanismses des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique novembre*, pp 108-115.
52. Haton C., 2005. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thèse de doctorat de l'université Paris VI, France*, pp 43-58.
53. Cough A. C., Miles J. S., Spurr N. K., Moss J. E., Gaedigk A., Wolf C. R., 1990. Identification of the primary gene defect at the cytochrom P450. *Nature*, 347: 773-776.
54. Singal, P.K. and Iliskovic, N. 1998. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N.Engl. J. Med*, 339: 900-905.
55. Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek, P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo P. and Pritchard K.A. Jr., 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9220-9225
56. Vasquez-Vivar J., Martasek P., Hogg N., Masters B. S., Pritchard, K. A Jr., and Kalyanaraman B., 1997. Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from Adriamycin. *Biochemistry* 36, 11293-11297.
57. Association Francaise des Enseignants de Chimie Thérapeutiques (AFECT), 2004. Médicaments antitumoraux et perspective dans le traitement des cancers. *TEC et DOC éd, paris*, pp 364-410.

58. **Kotamraju S., Konorev E.A., Joseph J., and Kalyanaraman B., 2000.** Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J. Biol. Chem.* **275**, 33585-33592.
59. **Nakamura T., Ueda, Y., Juan, Y., Katsuda S., Takahashi H., and Koh E. 2000.** Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation* **102**, 572-578.
60. **Thannickal V. J., Fanburg B. L., 2000.** Reactive oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol*, **279**: 1005-1028.
61. **Rahman I., Morrisson D., Donaldson K., Maccnee W., 1996.** Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **154**, 1055-1060.
62. **Xia Y., Tsai AL, Berka V. and Zweier J. L., 1998.** Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*, **273**:25804-25808.
63. **Girotti A.W., 1998.** Lipide hydroperoxyde generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Research*, **39**: 1529-1542.
64. **Brunet S., 1999.** Vue sur les mécanismes de contrôle du cholestérol hépatique suite au stress peroxydatif induit par le fer. *Thèse de doctorat, Montréal Canada*, pp. 4-24.
65. **Stohs S. and Bagchi D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, **18 (2)**: 321 -366.
66. **Morin D., Zini R., Tillement S.P., and Burdeau A., 2004.** Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion: mitochondrial respiratory chain as a pharmacological target. *Letters in drugs & Discovery*, **1**:279-284.
67. **Andreyev A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A., 2005.** Mitochondrial Metabolism of reactive oxygen Species. *Biochemistry*, **70(2)**:200-214.
68. **Wathley S.A., Curti D. and Marchbanks R.M., 1996.** Mitochondrial involvement in schizophrenia and other functional psychoses. *Neur chem Res*, **21**:995- 1004.
69. **Hauptmann N., Grimsby J., Shuh J. C, and Cadenas E., 1996.** The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *arch. Biochem. Biophys*, **335**: 295-304.
70. **Simonson S. G., Zhang J., Canada A. T., Benveniste H. and Piantadosis C. A., 1993.** Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion in the rat brain. *J. Cerebr. Blood Flow Metab*, **13**: 125-134.

71. Kunduzova O. R., Bianchi P., Parini A. and Cambon C., 2002. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol*, 448(2-3): 225-30.
72. Lofler M., Becker C., Wegerle E. and Schuster G., 1996. Catalytic enzyme histochemistry and biochemical analysis of dihydroorotate dehydrogenase/oxidase and succinate dehydrogenase in mammalian tissues, cells and mitochondria. *Histo Chem Cell Biol*, 105: 119-128.
73. Koza R. A., Kozak U. C., Brown L. J., Leiter E. H., Macdonald M. J. and Kozak L. P., 1996. Sequence and tissue-dependent RNA expression of mouse FAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 336: 97-104.
74. Zhang L. Yu. L. and Yu C. A., 1998. Generation of superoxide anion by succinate cytochrome c reductase from bovin heart mitochondria. *J. Biol Chem*, 273: 33972-33976.
75. McLennan H. R. and Degli -Eposti M., 2000. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr*, 32: 153-162.
76. Gardner R. R., 2002. Aconitase. Sensitive target and measure of superoxide. *Meth Enzymol*, 349: 9-23.
77. Vasquez-Vivar J., Kalynaraman B. and Kennedy M. L., 2000. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical: An electron spin resonance investigation. *J Biol Chem*, 275: 14064-14069.
78. Tretter L. and Adam-Vizi V., 2004. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalysed by Alpha- ketoglutarate dehydrogenase. *J Neuro Sci*, 24: 7771-7778.
79. Starkov A. A., Fiskum G., Chinopoulos., Lorenzo B. J., Brovone S. E., Patel M. S. and Beal M.F., 2004. Mitochondrial ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*, 24: 7779-7778.
80. Kushnareva V., Murphy A. N. and Andreyev A., 2002. Complex I mediated reactive oxygen species generation: modulation by cyt-C and NAD(P) oxidation-reduction state. *J Biochem*, 368: 545-553.
81. Murphy M. P., 2004. Investigating mitochondrial radical production using targets probes. *Biochem . Soc Trans*, 32: 1011-1014.
82. Shen J. and Cookson M. R., 2004. Mitochondria and dopamine: new insights into recessive parkinsonism . *Neuron*, 43:301-304
83. Korshunov S. S., Skulachev V. P., and Strakov A. A., 1997. High protonic potential actuates: a mechanism of the production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*, 416: 15-18.

84. Hansford R. G., Hogue B. A., and Mildaziane V., 1997. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr*, 29: 89- 95.
85. Lambert A. J., and Brand M. D., 2004. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*, 382: 511- 517.
86. Herrero A. and Barja G., 2000. Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr*, 32: 609-615.
87. Junemann S., Heathcote P. and Rich P.R., 1998. On the mechanism of quinone oxidation in the bc₁ complex. *J Biol Chem*, 273: 21603- 21607.
88. Turmpower B. L., 1990. The protonative Q cycle energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem*, 265: 11409-11412.
89. Starkov A. A., and Robinson B. H., 2000. Superoxide from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.*, 29:170-180.
90. Starkov A. A., and Fiskum G. 2001. Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 281: 645-650.
91. Papa S. and Skulachev V. P., 1997b. Reactive oxygen species, Mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem*, 17: 23-31.
92. Vidal-Puig A. J., Grujic D., Zhang C. Y., Hagen T., Bosso A., Ido Y., Szezepanik A., Wade J. and Mootha V., 2000. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem*, 275: 16258-16266.
93. Neger- Salvayre A., Hirtz C., Carrera G., Cazenave R., Trolly M., Slvayre R., Penicaud L. and Casteilla L., 1997. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Fased J*, 11: 809- 815.
94. Arsenijevic D., Onuma H., Pecqueur C., Raimbault S., Manning B. S., Mirousc B. ; Couplan E., Alvers Guevra M. C., Goubern M., Survit R., Bouillaud F., Richard, D., Collins S., Riquier D. 2000. Disruption of the uncoupling protein -2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet*, 26: 435-439.
95. Pre J., 1991. Lipid peroxidation. *Path Biol*, 39. 716-736.
96. Wilson DW, Metz HN, Graver LM, Rao PS, 1997. Direct method of quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. *Clin Chem*, 43:1982-1984.

