

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN BIOLOGIE

OPTION : *PHYTOPHARMACOLOGIE*

THEME

Effet des rhizomes du *Zingiber officinalis* sur le stress mitochondrial hépatique chez le rat *in vitro*.

Hanane Nadia BOUSSENANE

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT : Dr LAHOUEL Mesbah
RAPPORTEUR : Dr LEGHOUCHI Essaid
EXAMINATEUR : Dr YAHIA ABDELWAHAB
EXAMINATEUR : Dr KACEM Mourad

MC (Université de Jijel)
MC (Université de Jijel)
MC (Université Oum Elbouaki)
MC (Université ES-SENIA Oran)

2006

جامعة جيجل
المكتبة المركزية
T.H. 115

615/31



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN BIOLOGIE

OPTION : *PHYTOPHARMACOLOGIE*

THEME

Effet des rhizomes *du Zingiber officinalis* sur le stress mitochondrial hépatique chez le rat *in vitro*.

Hanane Nadia BOUSSENANE

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT : Dr LAHOUEL Mesbah
RAPORTEUR : Dr LEGHOUCI Essaid
EXAMINATEUR : Dr YAHIA ABDELWAHAB
EXAMINATEUR : Dr KACEM Mourad

MC (Université de Jijel)
MC (Université de Jijel)
MC (Université Oum Elbouaki)
MC (Université ES-SENIA Oran)

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu, le Tout- Puissant, qui m'a aidé à réaliser ce travail.

Ce travail a été effectué au laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie de la faculté des sciences de l'université de Jijel.

Mes premiers remerciements reviennent au Dr. LEGHOUCI Essaid, maître de conférences à l'Université de Jijel et directeur de laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie, Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour la confiance que vous m'avez témoigné en m'accueillant dans votre laboratoire, je vous remercie également pour le temps consacré pour mettre à ma disposition tous les moyens nécessaires pour l'avancement et l'aboutissement de ce travail, votre rigueur scientifique, votre esprit critique et votre soutiens dans les moments les plus difficiles malgré vos nombreuses obligations, merci pour l'opportunité d'avoir accepté de diriger ce travail.

A Dr. Lehouel Mesbah maître de conférences à l'Université de Jijel, je vous remercie pour votre écoute et votre soutiens permanent tout au long de la réalisation de ce travail, auquel vous avez participé tant par vos conseil techniques que par votre aide lors de la rédaction. Votre grande expérience dans le domaine du stress oxydatif a permis de mener à bien ce travail, est aujourd'hui l'occasion de vous exprimer mes sincères remerciements.

Un grand merci d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie vivement le Dr. YAHIA Abdelouahab, maître de conférences au Centre Universitaire d'Oum El Bouaghi, d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vigoureusement le Dr. KACEM Mourad maître de conférences à l'Université ES-SENEA d'avoir accepté de juger mon travail.

Un immense merci à tous mes très chers enseignants, qui m'ont enseigné depuis mon enfance.

Un méga gigantesque merci à mes très très chères amies et collègues de laboratoire : Smisma, Mouni, Lulu, Widad, Hassiba, Afaf, Wassila, Nafila, Samia et Nadia, aussi bien pour leur amitié que pour leur fidélité et leur soutien, qui ont grandement contribué à entretenir un climat de confiance qui s'est avéré essentiel à mon bien-être au laboratoire. Mes remerciements s'adressent aussi à Tarek, mon collègue de laboratoire, qui m'a beaucoup aidé.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à Massika et aux ingénieurs de laboratoire : Yahia, Moussa, Ziad, Soumia et Assia, pour leur précieuse aide, leur patience mais surtout leur gentillesse.

Enfin, je remercie profondément ma précieuse famille et mes chères amies à la fois pour leur soutien infatigable, leur patience admirable et leur affection continuelle.

Hanane Nadia

Introduction	1
<i>I. Rappels bibliographiques</i>	
1. La mitochondrie	3
1-1. historique	3
1-2. définition et organisation de la mitochondrie.....	4
1-2-a. la membrane externe	4
1-2-b. la membrane interne	4
1-2-c. la matrice	4
1-3. structure de la chaîne respiratoire	5
• Complexe I: NADH- Ubiquinone oxydoréductase.....	5
• Complexe II : Succinate- ubiquinone oxydoréductase.....	5
• Complexe III : Ubiquinol cytochrome c réductase.....	5
• Complexe IV : Cytochrome c oxydase.....	6
• L'ATP synthase: F0F1 –ATP synthase.....	6
2- la mitochondrie source du stress oxydatif	7
2-1. définition du stress	7
2-2. Sources des espèces réactives de l'oxygène	8
2-2 –a. les sources endogène	8
• Le cytochrome b ₅ réductase	9
• Monoamine oxydase	9
• Dihydroorotate déshydrogénase	9
• Succinate déshydrogénase	9
• Glycérol -3 –phosphate déshydrogénase.....	10
• Aconitase	10
• Le complexe de l'alpha cétooglutarate déshydrogénase	10
• Le complexe I	10
• Le complexe III et le cycle Q	11
2-2-b. les sources exogènes.....	12
2-3. cibles cellulaire des ERO	13
2-3- a. effets des ERO sur la mitochondrie	13

2-3- b. effet sur l'ADN	14
2-3- c. effet sur les lipides	14
2-3- d. effet sur les protéines.....	15
2-4 systèmes antioxydants.....	15
2-4-a . les antioxydants non enzymatique	15
1) Glutathion (GSH) m.....	15
2) Thioredoxines (Txn).....	15
3) Métallothionéines (MT).....	16
4) Vitamines A, C, E	16
2-4-b.les antioxydants enzymatiques	16
1. Super oxyde dismutase (SOD).....	16
2. Catalase (CAT):	17
3. Glutathion peroxydases (GPX).....	17
3. la mitochondrie et l'apoptose.....	18
3-1.Characteristique générales de l'apoptose.....	18
3-2. les différentes voies de l'apoptose.....	18
3-2-1. la voie intrinsèque de l'apoptose.....	18
3-2-2-a. Voie mitochondriale caspase-dépendante.....	21
3-2-2-b. Voie mitochondriale caspase-indépendante.....	22
3-2-3.La voie extrinsèque de l'apoptoses (voie des récepteurs de mort).....	23
4-les flavonoides contre le stress mitochondrial	25
4-1. définition:.....	25
4-2. Structure chimique et classification.....	25
4-3. Distribution et localisation.....	27
4-4. Propriétés des flavonoides.....	28
4-5. Les flavonoides comme antioxydant.....	29
4-5-1. Inhibition enzymatique:.....	29
4-5-2. Chélation des ions métalliques.....	30
4-5-3. Piégeage des radicaux libre:.....	31
4-5-4. Relation Structure –Activité antioxydante	32
4-6. Propriétés prooxydantes des flavonoïdes	33
4-6-1. Autres ctivités biologiques des flavonoides.....	33
4-6-2. Effet anti-inflammatoire:.....	34

4-6-3. Effet anti-ulcereux:.....	34
4-6-4. Effet anticancereux.....	34
4-7. Le gingembre	35
4-7-1. Définition	35
4-7-2. Composition chimique	36
4-7-3. Propriété pharmacologique	36
II. Matériel et méthodes	38
I Matériel végétal	38
1-1. préparation des extraits	38
a- préparation de l'extrait brut	38
b- Affrontement :.....	38
1-2. Analyse chimique des extraits des rhizomes du gingembre.....	39
• Chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait éthanolique des rhizomes du gingembre	39
• Chromatographie sur couche mince de la phase acétate d'éthyle des rhizomes du Gingembre (CCM des hétérosides flavoniques)	40
• Chromatographie sur couche mince de la phase éther diethlique des rhizomes du gingembre (CCM des aglyconnes flavoniques)	40
1-3. Préparation des différentes dilutions.....	
2- Sacrifice des animaux et prélèvement du foie	41
3- Evaluation de l'activité antioxydante des rhizomes du Gingembre <i>in vitro</i>	41
3-1. Isolement des mitochondries du foie	41
3-2. préparation de la matrice mitochondriale	42
3-3. préparation de la fraction cytosolique	42
3-4. dosage des protéines	43
3-5. Test de l'effet scavenger des extraits, vis à vis du radical libre stable DPPH.....	43
3- 6. Production de l'anion superoxyde	44
3-7. dosage du MDA	44
3-8. Dosage de l'activé enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase	45
3-8-1. Dosage de la SOD	45
a. Principe de la méthode :.....	45

b. Estimation de la SOD	45
3-8-2. dosage de la catalase	46
a- le principe	46
b- estimation de l'activité de la catalase	46
3-9. la mesure du gonflement mitochondrial	46
Evaluation statistique.....	47
III. Résultats et interprétation	48
1-le rendement du gingembre.....	48
2-Chromatographie sur couche mince.....	49
3-Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique du gingembre, des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques du Gingembre <i>in vitro</i>	50
3-1. Evaluation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre	51
3-2. Evaluation de la production mitochondrial de l'anion super oxyde.....	52
3-3. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondrial : dosage du MDA.....	54
3-4. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes.....	56
3-4-1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial et cytosolique	56
3-4-2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique	60
3-5.Evaluation du gonflement mitochondriale.....	63
IV. Discussion	68
V. Conclusion	73
Références bibliographiques	75
Annexes	91