97. Bagchi D., Ihm Z.J., Stohs S.J., Qkubue P. I., 1994. Excretion of MDA, acetaldehyde acetone in the urine of rats given an acute dose of MDA. *Arch Toxicol*, 6: 259-266.
98. Echtay K. S., Esteves T. C., Pakay J. L., Jekabsons M. B., Lamber A. J., Porterotin M., Pamplona R., Vidal-Puig A. J., Wang S., Roebuck S. J. and Brand M. D., 2003. A signalling role for 4HNE I regulation of mitochondrial uncompling. *Embo J*, 22: 4103-4110.
99. Bertrand F., 2003. Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futures enjeux. *Actualité chimique. Review*.
100. Friguet B., Szwed LI., 1997. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4- hydroxyl-2- nonenal -Gross linked protein. *FEBS Lett*, 405: 21.
101. Smolka M. B., Zoppi C. C., Alves A. A., Silveira L. R., Maragnoni S., Rereira-Da-Silva L., Novello J. C., Macedo D. V., 2000. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the muscle of rats. *Am.J.Physiol*, 279R: 1539- 1545.
102. Cadet J., Bbellon S., Bberger M., Bbourdat A. G., Ddouki T., Duarte V., Frelon S., Gasparu Ho D., Muller E., Revanat E J. L. and Sauvaigo S., 2002. Recent aspects of oxidative DNA dange. *Biol Chem*, 282(6): 3.
103. Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J. P., Ravanat J. P., Ravanat J.L. and Sauvaigo S., 1999. Hydroxyl radicals and DNA bases damage. *Nutr Res*, 424: 9- 21.
104. Bokr V. A., Stevnsner T. and De Souza- Pinto N. C., 2002 b. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 286: 127-134.
105. Bohr V. A., 2002a. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 32: 804- 812.
106. Comhair S.A. and Erzurum S. C., 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J physiol*, 283: L 246-255.
107. Scandalias J. G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol*, 101: 7-12.
108. Gardner P. R., Raineri I., Epstein L. B., and Whitec. W., 1995. Superoxide radical and iron modulate aconitase in mammalian cells. *J Biol Chem*, 270: 13399-13405.
109. Meloo S., Cokun P., Patel M., Tuinstra R., Cottrell B., Jun A. S., Zastaway T. H., Dizdaroglu M., Goodman S. I., Huang T.T., Mlziorko H., Epstein C. J. and Wallace D. C., 1999. Mitochondrial disease in 2 superoxide dismutase 2-mutant mice. *Proc. Nath. Acad SCI. USA*, 96: 846- 851.

110. Ho Y.S., Xiong Y., Ma W., Spector A. and Ho D.S., 2004. Mice lacking catalase developed normally but slow differentially sensitively to oxidant tissue injury. *J Biol Chem*, 297: 32804- 32812.
111. Antunes F., Han D. and Cadenes E., 2002. Relative contribution of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in vivo. *Free Rad Biol Med*, 20: 463- 466.
112. Kelner M. J., And Montoya M. A., 2000. Structural organization of the human glutathione reductase gene. Determination of correct c DNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 269: 366- 368.
113. Aurousseau B., Durand D., Gruffat D., 2004, Contrôle des phénomènes oxydatifs pendant la gestation chez les monogastriques et les ruminants. *INRA Prod Anim*, 17(5) : 339-354.
114. Achon M., Alonso-Aperte E., Reyed, Ubeda N., Verela Moréras G., 2000. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br.J.Nutr.*, 83: 177-183.
115. Martin F., 2003. Vannin-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. *Thèse de doctorat de l'université de la méditerranée centre de l'immunologie de Marseille – Luminy NSERM U 136- CNRSU MR6102*, pp 17
116. Liu Y., Liu J., Iszard M.B., Andrews GK., Palmiter R.D. and Klaasen C.D., 1995. Transgenic mice that overexpress metallothioneine-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol Appl pharmacol*, 135(2): 222-228
117. Pré. J., 1992. Radicaux libres et peroxydation lipidique: I. Aspects biologiques généraux. *Sem Hôp Paris*, 98(41): 1430- 1437.
118. Krinsky N.E., 1992. Mechanism of Action of Biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200: 248- 254.
119. Drog W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Cell Physiol Rev*, 82: 42.
120. Pelletier M., Vallette F. M., 2001. Apoptose et maladies neurodégénératives. *Pharmacol*, 15: 9.
121. Olson M. and Kornbluth S., 2001. Mitochondria in Apoptosis and Human Disease. *Curr Mol Med*, 1(1): 91-122.
122. Hengartner 2000. Hengartner N.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770- 776.
123. Vaux D.L. & Korsmeyer, S.J., 1999. Cell death in development. *Cell*, 96: 245-54.

124. Green D., Kromer G., 1998. The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria?. *Cell Biol*, 8: 267- 271.
125. Kluch RM., Bossy E., Green D. R., Neumeyer D. D., 1997. The release of cytochrom-C- from mitochondria. *Science*, 275: 1132- 1136.
126. Brossy-Wetzel E., Neumeyer D. D., Green D. R., 1998. Mitochondrial C- release in apoptosis occurs apstream of DEVD – Specific Caspase activation and independtly of mitochondrial transmembrane depolarisation. *EMBO*, 17: 37-49.
127. Alnemir E. S., Livingston D. J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W. and Yuan J., 1996. Human ICE / CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87: 171.
128. Gupta R. A., Tejada L.V., Tong B. J., Das S. K., Morrow J. D., Dey S. K. and DuBois R. N., 2003. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res*, 63: 906-991.
129. Thorberry N. A., 1998. Caspases: Key mediators of apoptosis. *Chem Biol*, 5: 97-103.
130. Fesik S.W., Shi Y., 2001. Structural biology. Controlling the caspases. *Science*, 294: 1477-1478.
131. Nakagawa T., Yuan J., 2000. Activation of caspase -12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, 150: 887- 894.
132. Krajewski S., Takayama S., Schilber Fenton W. and Pxeed J. C., 1993. Investigation of the subcellular distribution of the b-cl₂ encoprotein. *Cancer Res*, 53: 4701-4714.
133. Gross A., Mc Donnell J. M., Koromeyer S. J., 1999. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13: 1899-1911.
134. Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381: 335-41.
135. Schendel S.L., Montal M., Reed J.C, 1998. Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell DeathDiff*, 5: 372-80.
136. Antonsson B. and Martinou J. C., 2000. The B-cl₂ protein family. *Exp Res*, 256: 50- 57.
137. Shimazu S., Eguch Y., Kamike W., Eumahashi A., Lacraique V., Matsuda H., Tsujimoto Y., 1998. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulation protonflusc. *Proc Natl Sci*, 95: 1455-1459.
138. Vander M.S., 1999. Bcl-XL prevents cell death following growth factor with drawal by facilitaling mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell*, 3: 159- 167.