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
MDA	Malondialdehyde
Myx	Myxothiazol
NADH	Nicotinamide-Adénine-Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide-Adénine-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
UCP_n,	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 TABLEAUX

Tableau 1: Principaux ERO.....	8
Tableau 2: Sources alimentaires des flavonoïdes.....	28
Tableau 3. Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes	40
Tableau 4. Comportement chromatographique sur couche mince de l'extrait éthanolique des rhizomes du gingembre.....	49
Tableau 5. Comportement chromatographique sur couche mince des aglycones flavoniques des rhizomes du Gingembre.....	49
Tableau 6. Comportement chromatographique sur couche mince des hétérosides flavoniques des rhizomes du Gingembre.....	50
Tableau 7. Variation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre vis-à-vis du radical libre D PPH° <i>in vitro</i>	51
Tableau 8: Variation de la production de l'anion super oxyde par les mitochondries hépatiques de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différente concentration <i>in vitro</i>	53
Tableau 9. Variation des taux du MDA mitochondrial généré suite à la peroxydation lipidique induite <i>in vitro</i> par le FeCl ₂ /FeCl ₃ en présence de différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques du Gingembre.....	54
Tableau 10. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différente concentration molaire <i>in vitro</i> :.....	56
Tableau 11. Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différente concentration molaire <i>in vitro</i> :.....	57
Tableau 12. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondrial hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations molaires <i>in vitro</i>	60
Tableau 13. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations molaires <i>in vitro</i> :.....	61
Tableau 14. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique du Gingembre <i>in vitro</i>	64
Tableau 15. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations molaires de l'extrait éthanolique de la propolis <i>in vitro</i>	64
Tableau 16. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations molaires des extraits éthanoliques du Gingembre et de la propolis en association <i>in vitro</i>	65
Tableau 17. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations molaires des aglycones du Gingembre <i>in vitro</i>	66

Tableau 18. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations molaires des hétérosides flavoniques du Gingembre *in vitro*

LISTE DES FIGURES

Figure 1: ultra structure de la mitochondrie.....	3
Figure 2: la chaîne respiratoire mitochondriale.....	6
Figure 3: Cycle Q ; A représente le mécanisme de génération de $O_2^{\cdot -}$ dans le complexe III. B site d'action des inhibiteurs fréquents de complexe III	11
Figure4 : les différentes voies métaboliques des espèces réactive de l'oxygène.....	13
Figure5 : peroxydation lipidique des ERO.....	14
Figure6 : configuration minimale du pore de transition de perméabilité membranaire mitochondrial.....	19
Figure 7 : Représentation schématique de la formation de l'apoptosome CARD : caspase recruitment domain ; Cyt c : cytochrome c.....	22
Figure8: les voies intrinsèque de l'apoptose.....	24
Figure9: Squelette de base des flavonoïdes.....	25
Figure 10: Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	26
Figure 11: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques	31
Figure 12 Piégeage des ROS ($R \cdot$) par les flavonoïdes.....	32
Figure 13 Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	33
Figure 14: les rhizomes du Gingembre.....	35
Figure 15: le rendement de l'extrait brut du Gingembre en phase n- butanol, acétate d'ethyl et éther di ethyl.....	48
Figure 16. Variation de l'effet scavenger de l'extrait etanolique ,des Aglycones flavonique et des Heterosides flavoniques du Gingembre à différente concentration molaire vis-à-vis du radical libre DPPH ^o in vitro.....	51
Figure17. Variation de la production de l'anion super oxyde par les mitochondries hépatiques de rat, en présence de l'extrait éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différente concentration molaire in vitro.....	52
Figure 18. Variation de la production de l'anion super oxyde par les mitochondries hépatiques de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différente concentration molaire in vitro	53
Figure 19. 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 des extraits éthanoliques du Gingembre et de la propolis et de leur association.....	55
Figure 20. 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 des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques du Gingembre.....	55
Figure 21. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différente concentration molaire in vitro.....	57
Figure 23. Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différente concentration molaire in vitro.....	58
Figure25. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondrial hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différente concentration molaire in vitro.....	60

Figure 26. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondrial hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique ,des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations molaires in vitro	61
Figure 27. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différente concentration molaire in vitro.....	62
Figure 28. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations molaires in vitro.....	62
Figure 29. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations molaires des extraits éthanoliques du Gingembre et de la propolis et de leur association in vitro.....	65
Figure 30. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations molaires des aglycones et des hétérosides flavoniques du Gingembre in vitro.....	67

Introduction

Introduction

L'organisme produit quotidiennement des radicaux libres, composés très réactifs et nécessaires à des mécanismes vitaux, cependant, la surproduction des radicaux libres, est néfaste pour l'organisme. Ils endommagent de nombreux composants cellulaires aussi divers que les protéines, les lipides ou l'ADN, et sont responsable de plusieurs pathologies y compris la maladie du siècle, le cancer.

La mitochondrie, cet organe cellulaire de l'ordre des microns est la source principale de la production de ces radicaux libres à travers les complexes de la chaîne respiratoire, qui est normalement la source d'énergie dans l'organisme. Elle est donc responsable de plusieurs maladies.

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. Les capteurs de radicaux libres ont pour rôle de stopper ce processus en neutralisant ces composés très réactifs pour réduire leur nocivité. L'approche pharmacologique par l'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui au centre de recherche dans de célèbres laboratoires, la plus grande partie de leur intérêt porte sur l'étude des molécules antioxydantes.

Les flavonoïdes sont des substances très répandues dans le règne végétal, faisant partie intégrante de notre nourriture journalière, sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple; les activités anti-allergiques, antivirales et anti-inflammatoires, ces activités sont en général attribuées à leur capacité à piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation de ces radicaux. Et si aujourd'hui des études épidémiologiques ont mis en évidence les propriétés antioxydantes de ces flavonoïdes. Aucun travail, à notre connaissance, n'a été consacré aux effets des flavonoïdes des rhizomes du gingembre. 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.

Ainsi, l'objectif de notre travail consiste en l'étude de l'activité de capteur de radicaux libres, d'une série de concentrations de l'extrait éthanolique des rhizomes de *Zingiber officinalis* ainsi que celui des aglycones et des hétérosides flavoniques du *Zingiber officinalis* et cela sur des mitochondries isolées du foie de rat par l'évaluation de:

- L'activité antiradicalaire.
- Effet sur la production du radical super oxyde par le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale.
- Effet sur le gonflement mitochondrial.
- Effet sur la peroxydation lipidique induite *in vitro*.
- Effet sur l'activité des enzymes antioxydantes.

*Rappels
bibliographiques*

1. La mitochondrie

1-1. historique:

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 Palade (1952) et Sjostrand (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 [1, 2, 3,4].

1-2. définition et organisation de la mitochondrie :

La mitochondrie, est l'une des organites des cellules eucaryotes. Elle est de forme ovale, typiquement d'environ 2 μm de long et de 0.5 μm de diamètre. Les mitochondries sont souvent nombreuses qui permettent à la cellule hôte de respirer. Les études par microscopie électronique de George Palade et Fritjof Sjostrand, ont révélé que les mitochondries ont deux systèmes membranaires : une membrane externe et une membrane interne, ainsi que deux compartiments dans les mitochondries : l'espace inter membranaire et la matrice [5, 4,6].

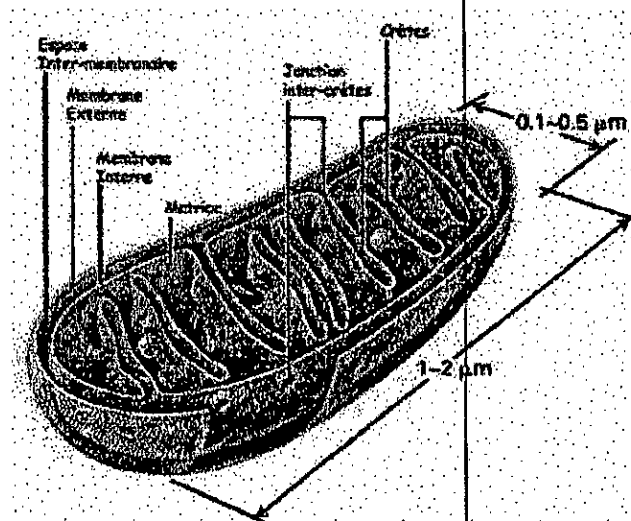


Figure 1: ultra structure de la mitochondrie. [6]

1-2-a. la membrane externe :

Au niveau de la membrane externe, on retrouve le cytochrome b5, la monoamine oxydase, la porine, protéine dévolue au transfert de petites molécules dont les masses moléculaires ne dépassent pas 2 KDa. Quatre protéines (dénommées MOM) servant de récepteurs aux protéines destinées à gagné la matrice ou la membrane interne, constituent avec les protéines GIP une parties du complexe dit de translocation permettant le transfert des protéines mitochondrial élaborées sur les ribosomes libres vers la matrice [7].