139. **Pollack. M and Leeuwenburgh C, 2001.** Apoptosis and Aging: Role of the Mitochondria. *Gerontology*, 56A 11: B475-B482.
140. **Corbiere C., 2003.** Comparaison de l'effet anti-prolifératif de trois stéroïdes végétaux (diosgénine, hécogénine, tigogénine) sur la lignée 1547 d'ostéosarcome humain Implication de la mitochondrie et de la cyclooxygénase-2 dans l'apoptose induite par la diosgénine sur les lignées 1547, HEp-2 (laryngocarcinome) et M4Beu (mélanome). *Thèse de doctorat de l'université de Limoge*, pp 22-250.
141. **Ravagnan et al 2002.** Ravagnan L., Ronnier T., Kroemer G., 2002. Mitochondria: the killer organelles. *J Cell physiol*, 3: 839-843.
142. **Yang G., Liu X., Bhalla K., Kim CN., Ibrado A.M., Cai J., Peng T. I., Jones D. P., Wang X., 1997.** Prevention of apoptosis by B-cl-2: released of cyt-C from mitochondria. *Science*, 275: 1129-1132.
143. **Borner C, 2003.** The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, 39. 615-647.
144. **Xiaodong W., 2001.**The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Gene & Developpement*, 15:2922-2933.
145. **Lenaz G.A.1998.** Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biolphys Acta*, 1366: 53-67.
146. **Wei Y. H. and lee H. C., 2002.** Oxidative stress, Mitochondrial DNA. Mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med*, 277: 671-682.
147. **Morin D., Thierry H., Spedding M., Tillement J. P., 2001.** mitochondria as target for antiischémic drugs. 13:22-67.
148. **Karmasyn M., 1991.** Ischemic and reperfusion injury in the heart cellular mechanisms and pharmacological in tervention. *J Physiol Pharmacol*, 69: 719-730.
149. **Cadet L., Harrington B and Ordonez S. 2000.** The Metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-Thioethers. *Synapse*, 35: 228-233.
150. **Mytitinedu C. Werner P., Molinari S., Di Rocco A., Cohen G and Yahr M.D., 1994.** J Neural Transn. Park. Dis Dement. *Sect*, 8: 223-228.
151. **Reichmann A., Florke S., Hebenstreit G, Schrubar H and Reiderer P, 1993.** Respiratory chain and mitochondrial deoxyribonucleic acid in blood cells from patients with focal and generalized dystonia. *J Neurol*, 240: 377- 380.
152. **Chadge G.D., Lee J.P., Bindokas V. P., Jordan J., Ma L., Miller R.J and Ross R.P., 1997.** Mutant superoxyde dismutase -1 linked FaL S. Molecular mechanism of neuronal death and protection. *J. Neurosis*, 17: 8756-8766.

153. Lee J.P., Pal frey H.C., Bindokas V.P., Ghadge G. D., Ma L., Miller R.J, 1999. The role of immuno philins in mutant superoxide dismutase 1- linked FALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 3251-3256.
154. Gu M., Gash M.T., Mann Y.M., Javoy-azid F., Cooper J.M and Schapia AH., 1996. Molécular characterization of mitochondrial poposis-inducing factor *Ann. Neurol*, 39:385-389.
155. Wallace D.C., 1995. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am. J. Hnm. Gent*, 57: 201-223.
156. Mivabella M., Di Giovanni S., Silvesti G., Tonali P. and Servidei S., 2000. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain*, 123: 93-104.
157. Matsriski T., Sakai T., Naito E., Nagamitsu S., Kuroda Y., Iwashita H and Kato H, 1996. Elevated cerebrospinal fluid malate / pyruvate ration in Machado – Joseph disease. *Acta. Neurol. Scand*, 93: 72-75.
158. Alan L., Miller N. D., 1996. Antioxidant flavonoids: Sturcture, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1(2): 103-111.
159. Clifford M.N., 1999. Chlogenic acids and other cinnamitaes, nature, occurrence and dietary burden. *JSC Food Agric*, 79: 362- 372.
160. Hanazaki Y., Ogawa S., Fukui S., 1994. The correlation beetwren active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol Med*, 16: 845- 850.
161. Mira L., Ferrandeg MT., Sontos M., Rocha R., 2002. Interaction of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for the antioxidant activity. *Free Radic Res*, 36(11):1199-1208.
162. Williams R.I., Spencer J.P., Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: Antioxidents or signalling molecules. *Free Radic Biol Med*, 36(7): 838- 849.
163. Cheng I. F., Breen K., 2000. On the ability of form flavonoid, bacilien, luteolin, naringenin and quercetin, to supress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*, 13(1): 77- 83.
164. Ligeret H., Barthelemy S., Zini R. T., tillement J.P., Labidalle S., and Morin D., 2004. Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radical Biology & Medicine*, 36: 919- 929.
165. Chin O.K., Kim D.O., Lee C.Y., 2003. Superoxide radical scavenging activity of the m polyphenols in frush plums. *J Agric Food Chem*, 51(27): 8067-8072
166. Morrissay, C, Watson R., 2003. Phytoestrogens and prostate cancer. *Curr Drug Targets*, 4: 231-241.

167. Nestel P., 2003. Isoflavones: Their effect on cardiovascular risk and functions. *Curr Lipidol*, 14:3-8.
168. Rajnerayanama K., Reddy M., Charluvadi M. R and Krishna D. R., 2001. Bioflavonoides: Classification, pharmacological, Biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of pharmacology*, 33: 2-16.
169. Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (2^{ème} éd.). Paris: éditions Tec & Doc Lavoisier, pp 266-293.
170. Beecher GR., 2003. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*, 133(10):32485-32545.
171. Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3^{ème} éd.). Paris: éditions Tec & Doc Lavoisier, p1120.
172. Chanyallon C., Blanchema-Son P., Cance B., 1994. Les flavonoides. *Act Med Angiologie*, 197: 3846- 3850.
173. Cook N. C., Samman S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources *J Nutr Biochem*, 66- 76.
174. Bankova V., 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *E CAM*, 2(1): 29-33.
175. Bankova V., Melena P., and Anna-Gloria S., 2002. Chemical composition on European propolis: Expected and Unexpected results. *Z.Natur forsch*, 57C: 530-533.
176. Melina V., Bankova V., SorkumK., Saadi H., 2000. Propolis from the Mediterranean region, Chemical composition and antimicrobial activity. *Z .Naturforsh*, 55c, 790-793.
177. Harborne, J.B., and Williams C.A., 2000. Advances in flavonoides research Since 1992. *Phyto chemistry*, 55: 481-504.
178. Kuresh A., Youdim A., Jeremy P.E., Spencer., Hangen S., and Rice-Evans C., 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem.*, 383: 503-519.
179. Julies A., Christin M., 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. *Annuel Review of Nutrition*, 22: 19-44.
180. Gerhard R., 1993. Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. *Lavoisier Tec & Doc*, pp 333-339.
181. Elicoh-Middleton Jr., Chithan K., and Theoharis C., 2000. Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.

182. **Marfak A., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges*, pp 24-42.
183. **Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F., 1996.** Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd Nut*, 32(1):17-27.
184. **Hollman P. C., Bijsman M. N., Van-Gameren V., Gnossen E. P., De Vries J. H. and Hatan M. B., 1999.** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free radic Res*, 31: 569-573.
185. **Hollman P. C., Van Tijn J. M., Brysman M. N., Van der Gaag M. S., Mengelers M. J., De Vries J. H. and Katan M. B., 1997.** Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various food in man. *FEBS Lett*, 418: 152-156.
186. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., 2004.** Polyphenols: Sources and bioavailability. *Amj chin Nutr*, 79(5):727-747.
187. **Day A. J., Dupont M. S., Ridley S., Rhodes M. T. C., Morgan M. R. A. and Williamson G., 1998.** Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FERS Lett*, 436: 71-75.
188. **Manach C., Morand C., Demigne C., Texier O., Regeat F. and Remesy C., 1997.** Bio availability of rutin and quercetin in rat. *FEBS Lett*, 409: 12-16.
189. **Deprey S., Brizillon C., Rabot S., Phillippe C., Milla L., Lapiere C. and Scalbert A., 2000.** Polymeric Proanthocyanidines are catabolized by a human colonic microflora into low molecular weight phenolic acids. *J Nutr*, 130: 2733- 2738.
190. **Wall U. K., Galija T. A. and Wall T., 1999.** Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolite by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol*, 58:431-438.
191. **Spencer J. E., Choivrimootoo G., Chondhury R., Debnam E.S., Srai S. and Rice E., 1999.** The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*, 458: 224- 230.
192. **Rice-Evans C., Spencer J. E., Schroter H. and Rechner A. R., 2001.** Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. *Drug Metab .Drug Interact*, 17,291-31.
193. **Crespy V., Morand C., Besson C., Manach C., Denigne C., and Remesy C., 2004.** Comparison of the intestinal absorption of quercetin , phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr*, 131: 2109-2114.
194. **Spencer J. P., Chowrimootoo G., Ghoudhuery R., Debnam E.S., S. K., and Rice Evans C., 1999.** The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*, 458: 224- 230.

195. Vanessa C., Chritine M., Claudine M., Cathrine B., Christian D. and Christian R., 1999. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol Gastrointest Physiol*, 277G: 120-126.
196. Gee J., Dupont M. S., Day A. J., Plumb G. W., Williamson G., and Johnson I.J., 2000. Intestinal transport of quercetin glucosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathways. *J Nutr*, 130: 2765-2771.
197. Felgines C., Texier O., Morand C., Manach C., Scalbert A., Regeat F., and Remesy C., 2000. Bioavailability of the flavonone naringenin and its glucosides in rat. *Am J Physiol*, 279G: 1148-1154.
198. Graspe E. U., Witting J., Mueller S., Rietling A. K., Uehleke B., Drewelow B. P., Forte H., Jacobaxh G., Derenodorf H, and Veit M., 2001. Pharmacokinetic and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, 41: 492-499.
199. Manach C., Morand C., Texier O., Favier M. L., Agullo G., Regeat F. and Remesy C., 1995. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*, 125: 1911-1922.
200. Rechner A. R., Spencer J. P. E, Kuhine G. and Rice-Evans C., 2000. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med*, 30: 1213-1222.
201. Harada H., Kan Y., Fukui Y., Kageyama N., Nakai M., Miki W. and Kiso V., 1999. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with unglycosylated catechin and epicatechin. *Bio Biotech*, 63: 973-977.
202. Chanvallon C, Blanchema Son P., Cance-Sanchez B., 1994. Les flavonoïdes. *Act Med Angiology*, 179: 3846- 3850.
203. Antonio C., Santos A., Sergrio A., Uyenura A., Joav L., Iapes J., Fabio E., Mingahoc., 1998. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radic Biol med*, 24 (9): 1455-1461.
204. Hirano R., Osakabe N., Iwamoto T., Matsumoto A., Natsume M., Takizawa T., Igarashi O., Itakura H. and Kondo K., 2000. Antioxidant effects of polyphenols in chocolate on low density lipoprotein both in vitro and in vivo. *J Nutr. Sa. Vitaminol*, 46: 199- 204.
205. Boyle S. P., Dobson V. L., Duthies S. J., Kyle J. and Collins A. R., 2000. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. *Eur J Nutr*, 39: 213-223.
206. Anderson R., Amarasinghe C., Fisher L. J., Mak W. B. and Paker J. E, 2000. Reduction in free radical induced strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoid. *Free Radic Res*, 33: 91-103.

207. Russo A., Acquavira R., Campisi A., Sorrenti V., Di Giacormo C., Virgata., Bancellona M. L. and Vanella A., 2000. Bioflavonoïds as antiradicals, antixodants and DNACleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*, 16: 91- 98.
208. Ishige K., Schubert D. and Sagara Y., 2001. Flavonoïds protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 30: 433-446.
209. Halliwell B., 1994. Free Radical and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52: 253- 265.
210. Heijnen G. G., Haenen G. R., Van Aker F. A., Vander Vijgh W. J., Bast A., 2001. Flavonoïds as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol*, 15(1): 3- 6.
211. Chun O. K., Kim D. O., Lee C. Y., 2003. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *J Agric Food Chem*, 51(27): 806
212. Ritta P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, 63: 1035- 1042.
213. Dugas A. J., Castaneda-Acosta J., Boni G. C., Price K. L., Fisher N. H., Winston G. W., 2000. Evaluation of the total peroxy radical Scavenging capacity of flavonoids: Sturcture-Activity relationship. *J Nat Prod*, 63: 327- 331.
214. Cao G., Sofic E., Prior R. L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structur-Activity relation ships. *Free Radic Biol Med*, 22: 749- 760.
215. Moris C. J., Earl J. R., Trenam C. W. and Blake D. R., 1995. Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *J Biochem Cell Biol*, 27: 109-122.
216. Brown J. E., Khodr H., Hider R. C. and Rice-Evans., 1998. Structural dependence of flavonoïd interactions with copper ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochem J*, 330: 1173- 1178.
217. Van Acker S. A. B. E., Van den Berg D. J., Tromp M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom W. P., Van Der Vijgh W. J. F. and Bast A., 1996. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med*, 20: 331-342.
218. Cook N. C. and Samman S., 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr. Biochem*, 7: 66- 76.
219. Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H., 1997. Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *J. Agr. Food Chem*, 45: 30-34.
220. Kessler M., Ubeau G., Jung L., 2002. Anti-and pro-oxydant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol.*, 55: 1-11.