1-2-b. la membrane interne :

La membrane mitochondriale interne est singulière à plus de d'un titre : à l'inverse des autres systèmes membranaires où se sont les phospholipides qui représentent les constituant primordiaux, ce sont les protéines, ici, qui sont de très loin prépondérantes puisqu'elle constituent 80 % de la structure membranaire

La membrane mitochondriale interne, se replie pour former de nombreuses crêtes, ces crêtes augmentent considérablement sa superficie, ainsi la surface de la membrane interne est environ cinq fois supérieure à celle de la membrane externe.

La membrane interne est par nature, imperméable à presque tous les ions et molécules polaires. Une grande famille de transporteurs permet le passage de métabolites, tel que l'ATP et le citrate à travers la membrane mitochondrial interne. Les deux faces de cette membrane sont désignées par les termes de face matricielle et de face cytolitique (parce que cette dernière est librement accessible à la plupart des petits molécules du cytosol). Elle sont aussi appelées face N et P car le potentiel membranaire est négatif sur la face matricielle et positif sur la face cytosolique [8, 9, 10, 11,12].

1-2-c. la matrice :

Les protéines présentes dans la matrice mitochondrial constituent le groupe le plus abondant : elle présentent environ 60 à 70 % du contenu protéique global de la mitochondrie [13]. Ce sont avant tout :

-Les enzymes du cycle de l'acide citrique (sauf la succinodéshydrogénase qui est liée à la membrane interne).

-Le système multienzymatique qui catalyse la transformation du pyruvate en acétyle COA par décarboxylation oxydative (pyruvat déshydrogénase).

-Les enzymes de la B oxydation des acides gras, dégradant ces derniers en acétyl coenzyme A.

- Pour les mitochondries de l'hépatocyte, une partie des enzymes responsables de la biosynthèse de l'urée.
- Les enzymes et cofacteur, de l'appareil génétique.
- une dismutase et un catalase [8].

Le catabolisme des glucides, acides gras et acides aminés s'accompagne de la production d'équivalent réduits que le NADH et le FADH₂. L'oxydation de ces équivalents réduits par l'O₂ a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondrial et aboutit à la formation d'énergie [7].

1-3. Structure de la chaîne respiratoire :

Les quatre complexes qui constituent la chaîne respiratoire mitochondriale sont la résultante de l'association d'une cinquantaine de polypeptides. Chaque complexe est indépendant et contient des groupements prosthétiques engagés dans une série de réactions d'oxydoréduction. En terme de flux d'électrons les complexes sont disposés en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction.

- **Complexe I: NADH- Ubiquinone oxydoréductase.**

Le transfert initial d'électron nécessite le cofacteur équivalent réduit NADH. Ce dernier oxydé sur la face matricielle de la membrane par la NADH- deshydrogénase. Le complexe I catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l'ubiquinone, couplé à l'expulsion de protons de la matrice à l'espace inter membranaire. Le complexe I peut être inhibé par la roténone [14.15.16.17].

- **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 [12,16].

- **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 les quels les cytochromes b et c₁ et une protéines 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 [8, 18,19].

- **Complexe IV : Cytochrome c oxydase**

C'est un dimère de 320 KDa, contenant 9 polypeptides, parmi lesquels les 2 cytochromes a_1 et a_3 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' O_2 . Ce complexe catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l' O_2 en H_2O par 4 électrons. Ce transfert d'électrons est couplé à un efflux de protons vers l'espace intermembranaire. Le cyanure est un inhibiteur du cytochrome c oxydase [11,20].

- **L'ATP synthase: F₀F₁ –ATP synthase.**

L'ATP synthase couple la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ATP et de Pi et permet donc de transformer la différence de potentiel électrochimique de protons en énergie chimique. L'ATP synthase est inhibée par l'oligomycine qui bloque le transport de protons [21].

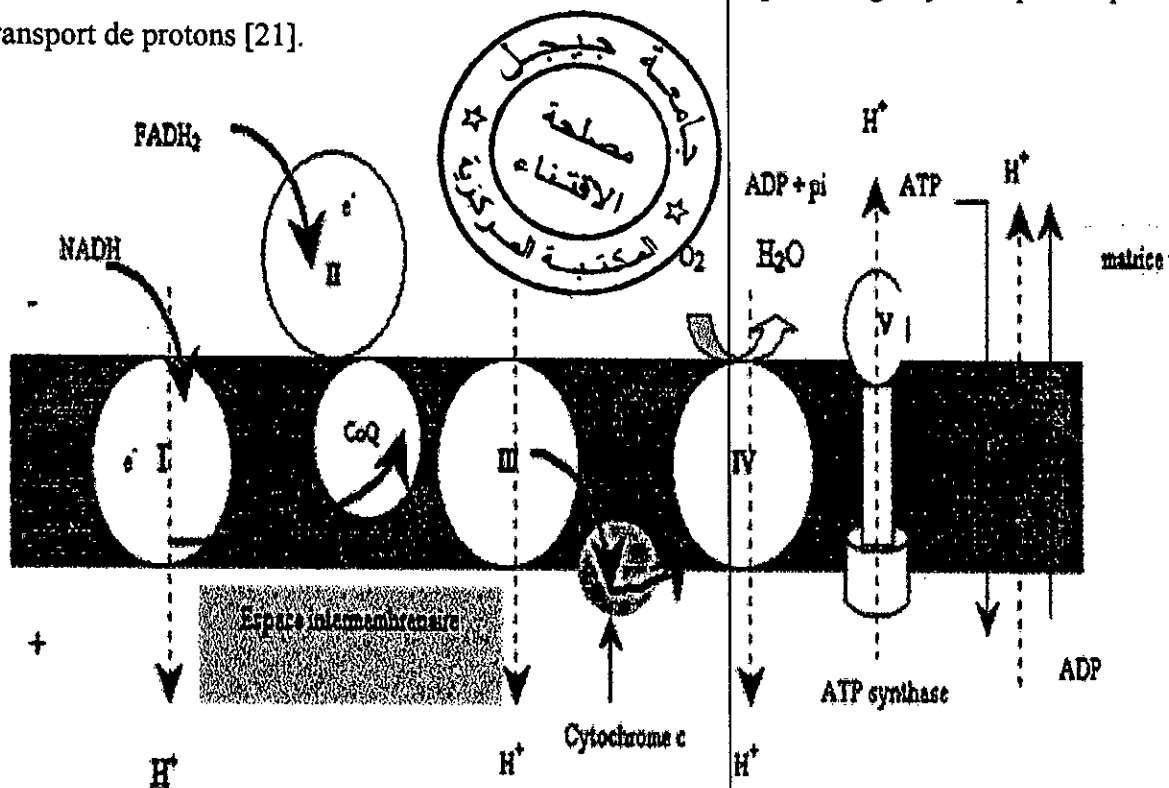


Figure 2: la chaîne respiratoire mitochondriale [11].

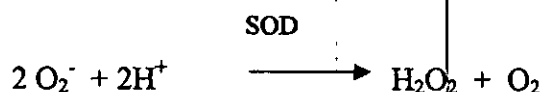
2- La mitochondrie source du stress oxydatif:

2-1. Définition du stress :

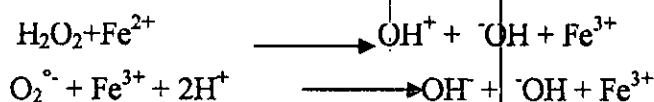
Pour définir le stress oxydant, il faut avant tout définir, ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une molécule ou un atome qui possède, sur sa couche externe, un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules [22, 23]. Les espèces réactives de l'oxygène, ERO, (en anglais: reactive oxygen species ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs [24, 25]. Les ROS sont des produits essentiels au fonctionnement cellulaire, mais pas en excès pour ne pas trop oxydé [22- 27].

Le stress oxydant est classiquement défini, comme un déséquilibre entre la production de ROS qui conduit donc à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels et les systèmes de défense [28,29]. L'appellation ROS n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène: radical super oxyde $O_2^{\cdot-}$, radical hydroxyle OH^{\cdot} , le monoxyde d'azote NO^{\cdot} , et aussi certains dérivés oxygénés réactif non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$ ainsi que l'oxygène singulier [30,31].