221. Kujungier A., Tsvetkova J., Serhdjieva Y., bankova V., christov R. and Popov S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of differet geographic origin. *J Ethno Pharmacol*, 64: 235-240.
222. Pham T. K., Vinh P. T., Nong H. D. and Nuguyen D. K., 1993. Flavonoïds as antimicrobial agents. *Tap Duoc Hoc*, 6:14-21.
223. Terschuk M. L., Riera M. Q., Casteo G. R. and Afdala L. R., 1997. Antimicrobial activity of flavonoïds from leaves of tagetes minuta. *J Etopharmacol*, 56: 227- 236.
224. Pham T. K, Vinh P. T., Nong H. D., Nguyen D. K., 1993. Flavonoïds as antimicrobial agents. *Tap Chi Duco Hoc*, 6: 14-21.
225. Sato M., Fujiwara S., Tsuchiya H., Fujii T., Linuma M., Tosa H. and Ohkwa Y., 1996. Role of flavonoids in microbial diseases. *J Ethopharmacol*, 54: 171-178.
226. Ghazal S. A., Abuzarqua M. and Mahernserh A. M., 1992. Effect of plant flavonoïds on immune and inflammatory cell function. *Phytotherapy Res*, 6: 265-271.
227. Rajnarayana M., Spical Reddy M. R., Chalurady D.R., Krishma., 2001. Bioflavonoids: classification pharmacological, Biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.
228. Yang C. S., Yang G. Y., Landan J. M., Kim S. and Liao J., 1998. Tea and tea polyphenols inhibit cell hyperproliferation, lung tumorigenesis, and tumor progression. *Lung Res*, 24(4): 629-639.
229. Huang M. T., Xie J. C., Wang Z.Y., 1997. Effect of tea, decaffeinated tea, caffeine on UVB light-duced complete caecemogenesis in SHK-1 mice demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. *Biol Res*, 13: 2623-2629.
230. Gupta S., Hastak K., Ahmad N., Lewin J. S. and Mukthen H., 2001. Inhibition of procancinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenol. *Natl Acad Sci*, 98(18): 10350-10355.
231. Yamagishi M., Natsume M. and Osakabe N., 2002. Effects of cacao liquor proantho-cyanidins on induced mutagenesis in vitro, and in vivo pancreatic tumonigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer L*, 185(2): 123-130.
232. Ong K. C., Khoo H. E., 2000. Effects of Myrecitin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci*, 67: 1695-1705.
233. Erica weinstin T., Giuseppina N., Renata M., Dejair M., Antonio S., 2005. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomie and chemistry. *Evid based complement alternat Med*, 2(1): 85- 92.
234. Bankova V. S., de castro S.L., Mara-cucci M. C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15.

235. English W., green way W., whatly F. R., 1992. Analysis of phenolics in the bud exudates of propolis by GS-MS. *Phytochem*, 31: 1255-1260.
236. Burdock G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol*, 36: 347-363.
237. Marcucci M.C., Ferreres F., Garcia-Vigura C., Bankova V. S., De castro S. L., Datas A. P., Valente P. H. M. and Paulino N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J.Ethnopharmacol*, 74: 105-112.
238. Wollenweber E., Hausen B.M., Greenaway W., 1990. Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, popular balsam and balsam of Perou. *Bull Goup Polyphenols*.15: 112-120.
239. Antonio S., Erica W.T., Giuseppina N., Dejair M., 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian propolis. *E CAM*, 2(1): 33-38
240. Alexandre F., 1999. L'apiculture aujourd'hui. *Dargaud ed.*, pp 121-125.
241. Evangelist-Rodrigus A., Carneiro P.M., 2001. Analise comparative da qualidade da propolis colectado atraves de calços de medeira etela plasticana regio do byo paraiba. *Mensagem Doce*, 63(bis).
242. Kokaleci A., Marina B, Pepel S., 2003. Analysis of propolis from the continental and adreatic regions of Croatia. *Acta Pharm*, 53: 275-285.
243. Amoros M., Simoes M. O., Girrel A. and Cormier M., 1992. Synergetic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparaison with the antiviral activity of propolis. *J.Nad.Prod*, 55: 1732-1740.
244. Christov R., Bankova V., Hegazi A., Abd El Hady F., and Popov S., 1998. Chemical composition of Egyptian propolis. *Z Natur Foresh*, 53c: 197-200.
245. Wollenweber E., and Buchma S.L., 1997. Propolis sources other than poplar (*Populus sp*). *Z.Naturforshm*, 52s: 530-535.
246. Melina V., Bankova V., SorkumK., Saadi H., 2000. Propolis from the Mediterranean region, Chemical composition and antimicrobial activity. *Z.Naturfresh*, 55c, 790-793.
247. Park Y.K, Alenear SM, Aguiar CL, 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J.Agric .Food .Chem*, 50: 2502-2506.
248. Park V. K., Paredes G., Aguiar C. L., Alenear S.M., 2004. Chemical constituents in *Bacharus dracunculifolia* as the main botanical origin south eastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food. Chem*, 52: 1100 – 1103.
249. Kumazawa S., Yoneda M, Shibata I., Kanaeda J., Hamasaka T., Nakayama T., 2003. Direct evidence of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull*, 203: 740 – 742.