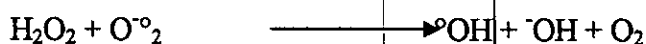
Le radical super oxyde est peu réactif, mais représente un précurseur d'espèces plus agressives. Avec l'apport d'un autre électron, il devient un ion peroxyde (O_2^{2-}), qui, à son tour, avec l'ajout de deux ions hydrogènes ($2H^+$), produit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 associé au fer ferreux, est dégradé en présence de métaux de transition sous leurs formes réduites, pour former le radical hydroxyle OH^{\cdot} par la réaction de Fenton [31].



Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut également réagir avec le radical super oxyde $O_2^{\cdot-}$ aboutissant là encore à la production du radical hydroxyle. Ce mécanisme réactionnel se nome la réaction d'Hber-Weiss.



Le monoxyde d'azote NO° , lui-même n'est pas très réactif, mais constitue un précurseur d'autres espèces plus réactives[32]. Le NO° en réagissant avec un radical super oxyde forme le peroxynitrique ONOO° espèce non radicalaire extrêmement réactif [33]. Les radicaux alkoxydes RO° se forment lors de la dégradation des peroxydes organiques. Les hydroperoxydes ROOH sont les formes hydrogénés des radicaux peroxydes et redécomposent en radicaux alcoyles. Il ne faut pas penser que toutes les espèces réactives de l'oxygène sont extrêmement toxiques, leur réactivité est très variable selon la nature de l'espèce (tableau 1).

Oxygène	$^3\text{O}_2$
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion super oxyde	$\text{O}_2^{\circ-}$
Radical hydroxyle	$\cdot\text{OH}$
Radical hydroperoxyde	HOO^\cdot
Radical peroxyde	ROO^\cdot
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^\cdot
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO
peroxynitrique	ONOO^\cdot
hypochlorite	ClO^\cdot
Pouvoir oxydant : $\text{OH}^\circ > \text{RO}^\circ > \text{HOO}^\circ > \text{ROO}^\circ > \text{NO}^\circ$	

Tableau 1: Principaux ERO [24].

2-2. Sources des espèces réactives de l'oxygène :

2-2 -a. les sources endogènes :

Les cellules possèdent un grand nombre de systèmes enzymatiques responsables de la production des ERO. Cette production constitutive d'ERO est réalisée dans la plupart des compartiments cellulaires. La production des ERO est associée à des processus physiologiques comme la production d'ATP, et la réponse inflammatoire.

La première source des radicaux libres est la **phosphorylation oxydative** au niveau de la **mitochondrie**. Au cours de la respiration cellulaire, la mitochondrie génère de l'ATP via la réduction de l'oxygène par une série d'addition d'électrons et d'ions H^+ (membrane interne de la mitochondrie). Au cours du transport électronique, il y a production de $O_2^{\cdot-}$ (complexe 1 : NADH déhydrogénase et complexe 3 : cytochrome c-coenzyme Q oxydoréductase) qui est ensuite convertit en H_2O_2 ou OH^{\cdot} [34]. Lors des réactions de transfert d'électrons, la fuite des électrons peut conduire à l'oxydation de l'oxygène moléculaire. Les ERO produits par la respiration cellulaire dans les conditions physiologiques correspondant à moins de 5% de O_2 rentrant dans la chaîne respiratoire.

Il est estimé que dans les conditions normales 1-4 % de l'oxygène consommé est incomplètement réduit en superoxyde [17.35. 36.37]. Dans la mitochondrie, il existe neuf sites responsables de cette production, ils sont ubiquitaires dans les mitochondries des mammifères, mais leurs expression et capacité de production différent selon les tissus et les cellules [29]. Mais le complexe I et III de la chaîne sont considérés comme étant les principaux sites de cette production [37].

- **Le cytochrome b_5 réductase**

Le cytochrome b_5 réductase oxyde le NADPH et réduit le cytochrome b_5 , elle peut ainsi réduire le radical ascorbyl, et de ce fait, elle intervient dans la génération de l'ascorbate. Elle peut produire l'anion superoxyde avec une vitesse de 300 nmol/mg de protéines [29].

- **Monoamine oxydase**

Catalyse l'oxydation des amines en l'accompagnant de la libération de H_2O_2 avec un potentiel générateur qui peut dépasser celui du complexe III inhibé par l'antimycine. Elle peut être la source majeure de H_2O_2 lors de l'ischémie [38.39].

- **Dihydroorotate déshydrogénase**

Convertit le dihydroorotate en orotate, étape dans la synthèse des nucléotides pyrimidiques. Elle peut produire tant le peroxyde d'hydrogène que l'anion superoxyde [29].

- **Succinate déshydrogénase**

Dans les particules submitochondriales oxydant le succinate, la production des ROS par la succinate déshydrogénase peut être inhibée par son inhibiteur, le carboxin. Le mécanisme par lequel cette enzyme produit les ROS dans les mitochondries intactes reste obscur [40].

- **Glycérol -3 -phosphate déshydrogénase**

Une enzyme à FAD intervenant dans le métabolisme lipidique et la navette glycérol phosphate. La production de peroxyde d'hydrogène peut s'effectuer par l'enzyme elle-même ou par le complexe I par transfert reverse des électrons [29,41].

- **Aconitase**

L'enzyme catalyse la conversion du citrate en isocitrate dans la matrice mitochondriale. Durant son inactivation par le superoxyde, par oxydation de son groupement Fe-S et libération du fer, elle produit le radical hydroxyle [35,42].

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

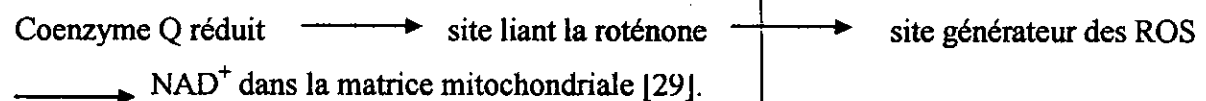
Deux études récentes ont montré que le complexe est capable de produire le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde. Il apparaît que la source de cette production dans le complexe est la sous unité dihydro-lipoamide déshydrogénase [29-44].

- **Le complexe I**

Plusieurs expériences ont prouvé l'implication du complexe I dans la production des ROS dont le site exact de cette production, malheureusement, reste partiellement obscure [45,46]. Des études ont proposé que ce dernier est localisé entre le groupement flavine et le site liant la roténone, tandis que d'autres ont suggéré qu'il est le groupement flavine lui-même [47]. Les données globales dans ce sujet, supportent l'opinion que les ROS sont très probablement produites par l'un des centres Fe-S et que le centre N-1a Fe-S est le candidat puissant [47]. En présence des substrats NAD⁺- liés comme le malate, pyruvate, le complexe I génère du superoxyde à partir du NADH lorsqu'il est inhibé par la roténone, par un mécanisme potentiel membranaire indépendant [48].

Le complexe I peut aussi produire du super oxyde à partir de l'ubiquinol ; le processus implique le transfert reverse des électrons à partir du coenzyme Q vers le NAD⁺ au lieu de l'oxygène par un mécanisme potentiel membranaire dépendant [35]. Ce processus est inhibé par la roténone qui bloque le passage des électrons entre l'ubiquinone et le centre N-2 Fe-S du complexe ainsi que par les agents découpleurs et l'acidification du milieu [29,49].

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



Puisque sept polypeptides de complexe I sont codés par l'ADN_{mt}, ce complexe est plus exposé aux effets radicalaires que les autres complexes de la chaîne respiratoire en augmentant ainsi la synthèse des ROS [50].

• Le complexe III et le cycle Q

En présence d'antimycine A, le complexe III devient un générateur robuste du superoxyde qui est ensuite dismuté pour donner le H₂O₂. La source de O₂^{-•} dans le complexe peut être le cytochrome 566 (cyt₅₆₆), le radical ubisemiquinone ou le centre Riesk Fe-S [16, 51].

De nombreux travaux ont constaté que cette production est fort probablement attribuée à la formation d'un radical ubisemiquinone instable, qu'il n'a été jamais détecté, au centre Q_o[52].

L'un des deux électrons cédés par l'ubiquinole au complexe III est capturé par le centre Fe-S et cédé au cyt c₁ puis au cyt c, l'autre électron s'engage dans le cycle Q ; il atteint via les cyt b₅₆₆ et b₅₆₂ la face matricielle du complexe, où il est capté par une molécule de COQ pour donner le radical ionisé COQ^{-•} qui peut céder son électron à l'oxygène moléculaire pour donner naissance au superoxyde [35].