250. Murat K., Kaya S., and Kurucu S., 2002. GC – MS analysis of propolis samples from two different Regions of turkey. *Z. Naturforsch*, 570: 905 – 909.
251. Maceijeuvicz W., Danieuski M., Bal K., Markouski W., 2001. CG – MS identification of the flavonoïde aglycones isolated from propolis. *Chromatographia ed*, 53: 343- 346.
252. Ghisalberti E. L., 1997. Propolis, a review. *Bee Wold*, 60: 59-84.
253. Decastro S.L., Higashi K.B., 1995. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Erypaosolna cruzi*. *Journal of Ethopharmacology*, 46: 55-8.
254. Burdock G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. toxicol*, 36: 347-363.
255. Shimazawa M., Chikamatsu S., Morimotov N., Mi shima S., 2005. Neuroprotection by Brazilian green propolis agaits in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *E CAM*, 2(2): 201- 207.
256. Isla M., Moreno M., Sampietro A., and Vattune M.A., 2001. Antioxidant activity of Argentina propolis extract. *J Ethnopharma*, 76: 165- 170.
257. Su F., Hayami S., Origi V., Tanaka K., Yanada Y., Ikeda K., Yamada H., 2000. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vit -C and vit-E and the level of lipid hydroperoxid in rats. *Food chem*, 48: 1462-1465.
258. Miyak T., Shibamoto K., 1997. Antioxidative activites of natural compounds fond in plants. *Food Chem*, 45: 1819- 1822.
259. Velikova M., Bankova V.T., svetkova I., Kujungiv A. and Marcucci M. C., 2000. Antimicrobial activity of Brazilian propolis of native stingless bees. *Phytotoherapia*, 71: 693-696.
260. Satos F. A., Bastos A., Uzéda M., Carvalhol M., 2002. Antibacterial activity of Barazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharm*, 80: 1- 7.
261. Murad J. M., Calvi S. A., Sorares A., Benkova V. and Sforcin J. M., 2002. Effect of propolis from Brazil and Bulgaria on fungucidal activity of macrophages against *Paracoccidioïde brasiliensis*. *Ethnopharm*, 79: 331-334.
262. Burdik G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol*, 36. 3 47-363.
263. Benskota A.H., Tezuka Y., Adryana I.K., 2001. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylon activities of constituents from Brazilian proplis. *Phytomediane*, 8:16-23.
264. Astridillo L., Avila. C., 2000. Biologically active compounds from Chilian propolis. *Bol. Soc. Chil. Quim*, 45(4).

265. Paris R.R., Jacquemin., Linard A., 1975. Plantes de Madagascar *Leptolaena Paciflora* Baker, *L. Diospyroidea Cavaco* Var, *Tampoketsensis* et *Sarcolina Multiflora* Dup: Présence d'hétérosides de myricétol. *Plantes médicinales et phytotfakrapie*, IX (3):230-237.
266. Boharun T., Gressier B., Trotin F., Bruner C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luyckx M., Gazin M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparatios. *Arzeim-Forsch/Drug Res*, 1-6
267. Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Gerard B., Rotig A., Saudubray G. M., Munnich A., 1994. Biochemical and biomolecular investigation in the respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 228. 35-51.
268. Lahouel M., 2005. Interaction flavenoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. *Thèse de doctorat de l'université de Mentouri de Constantine, Algérie*, pp 61-80.
269. Lowry OH, Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-75, 1951.
270. Iqbal M., Som D.S., Yasumasa O., Masayoshi F., and Shigero O. 2003. 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*, 92: 33-38.
271. 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., 1998. Structure-property relationship of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 25: 113-120.
272. Zini R., Morin C., Bertelli A. A., Tillement J. P., 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25:87-97.
273. Kristal B. S., Park B. K. and Yu B. P., 1996. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 271: 6033-6038.
274. Beauchamp C., Fridovich I., 1971. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem*, 44: 276-287.
275. Claiborne A., 1985. Catalase activity. In: CRC handbook of methods for oxygen radical research. Ed Greenwald RA, CRC Press, Boca Raton, 283-284.
276. Ellman G. L., 1959. Plasma antioxidants. *Arch Biochem Biphys*, 82: 70-77.
277. Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
278. Association Française de Normalisation (AFNOR), 1995. Recueil des normes françaises, Essai-écotoxicologiques : environnement. ed AFNOR, pp 317-347.

279. **Pincemail J., 1998.** Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux, Cœur, Poumon. Free radic.Biol*, 3: 133-8.
280. **Pincemail J., 1995.** Antioxydants and human diseases. In: Favier A et al, editors. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Basel, London, Boston: Berlin Birkhäuser, 1995*, pp 83-98.
281. **Kawaltowski A.J., Castilho R.E., Vercesi A.E., 2001.** Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 495:12-15.
282. **Ishige K., Schubert D., Sagara Y., 2001.** Les flavonoïdes protègent les cellules neuronales contre le stress par trois mécanismes distincts. *Free Radic Biol Med*, 4:433-446.
283. **Siess M. H., le Bon A. M., Canivenc-Lavier M. C., Suscheter M., 2000.** Mechanisms involved in the chemoprevention of flavooids. *Biofactors*, 12(1-4): 193.
284. **Sang S., Cheng X., Stark R. E., Rosen R.T., Yang C. S., HO C. T., 2002.** Chemical studies on antioxidant mechanisms of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl iorg. *Med Chem.* 10(7):2233-2237.
285. **Bridger S., 1998.** Deaths from low dose paracetamol poisoning. *Br Med J*, 316: 1724-1725.
286. **Elimadi A., Bouillot L., Sapena, R., Tillement J.P. and Morin D., 1998.** Dose-related inversion of cinnarizine and flunarizine effects on mitochondrial permeability transition. *Eur. J. Pharmacol.* 348, 115-121.
287. **Gerwasi P.G., CiHi L., Dewesi R., Del Tacca M., 1986.** Superoxide anion production by adriamycinol from cardiac sarcosomes and by mitochondrial NADH dehydrogenase. *National Library of Medecine (Anticancer Res)*, 6(5): 1231-1235.
288. **Chacon E., Acosta D., 1991.** Mitochondrial régulation of superoxyde by Ca^{+2} : an alterate mechanisme for the cardiotoxicity of doxorubicine . *Toxicol Appl pharmacol*, 107(1): 117-128.
289. **Huk I., Brokovich V., Nanobashvili J., Weigel G., Neumayer C., Partyka L., Patton N., Malinski T., 1998.** Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Brit J Surg*, 85: 1080-1085.
290. **Zini R., Morin C., Bertelli A. A., Tillement J. P., 1999.** Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 25:87-97.
291. **Fremont L., 2000.** Biological effect of resveratrol. *Life Sa.*, 66: 663-673.

292. Zini R., Morin C., Bertelli A., Bertelli A. E., Tillement J. P., 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs. Expt. Clin. Res.*, 25:87-97.
293. Cormier A., Morin C., Zini R., Tillement J.P., 2003. Neuropharmacology, 44: 642-652.
294. Cormier A., Morin C., Zini R., Tillement J.P., Larguee G. Brain., 2001. In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Res. 2001*, 900 :72-79.
295. Sohn Y.T., Oh J.H., 2003. Characterisation of physico- chemical properties of ferulic acid. *Arch Pharm Res*, 26(12): 1002-1008.
296. Naranishi I., Ute Y., Miyazaki K., Yakumaru H., Ueda J., Ozawa T., Fukuhana S., Nagazawa H., Houi H., Ikota N., 2003. Efficient radical scavenging ability of artemisinin C., a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Org Biolmol Chem*, 71(9):1452-1454.
297. Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., Fillastre J.P., 2004. Protective effect of flavonoïds against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid peroxydation and increasing of liver glutathione. *Heama*, 7 (1): 59-67.
298. Milane H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. Strasbourg I*, pp 13-36.
299. Kahraman A., Erkasap N., Serteser M., Koken T., 2003. Protective effect of quercetin on renal ischemia / reperfusion injury in rats. *J nephrology*, 16(2): 219-24.
300. Inal M., Altinisik M., Bilgin M. D., 2002. The effect of quercetin on renal ischemia and reperfusion injury in the rat. *Cell Biochem Funct*, 20(4): 291-296.
301. Rice-Evans CA, Miller NJ, and Paganga G., 1996. Structure -antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med*, 20: 933-956.
302. Saija A, Scalse M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, and Castelli F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biol Med*, 19: 481-486.
303. Maria I, Nieva M, Maria I, Antonio S, and Marta AV., 2000. Comparaison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 109-114.
304. Hall E. D., 1995. Inhibition of lipid peroxidation in central nervous system trauma and ischemia. *J Neurol Sci*, 134 (Suppl).79-83.

305. Koc R. K., Akdemir, H., Karakucuk E. I., Oktem I. S., and Menku A., 1999. Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 37, 29-32.
306. Sestili P., Guidarelli A., Dacha M., Canton O., 1998. Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Rad Biol & Med*, 25(2): 196-200.
307. Vasilyeva O. V., Lyubitsky O. I., Klebanov G. I., 2000. Effect of the combined action of flavonoids, ascorbate and alpha-tocopherol on peroxidation of phospholipid liposomes induced by Fe²⁺ ions. *Membr Cell Biol*, 14:47-56.
308. Koyu A., Naziroglu M., Ozguner F., Yilmaz H. R., Efsan U.z., Cesur G., 2005. Caffeic Acid Phenethyl Ester Modulates 1800 MHz Microwave-Induced Oxidative Stress in Rat Liver. *Taylor & Francis.*, 24. 135-142.
309. Lopez-Lazaro M., Martin-Cordero C., Ayuso M. J., 2000. Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poison. *Z Naturforsch*, 55 (11-12), 898-902.
310. El-Kawaka O. A., Salem T., 2003. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin Chim Ada.*, 338 (1-2). 11-16.
311. Sharma M., Pillai K. K., Husain S. Z., Giri D. Z., 1997. protective role of prpolis against alcohol carbon tetra-chloride-duced hepatotoxicity in rats. *IPS*, 29(2): 76-81.
312. Luo J., Shi R., 2005. Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem*, 46: 243-252.
313. Bhaumik S, Anjum R, Rangarai N, Pardhasaradhi BV, Khar A., 1999. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS Lett*; 456: 311-314.
314. Costantini P., Chernyak B. V., Petronilli V., Bernardi P., 1996. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem*, 271: 6746-6751.
315. Stay G. P., Clarkes S. J., Halestrap A. P., 2002. Role of critical thiol groups on the matrix surface on the adenine nucleotide translocase in the mechanism of mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J*, 367: 541-548.
316. Zoratti M., Szabo I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta Biophys*, 1241: 139-176.
317. Kowal-touski A. J., Castilho R. F., Vercesi A. E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 495:12-15.
318. Bachmann, E., and Zibinden, G., 1979. Effect of antidepressant and neuroleptic drugs on respiratory function of rat heart mitochondria. *Biochem. Pharmacol*, 28. 3519-3524.

319. Lahouel M., Ouadi O., Khiari N., 1998. Effets hépatique et hématologique du paracétamol. *Saïdal info*, (7): 60-66.
320. Sagara Y., Dargusch R., Chambers D., Davis J., Shubert D., Maher P. 1998. Cellular mechanisms of résistance to chronic oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 24:1375-1389.
321. Hewawasam R. P., Jayatilaka K. W., Pathirana C., et Mudduwa L. B., 2004. Hepatoprotective effet of *Epales divaricata* extract on carbone tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Indian J Med Res*, 120: 30-34.
322. Kanwaljit C., Sangeeta P., Naveen T ., 2005. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacology*, 5:2.
323. El-khawaga O. A., Salem T. A., Elshal M. F., 2003. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin Chim Acta.*, 338(1-2):11-6
324. El-Khatib A. S., Agha A. M., Mahran L. G., Khayyal M. T., 2002. Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo. *Z Naturforsch*, 57(3-4): 379- 85.
325. Sharma M., Pillai K.K., Husain S. Z., Giri D. K., 1997. Protective role of propolis against alcohol carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Ind. Jur. Pharm.*, 29 (2): 76-81.
326. Semsei I., Rao G., Richardson A., 1991. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev.*, 58: 13- 9.
327. Gülinnaz A., Eser Y., Lütfiye K., Gülriz M., Biltan E., Fatma Z., 1998. Age-Related Alterations in Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Rat Brain. *Tr. J. of Medical Sciences*, 28. 491-494.
328. Levine S. A. and Kidd P.M., 1996. Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California Eds A. *Biocurrents division*.
329. Pigeolet E. and Remacle J. 1991. Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 191-195.
330. Bansal M. P., Vipin B., Ashwani K., 2001. Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. *BMC Biochemistry*, 2: 14.
331. Mena P., Maynar M., Gutierrez J.M., 1991. Erythrocytes free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. *Int J. Sports Med.*, 12:563-566.

332. Paul S. B., Stanley B. D., Dale A. P. and Victor D. U., 2002. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Rad Biol Med*; 32: 1220-1228.
333. Komatzu M., and Himaratzu., 2000. The efficacy of an antioxydant cocktail lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in the aged rat brain and DNA damage in iron induced épileptogenic foci. *Toxicol*, 148:143-148.
334. Cui X., Dai X. G., Li W. B., Zhang B. and Fang Y. Z., 2000. Effect of Lu-Duo-Wei capsules on superoxyde dismutase activity and contents of malondialdehyde and lipofusin in the brain of housefly. *Am.J. Chin. Med.*, 28:259-262.
335. Zaidi S. M., Banu N., 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta*, 340(1-2): 229-33.
336. Da Sliva E. L., Piskula M. K., Yamamoto N., Moon J. H., Terao J., 1998. Quercetin metabolites inhibit copper ion induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett* 430: 405-8.
337. Kumazawa S., Shimoi K., Hayashi K., Ishii T. and Hamasaka T., 2004. Identification of metabolites in plasma and urine of Uruguay propolis- treated rats. *J Agric Food Chem*, 52: 3083-3088.
338. Chia-Nan C., Meng-Shih C., Chia-Li W. and Jen-Kun L., 2004. Comparaison of radical scavenging activity, cytotoxic-effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evid Based Complement Alternat Med*; 1: 175-185.
339. Crespy V., Morand C., Besson C., Manach C., Denigne C., and Remesy C., 1999. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol*, 277G: 120- 126.
340. Ross J. A., and Kasum C. M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Ann Rev Nutr*, 22: 13-34.