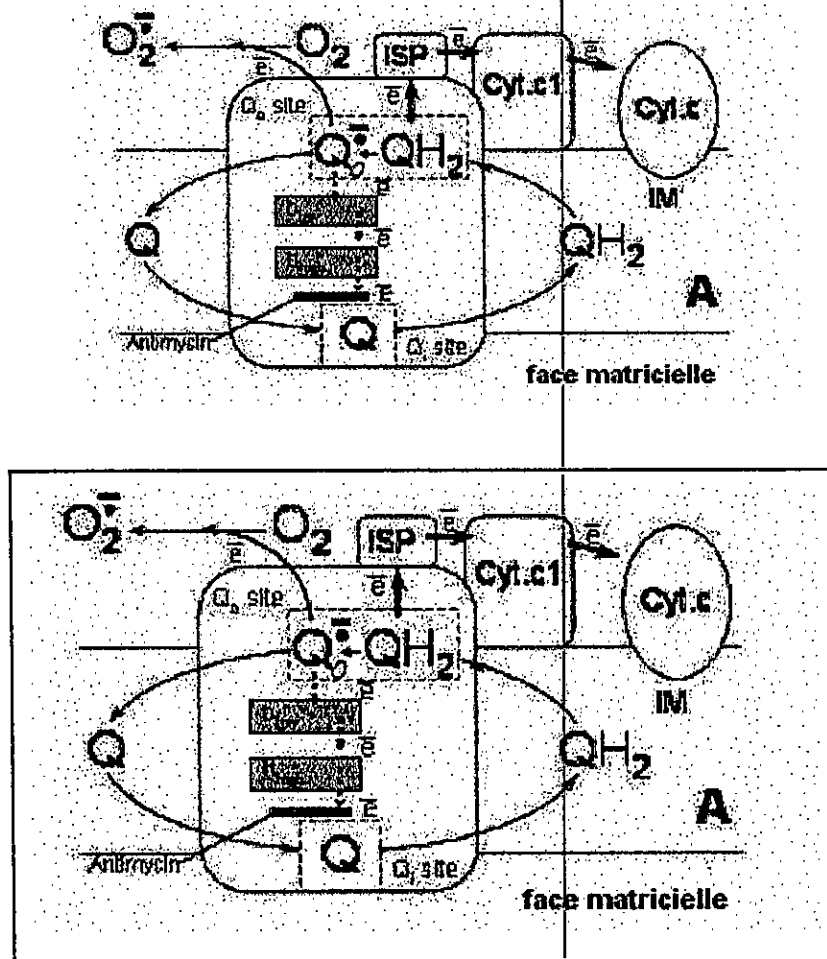


Figure3 : Cycle Q ; A représente le mécanisme de génération de O₂^{-•} dans le complexe III. B site d'action des inhibiteurs fréquents de complexe III [29].

Il existe plusieurs substances qui agissent sur le cycle soit par inhibition ou par induction ; l'antimycine A prévient le transfert de deuxième électron vers le centre Q_1 en induisant l'accumulation du radical semiquinone au centre Q_0 , cependant les inhibiteurs de ce dernier inhibe la formation de cet semiquinone, soit par interruption de l'attachement de QH_2 au centre Q_0 (myxothiazol) ou par blocage de transfert du premier électron vers la protéine Fe-S. (ISP ; sulfure proteine ou Riesk proteine). Parmi les substances naturelles, le trans-veratrol prévient la production des espèces réactives de l'oxygène par inhibition du complexe III et plus précisément par interaction avec le cycle Q [29-53].

In vivo, il apparaît que le complexe I constitue la source majeure des espèces réactives de l'oxygène par transfert reverse des électrons, parcequ'en absence d'antimycine A, la formation de superoxyde par le complexe III est minimale [54]. L'étude structurale du complexe III par les rayons X révèle que le centre O du complexe est orienté vers l'espace intermembranaire, en suggérant que ce complexe libère son superoxyde dans le cytoplasme au lieu de la matrice mitochondriale. Cependant, le centre Fe-S ainsi que le groupement flavine du complexe I sont orientés vers la face matricielle de la membrane interne, ce qui prouve la libération de superoxyde dans la matrice mitochondriale [55.56].

Les cytochromes p-450, enzymes localisées dans le réticulum endoplasmique, produisent O_2^- et/ou H_2O_2 en agissant sur des substrats endogènes (stéroïdes) et sur des substrats exogènes (Détoxification des xéno biotiques). Les cyclooxygénase et les lipooxygénase membranaires sont deux enzymes qui appartiennent à la voie de synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxane et leukotriène). Ces métabolites sont impliqués dans la transmission des informations entre les cellules et notamment au cours des processus inflammatoire. Ces deux voies de synthèse sont constituées d'une série d'étapes d'oxydation, impliquant des intermédiaires radicalaires [57].

2-2-b. les sources exogènes:

Une production d'ERO peut être engendrée par l'exposition à divers agents environnementaux physique ou chimiques. Les rayonnements ionisant, les rayons UV, la chaleur et les ultrasons font partie des sources physiques. L'exposition exogène des cellules au peroxyde d'hydrogène, au peroxinitrique ou à des composés générateurs d'ERO comme le paraquat (herbicides) entraîne la production des ERO tel que l'anion superoxyde dans le cas du paraquat. Le métabolisme des agents antitumoraux tels que l'adriamycine ou la bléomycine constitue également une source de production des ERO [58.59.60].

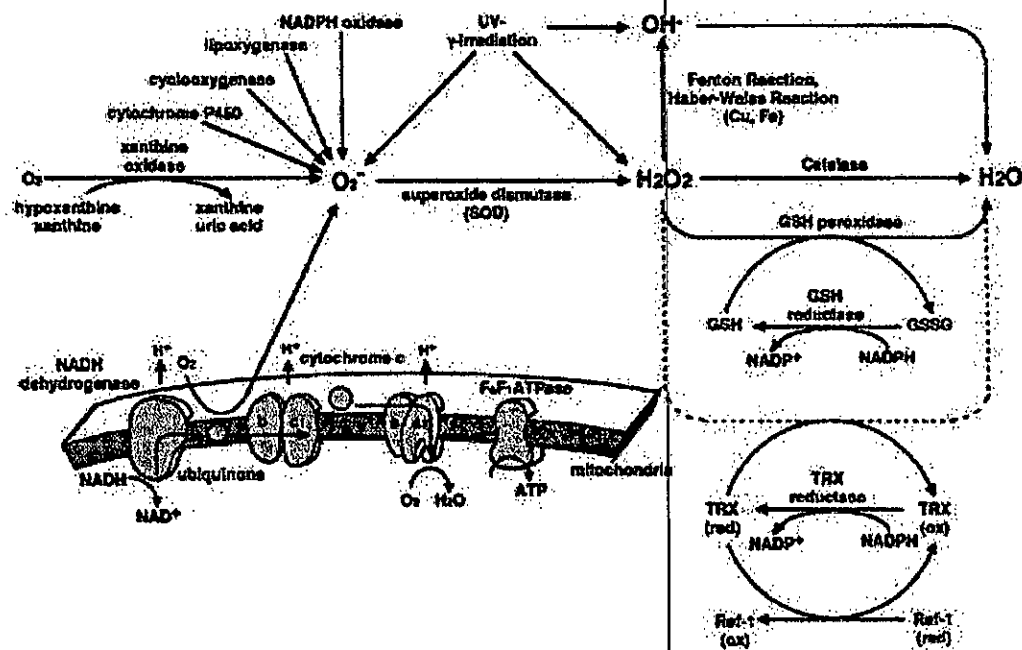


Figure 4: les différentes voies métaboliques des espèces réactives de l'oxygène [58].

2-3. Cibles cellulaires des ERO :

2-3- a. Effets des ERO sur la mitochondrie :

Si la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources des ERO intracellulaires, elle est surtout la principale cible. Les ERO peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. Ainsi, l' O_2^- peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO), et produire le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui peut inhiber la chaîne respiratoire [61], et endommager différents composants mitochondriaux (complexes de la chaîne respiratoire, membrane, ADN...). En effet, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est à proximité directe de la source de production, du fait qu'il est fixé à la membrane interne. L'ADNmt est fragile car il est dépourvu d'histone et ne semble pas avoir de systèmes de réparation aussi efficaces que celui de l'ADN nucléaire (ADNn) [62,63]. Une altération de l'ADNmt pourrait donc altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire et déclencher un cercle vicieux augmentant la production des ERO. De même, une oxydation accrue des phospholipides membranaires mitochondriaux pourrait modifier le fonctionnement mitochondrial [64].

2-3- b. Effet sur l'ADN :

L'oxydation des différents constituants de l'ADN induit la formation de quatre grandes classes de lésions : les modification des bases nucleiques, les sites basiques, les pontage et les cassures de chaînes simples et double brins. Les conséquences de ces altérations seront une erreur de lecture lors de la transcription. Par ailleurs dans le cas de l'irradiation, l'atteinte de l'ADN est liée en particulier au radical hydroxyle [22,65].

2-3 -c. Effet sur les lipides :

La peroxydation lipidique est un effet majeur des radicaux libres [66]. La plupart des membranes des cellules des mammifères sont riches en acides gras poly insaturés, ou PUFAs (Poly Unsaturated Fatty Acid) et sont donc très sensibles au stress oxydant. La plupart des aldéhydes produits après lipopéroxydation sont très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Les aldéhydes les plus étudiés sont le 4- hydroxynonéal (4-HNE) et le dialdéhyde malonique (MDA) [67]. Ils réagissent avec des antioxydants comme le glutathion, augmentant le stress radicalaire, mais aussi permettant de ce fait leur détoxification. La peroxydation lipidique, lorsqu'elle n'est pas induite par un élément exogène anormal, est un phénomène physiologique naturel qui intervient dans la dégradation de nombreux métabolites cellulaires (hormones, acides gras, etc.). Certains produits de la peroxydation contribuent à l'adaptation des organismes aux conditions de l'environnement ou encore à la différenciation cellulaire.

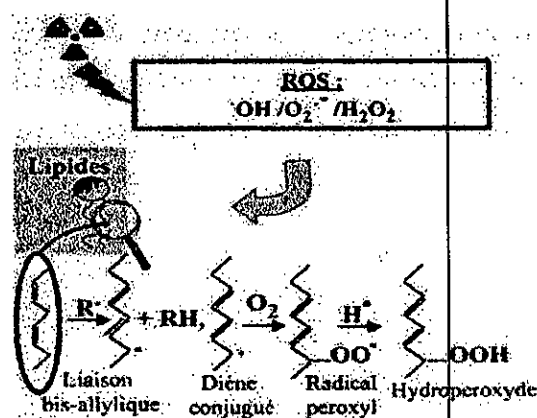


Figure5 : peroxydation lipidique des ERO [67]

2-3- d. Effet sur les protéines :

En ce qui concerne les protéines, presque tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ERO, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine et tryptophane) étant les plus sensibles. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme les réticulations intra ou inter moléculaire. Ces altérations peuvent conduire à des modifications structurales des protéines. Dans le cas d'enzymes, les modifications au niveau du site actif peuvent conduire à leur inactivation [68].

2-4. systèmes antioxydants.

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être définis comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les antioxydants cellulaires sont non enzymatiques et enzymatiques [26-70].

2-4-a. Les antioxydants non enzymatiques :

1) Glutathion (GSH) m

Cette molécule est composée de trois acides aminés. Elle est riche en soufre ce qui lui confère son rôle de piègeur de radicaux libres. Il existe des enzymes responsables de la synthèse, de la dégradation ou de recyclage du glutathion. Certaines de ces enzymes ont un rôle crucial pour la stabilisation de ce composé et le maintien de l'équilibre redox. Le glutathion oxydé (glutathion disulfide, GSSG) est réduit par la GSSG réductase. Le statut redox du couple 2 GSSG/2GSH constitue un indicateur important du statut redox cellulaire [29,71].

2) Thioredoxines (Txn)

Les thioredoxines sont de petites protéines (12 kDa) douées d'une activité intrinsèque d'oxydoréduction comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH) . Elles sont capables de réduire des ERO et de restituer leur conformation aux protéines oxydées [72] .Trois variants de la Txn sont codés par trois gènes différents. Ils ont été clonés et caractérisés : Txn1 (localisation cytosolique),Txn2 (localisation mitochondriale), SpTxn (expression spécifique au niveau des spermatozoïdes). Une fois oxydée, laTxn est réduite par la thiorédoxine réductase (TxnR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocysteine

au niveau de son site actif. La TxnR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques, du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyle en acide ascorbique.

3) Métallothionéines (MT)

Les métallothionéines sont de petites protéines d'une trentaine d'acides aminés, dont un tiers des cystéines. La première fonction décrite de ces protéines est la détoxification des métaux lourds [73]. Leur rôle comme antioxydant est démontré dans différents cas de stress oxydant [74, -77]. Les métallothionéines exercent également leur rôle anti-oxydant en chélatant les ions fer, cuivre et ainsi limite la réaction de Fenton [78].

4) Vitamines A, C, E

Les vitamines ne sont pas synthétisées par l'organisme. Leurs concentrations plasmatiques dépendent fortement de l'alimentation et des modifications du flux hépatique. On regroupe sous le terme de vitamine E la famille des tocophérols (alpha, bêta, gamma, delta). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines. La vitamine E empêche la propagation des chaînes radicalaires dans les lipides, mais n'assure aucune protection directe des protéines. En revanche, les lipides insaturés protègent les protéines en se comportant comme des piègeurs de radicaux oxygénés [79]. La vitamine C (acide ascorbique) protège efficacement les protéines sans protéger les lipides, mais intervient pour régénérer la vitamine E. La vitamine A (caroténoïde) agit de manière synergique avec la vitamine E au niveau de la membrane pour piéger les radicaux libres. Elle serait aussi capable de régénérer la vitamine E oxydée.

2-4-b. les antioxydants enzymatiques :

1) Super oxyde dismutase (SOD)

Ces enzymes sont des métalloprotéines qui assurent la dismutation de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elles assurent ainsi la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydant. Les isoformes de SODs diffèrent par la nature des ions métalliques de leur site actif (cuivre, zinc et manganèse), leur structure multimérique, leur localisation cellulaire et tissulaire. La structure du puits catalytique est très bien conservée lors de l'évolution. Elle forme un puits hydrophobe au

centre de la protéine, dont lequel glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est rendu possible par le métal situé au cœur de l'enzyme. Le gène SOD1 code pour la protéine CuZnSOD, cette protéine est un omodimère dont les sous-unités de 16 à 18 kDa fixent Cu^{2+} et Zn^{2+} . Cette isoforme est localisée dans le cytoplasme cellulaire. Le gène SOD2 code pour la protéine MnSOD, cette protéine est un homotétramère dont les sous-unités de 24 kDa fixent le Mn^{2+} et la localisation de cette protéine est mitochondriale [22,80].

La SOD mitochondriale, située exclusivement dans la matrice, permet la dismutation quasi-instantanée de $\text{O}_2^{\cdot-}$ produit au niveau de la chaîne des transport des électrons protégeant ainsi cette organite contre l'attaque des ROS [81].

2) Catalase (CAT):

La catalase possède comme cofacteur le fer et elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Cette protéine est un homotétramère de 56 kDa. Dans les cellules de mammifères, la catalase est essentiellement localisée dans les peroxysomes. Cette enzyme est présente en forte concentration dans le foie et les globules rouges [82,83].

3) Glutathion peroxydases (GPX)

Les glutathion peroxydases, ayant comme cofacteur le sélénium (Se), dégradent les hydro peroxydes d'hydrogènes (H_2O_2 , ROOH). Des glutathion peroxydases à sélénium existent dans le cytosol (cGPX), dans le plasma (pGPX), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et une iso enzyme est spécifiquement exprimée dans l'épithélium du tube digestif (GI-GPx). Elles diffèrent entre elles au niveau de leur structure, de leur spécificité de substrat, de leur localisation cellulaire et tissulaire. Ces enzymes sont, sans doute, le système majeur de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium. La protéine GPX-1 est un complexe de 4 sous-unités de 23 kDa. La protéine GPX-2 est un tétramère (sous unité de 22 kDa) localisé dans le cytosol [84,85].

3. La mitochondrie et l'apoptose:

3-1. Caractéristiques générales de l'apoptose:

Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été induit en 1972 par Kerr pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu' alors [86, 86,88]. "Apoptose" est un nom qui signifie "chute" en grec ancien et qui a été utilisé en référence à la chute des feuilles des arbres en automne, la chute des pétales de fleurs qui se fanent, une métaphore pour une mort à la fois naturelle, inéluctable et programmée [89].

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisée pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuse pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort [90]. L'apoptose joue un rôle central dans le développement et dans le maintien de l'homéostasie. Elle est impliquée dans le renouvellement tissulaire et le développement du système nerveux. Elle participe notamment à l'élimination de cellules surnuméraires, lors du développement embryonnaire. Toute anomalie de l'apoptose peut déclencher de nombreuses pathologies comme le cancer et à l'inverse un excès d'apoptose participe à l'émergence des maladies neurodégénératives [86, -92].

3-2. les différentes voies de l'apoptose

On distingue deux grandes voies de signalisation aboutissant à la mort. La première appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort [93].