EFFET DES FLAVONOÏDES DE LA PROPOLIS ALGERIENNE SUR LE STRESS OXYDATIF MITOCHONDRIAL

RESUME

La mitochondrie a un rôle capital dans la physiopathologie de nombreuses maladies et dans la toxicité des médicaments anticancéreux dont le mécanisme suggéré est la génération de ROS et le déclenchement des processus apoptotiques, limites majeures des traitements des cancers. Les propriétés antioxydantes et anticancéreuses des flavonoïdes de la propolis ont été mises en évidence, cependant à ce jour leurs effets à long terme et leurs interactions avec les fonctions mitochondriales et avec le processus d'apoptose restent obscurs. Notre étude réalisée sur des rats albinos, traite l'effet de l'extrait éthanolique et des aglycones flavoniques de la propolis sur les fonctions mitochondriales *in vitro*, *in vivo* à long terme ainsi que leur effet préventif et curatif contre le stress induit par la doxorubicine. *In vitro*, les deux extraits montrent un effet antioxydant et antiradicalaire concentration dépendant et mieux que celui de la quercétine. L'extrait éthanolique et les aglycones flavoniques de la propolis diminuent la production de l'anion superoxyde par le complexe III de la chaîne respiratoire, et 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 l'ouverture du PTP et le gonflement mitochondrial. Ces extraits sont bien tolérés et dénués de tout effet prooxydant *in vivo* à long terme mais plutôt maintiennent et améliorent l'équilibre de la balance antioxydant-prooxydant. La doxorubicine à la dose de 10 mg/kg par voie IV est responsable d'une toxicité hépatique par son effet prooxydant. Par contre l'administration des flavonoïdes de la propolis par voie orale à la dose de 100mg/kg pendant 1 mois avant ou après le traitement médicamenteux, annule ces effets toxiques, ce qui prouve leur efficacité préventive et curative. Les flavonoïdes et les polyphénols en général semblent agir par la protection de la cellule et la mitochondrie d'une part, par piégeage de ROS et inhibition de leur synthèse et d'autre part, par protection et renforcement des capacités antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques.

Mots clés : Flavonoïdes, mitochondrie, doxorubicine, prooxydant, antioxydant, effet à long terme, préventif, curatif, PTP, gonflement mitochondrial, rat.

SUMMARY

The mitochondrion has a capital role in the physiopathology of many diseases and the toxicity of the anti-cancer drugs whose suggested mechanism is the generation of ROS and the initiation of the apoptotic processes, major limiting of the treatments of cancer. The antioxydant and anti-cancer properties of the flavonoids propolis were highlighted, however to date their long-term effects and their interactions with the mitochondrial functions and the apoptotic process remain obscure. Our study treats the effect of the ethanolic extract and the flavonic aglycones of propolis on the mitochondrial functions *in vitro*, *in vivo* in the long run like their preventive and curative effect against doxorubicine induced stress. *In vitro*, the two extracts show an antioxydant and antiradicalaire concentration depending effect which is better than the quercetin. The ethanolic extract and the flavonic aglyconic of propolis decrease the production of the superoxyde anion by respiratory chain complex III, and the rate of cytosolic and mitochondrial MDA, increase the enzymatic activity of the mitochondrial and cytosolic SOD, CAT as well as the rate of the glutathione, and in end inhibit opening of the PTP and mitochondrial swelling. These extracts are well tolerated and stripped of any *in vivo* prooxydant effect in the long term but rather improve antioxydant-prooxydant balance. Doxorubicine with the amount of 10 mg/kg by way IV is responsible for a hepatic toxicity by its prooxydant effect. On the other hand the oral administration of propolis flavonoids at the amount of 100mg/kg during 1 month before or after the medicamentous treatment, cancels these toxic effects, which proves their preventive and curative effectiveness. The flavonoids and the polyphenols in general seem to act by the protection of the cell and mitochondrion on the one hand, by scavenging ROS and inhibition of their synthesis and other by, by protection and reinforcement of enzymatic and non enzymatic antioxydant capacities.

Key words : Flavonoids, mitochondrion, doxorubicine, prooxydant, antioxidant, long term effect, preventive, curative, superoxyde anion, PTP, mitochondrial swelling, rat

ملخص

الميتوكوندري دور محوري في فزيولوجيا العديد من الأمراض وكذا في سمية الأدوية المضادة للسرطان من خلال تخليق الجذور الأكسجينية الحرة وتخفيز الموت الخلوي المبرمج، تحديات كبرى لعلاج داء السرطان. من جهة أخرى الفعالية المضادة للسرطان والمضادة للأكسدة للفلافونويدات الدنج، أظهرتها دراسات عدة، غير أن تأثير هذه المواد الفعالة على المدى البعيد، وتداخلاتها مع الوظائف الميتوكوندرية والموت الخلوي المبرمج لا تزال غامضة. دراستنا الملحزة على فئران التجارب البيضاء تعالج تأثير المستخلص الإيثانولي والفلافونويدات الألكسرية للدنج على الوظائف الميتوكوندرية داخل خلويها على المدى البعيد، خارج خلويها، بالإضافة إلى تغيير التأثير الوقائي والعلاجي لهذين المستخلصين ضد سمية الدوكسوروبين. الدراسة خارج الخلوية، أظهرت أن للمستخلصين فعالية مضادة للأكسدة وأسرة الجذور الحرة، هذه الفعالية تتناسب طرذا مع تركيز المواد الفعالة. وهذا من خلال تقليب إنتاج الميتوكوندري للمبتلة التنفسية للميتوكوندري لجذور فوق البيروكسيد، تقليب مستوى الملونديالدهيد الميتوكوندري والسيروزولي، زيادة النشاط الأنزيمي لأنزيمات السوبرأكسيد دسمتاز والكاتالاز السيروزولي والميتوكوندري بالإضافة إلى تثبيط فتح PTP وتثبيط الانتفاخ الميتوكوندري. هذين المستخلصين لم يبدوا أي سمية على المدى البعيد، الدوكسوروبين بجرعة 10 ملغ/كغ سبب تسمما كبديا مولدا للأكسدة، غير أن إضافة الفلافونويدات بتركيز 100 ملغ/كغ قبل أو بعد إعطاء الدواء تفي هذه السمية، مما يؤكد المفعول الوقائي والعلاجي لهذين المستخلصين. الفلافونويدات ومتعددات الفينول بصفة عامة تؤثر عن طريق حماية الميتوكوندري والخلية، من جهة بواسطة الفعالية الأسرة للجذور الحرة وتثبيط ابتلعها، ومن جهة أخرى بحماية وتقوية التدرجات الدفاعية الأنزيمية واللاأنزيمية.

الكلمات المفتاحية : الفلافونويدات، الميتوكوندري، الدوكسوروبين، مواد للأكسدة، مضاد للأكسدة، التأثير بعيد المدى، الوقائية للعلاج، الانتفاخ الميتوكوندري، PTP، جرد.