3-2-1. la voie intrinsèque de l'apoptose

Depuis une dizaine d'années, il est maintenant clairement établi que la mitochondrie, organe producteur de l'énergie de la cellule (ATP), joue un rôle clé dans l'apoptose. Son intervention dans ce processus ne s'explique pas par une « simple perte de fonction » ayant pour conséquences un déficit énergétique, mais est reconnue plutôt comme un mécanisme actif s'accompagnant de profondes altérations. On observe une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale- liée à une dissipation du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$)- et la libération dans le cytoplasme de protéines apoptogènes comme le cytochrome c. Le concept du mégapore mitochondrial appelé PTP (pore de transition de perméabilité)

responsable du relargage de facteurs apoptotique a été récemment décrit. La composition exacte du PTP reste encore à déterminer. Il se composerait d'un complexe poly protéique avec des composants localisés dans les deux membranes mitochondriales (externe/ interne), dans l'espace inter membranaire et dans la matrice mitochondriale.

Le regroupement de différents travaux permet d'établir une configuration minimale au PTP qui regrouperait : la translocase des nucléotides adénylique (ANT : membrane interne), le canal anionique voltage-dépendant (VDAC, membrane externe), et la cyclophiline D (Cyp-D, matrice) (figure 5). Ces protéines coopèrent pour former un pore responsable de la transition de perméabilité membranaire mitochondriale, est décrit comme une conséquence de la dissipation du potentiel mitochondrial, responsable d'une soudaine augmentation de la perméabilité de la mitochondrie à des solutés de masse moléculaire <1,5 kDa [94-96].

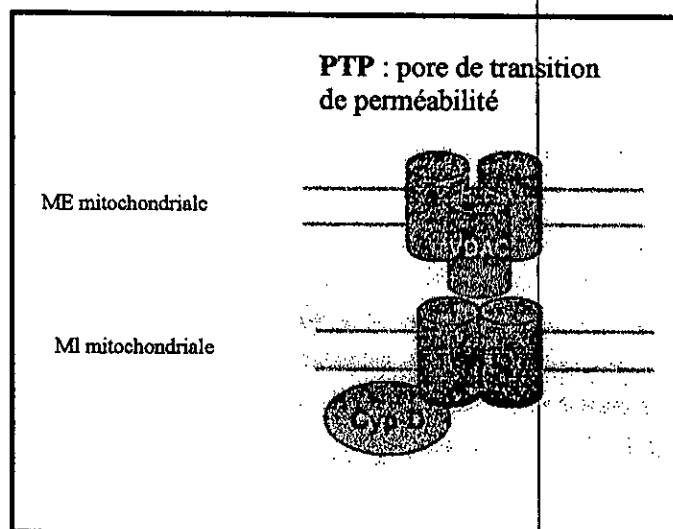


Figure 6 : configuration minimale du pore de transition de perméabilité membranaire mitochondrial.

VDAC : canal anionique voltage-dépendant ; ANT : translocase des nucléotides adényliques ; Cyp-D : cyclophiline D ; ME : membrane externe ; MI : membrane interne.

L'ouverture du PTP est régulée à la fois par le potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et le pH matriciel. L'ouverture est ainsi favorisée par une baisse du $\Delta\Psi_m$ et une acidification du pH matriciel [97, 98]. On décrit 3 états de fonctionnement du PTP :

- état fermé ou le $\Delta\Psi_m$ reste intact,

- état de faible conductance ou pore est partiellement ouvert, perméable à des molécules < 300 Da et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ est réversible,
- état de forte conductance ou le pore est perméable à des molécules < 1,5 kDa et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ est alors irréversible.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment lors d'un signal de mort, l'ouverture du pore et la dissipation du $\Delta\Psi_m$ peuvent être impliquées dans l'induction du relargage de molécules apoptogènes [99].

Le premier modèle « PTP- induced mitochondrail model » se caractérise par l'ouverture du pore VDAC et un gonflement de la matrice mitochondriale. Ce concept implique que l'agent apoptotique interagisse directement avec le PTP, provoquant son ouverture, puis une dépolarisation rapide de la mitochondrie et un gonflement de la matrice, une rupture de la membrane externe mitochondriale, et par conséquent le relargage des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c, l'AIF.

Le deuxième modèle « PTP-non swelling model » ne mettrait pas en jeu le gonflement de la matrice, des travaux ont montré à partir de mitochondries isolées que le relargage du cytochrome c peut être induit par de faibles concentration de Bax recombinant ou de Bid tronqué, sans observe de gonflement de la matrice mitochondriale ou de rupture de membrane externe mitochondriale [100]. Récemment, il a été montré que l'ouverture du pore (sans gonflement de la matrice mitochondriale) induit l'effondrement du $\Delta\Psi_m$ par un processus de dissipation des protons. Ceci provoque un changement de Bax et sa translocation à la mitochondrie, induisant le relargage du cytochrome c [101].

Le troisième modèle « formation of conducting channels model » mettrait en jeu des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. ces protéines sont capables de s'insérer dans la membrane externe mitochondriale ou une fois oligomérisées, elles forment des pores de façon autonome. Plusieurs exemple sont connus : le pore Bax (comprenant 4 molécules Bax), le pore Bax/Bid ou le pore Bax/VDAC. La translocation spécifique du cytochrome c, à travers ces canaux, a été également décrite [102-104].

Le dernier modèle « VDAC closure model » implique la fermeture du PTP et plus précisément la fermeture du VDAC. On n'observe pas, lors d'un signal apoptotique induit par

déprivation en facteurs de croissance de la rapide effondrement du Ψ_m mais plutôt une hyperpolarisation transitoire et précoce de la mitochondrie, précède la rupture de la membrane externe et le relargage de facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme [105]. Ainsi, ce modèle propose que cette hyperpolarisation soit la conséquence d'un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture du VDAC, provoquant une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, responsable à la fois du gonflement de la matrice et d'une production de radicaux oxygénés [106].

Enfin, il est important de noter que Bossy-Wetzell et coll. ont décrit un système où la libération du cytochrome c et l'activation de caspases pouvaient avoir lieu sans aucune dissipation du Ψ_m et dans lequel l'ouverture du PTP est consécutive à la formation de l'apoptosome [90].

Les protéines mitochondriales libérées lors du processus apoptotique sont regroupées sous le nom générique de SIMP (soluble inter membrane mitochondrial proteins) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Elles sont associées soit à une voie mitochondriale caspase-dépendante, soit à une voie mitochondriale caspase-indépendante.

3-2-2-a. Voie mitochondriale caspase-dépendante

Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue notamment le cytochrome c et la protéine Smac/DIABLO. Le cytochrome c a été identifié pour la première fois en 1930 par Keilin et Coll [107], il est synthétisé dans le cytosol sous la forme d'apo-cytochrome c et transloqué dans la membrane externe mitochondriale. Il est ensuite transformé en un holo-cytochrome c suite à son attachement à un noyau hème. Pendant longtemps, son rôle n'a été attribué qu'à sa participation à la phosphorylation oxydative comme transporteur d'électrons. Ce n'est que depuis les années 90 que son rôle dans l'exécution de la mort cellulaire programmée a été clairement démontré [108]. Le cytochrome c participe à l'assemblage de l'apoptosome. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1, et la pro-caspase 9, via des domaines CARD ; ils forment ainsi un complexe multiprotéique à l'origine du clivage de la pro-caspase-9, et donc à son activation. Cette dernière activera à son tour des caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7 [109] (figure 7).

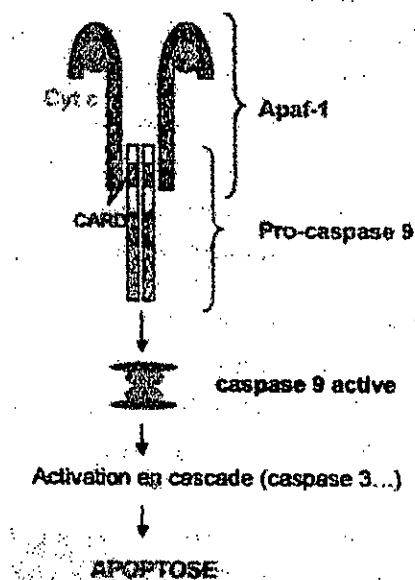


Figure 7 Représentation schématique de la formation de l'apoptosome CARD : caspase recruitment domain ; Cyt c : cytochrome c.

La libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome ne sont pas les seuls mécanismes aboutissant à l'activation en cascade des caspases. La protéine murine smac et son orthologue humain DIABLO sont des protéines mitochondriales synthétisées sous la forme de précurseurs de 29 kDa ; après protéolyse, elles deviennent des protéines matures de 23 kDa, pouvant être libérées en réponse à un stimulus apoptotique [110]. Elles agissent sous forme de dimères et contribuent à l'activation des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : inhibitors of apoptosis). Leur fonction physiologique mitochondriale est inconnue.

3-2-3-b .Voie mitochondriale caspase-indépendante

❖ L'AIF (apoptosis inducing factor) est une flavoprotéine, présentant des homologies avec des enzymes de type oxydoréductases de plantes ou de bactéries [111]. Ce facteur est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 67 kDa dont la partie N-terminale contient un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduit dans l'espace intermembranaire mitochondriale, il est clivé et libère une protéine mature de 57 kDa. Cette protéine a une double fonction de NADPH oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriale, et de facteur apoptogène [107, 112]. Son activité oxydoréductases n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique. Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie, transloqué dans le noyau des cellules en apoptose et induit, en coopération

avec des endonucléases (notamment l'endonucléase G), le clivage de L'ADN en fragment de haut poids moléculaires de 50 kD [113].

❖ **L'endonucléase G:** est une endonucléase mitochondriale codée par le génome nucléaire et son rôle principal est d'être impliquée dans la réplication du génome mitochondriale. Durant l'apoptose des cellules de mammifères G est relargage par la mitochondrie transloquée vers le noyau ou elle digère L'ADN nucléaire [114.115].

❖ **protéase Omi**, aussi appelée Htr A2. Elle a été identifiée comme une sérine protéase de 49 kDa, homologue à l'endoprotéase bactérienne Htr A2 [116] Omi/Htr A2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 49 kDa portant en position N-terminale un domaine signal de localisation mitochondriale. une fois introduite dans l'espace intermembranaire mitochondrial, elle est clivée et devient une protéine mature de 37 kDa [117]. Après un stimulus apoptotique, Omi/Htr2 est libérée dans le cytosol et peut induire une mort soit dépendante soit indépendante des caspases [118. 119], en effet, Omi/Htr A2 présente une cascade de caspases, soit elle dégrade, grâce à son activité de sérine protéase, des protéines intracellulaires nécessaires à la vie de la cellule.

3-2-2.La voie extrinsèque de l'apoptoses (voie des récepteurs de mort)

La deuxième grande voie apoptotique est celle induite par les récepteurs membranaires DR(death receptors) faisant partie de la superfamille des TNF-R(tumor necrosis factor receptor) ,certains membres de cette famille ont la caractéristique de posséder au niveau de leur région intracellulaire un domaine conservé DD(death domain) , qui est un motif protéique d'une taille d'environ 80 acides aminés , indispensable à la transmission du signal de mort de façon générale , les voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort conduisent à l'activation des caspases et en sont directement dépendante [120.121] les récepteurs de mort sont activés par la fixation de leur ligand et vont recruter des protéines intracellulaires dites adaptatrices .ces protéines vont à leur tour recruter les caspase initiatrices (principalement la 8 et la 10) et induire leur activation par auto-clivage. Nous avons choisi de présenter le modèle Fas/Fasl , modèle le plus connu et le plus décrit. Comme Fas ne contient aucune activité enzymatique propre, le signal de mort doit être transmis par l'intermédiaire de protéines qui s'associent au récepteur après sa stimulation.

La transmission du signale apoptotique sz Fas passe par la formation d'un complexe multiprotéique formé par l'agrégation des récepteurs Fas, la protéine FADD(Fas-associated death domain) [122]et la pro-caspase-8 ce complexe est nommé DISC (death inducing

signaling complex) suite à son auto-activation, la caspase -8 va alors activer par clivage la caspase-3, déclenchant une cascade de caspases effectrices qui vont conduire de façon inéluctable à la mort apoptotique de la cellule [123], il est à noter que la caspase-8 est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas [124].

Les travaux récents de Algeciras-Schimmich et coll [125] ont permis de préciser l'ordre de la signalisation initiale de la voie de Fas. Ainsi, il a été montré que la fixation de FasL induit la formation de micro agrégats de Fas ceci permet alors la formation de DISC selon un processus faisant intervenir les filaments d'actine et l'activation de la caspase-8 mais avec trop peu d'efficacité pour la transduction d'un signal apoptotique. Cependant, l'activation de la caspase-8 permet la formation à la surface cellulaire de larges regroupements membranaires de protéines Fas ces regroupements membranaires de récepteurs Fas vont permettre d'augmenter le signal transmis et d'amplifier l'activation de la caspase-8 pour induire le signal apoptotique. Le complexe Fas /FasL serait alors internalisé, grâce à la formation de vésicule d'endocytose par un processus encore mal défini.

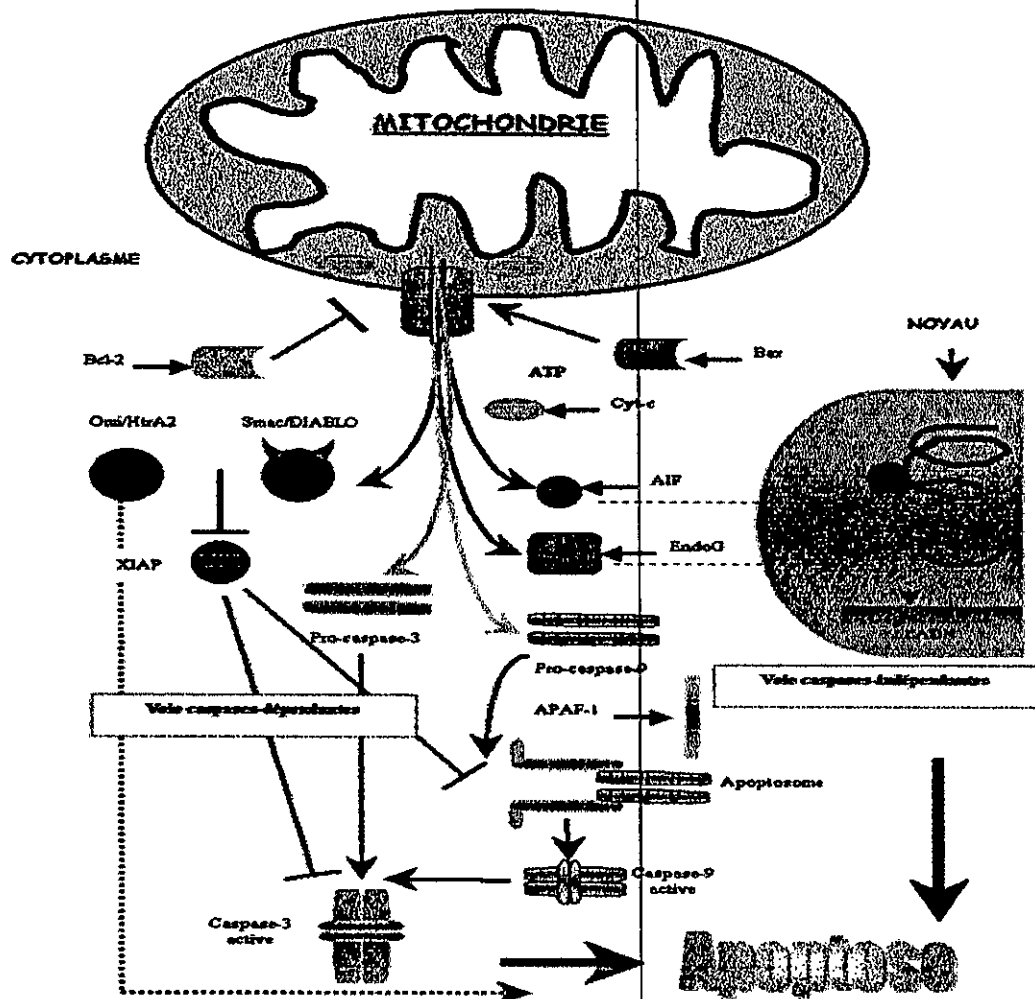


Figure8: les voies intrinsèque de l'apoptose

4-Les flavonoïdes contre le stress mitochondrial

4-1. définition:

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes, les anthocyanes et les tanins. [123- 128]. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits [129]. Ces substances occupent ainsi une place importante dans notre recherche vue leur puissant rôle antioxydant cité par plusieurs auteurs [130, -135]. Pour ces raisons il nous semble utile de donner une présentation générale de ces composés sur deux plan l'un biologique l'autre chimique.

4-2. Structure chimique et classification:

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C_6 (A et B), reliés par une chaîne en C_3 (Figure 9) [136].

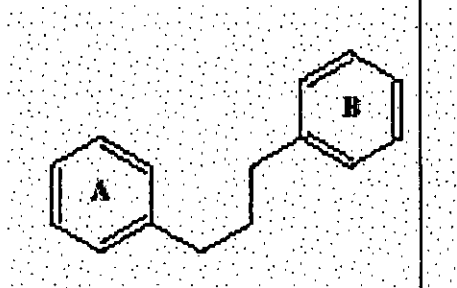


Figure 9: Squelette de base des flavonoïdes [136].

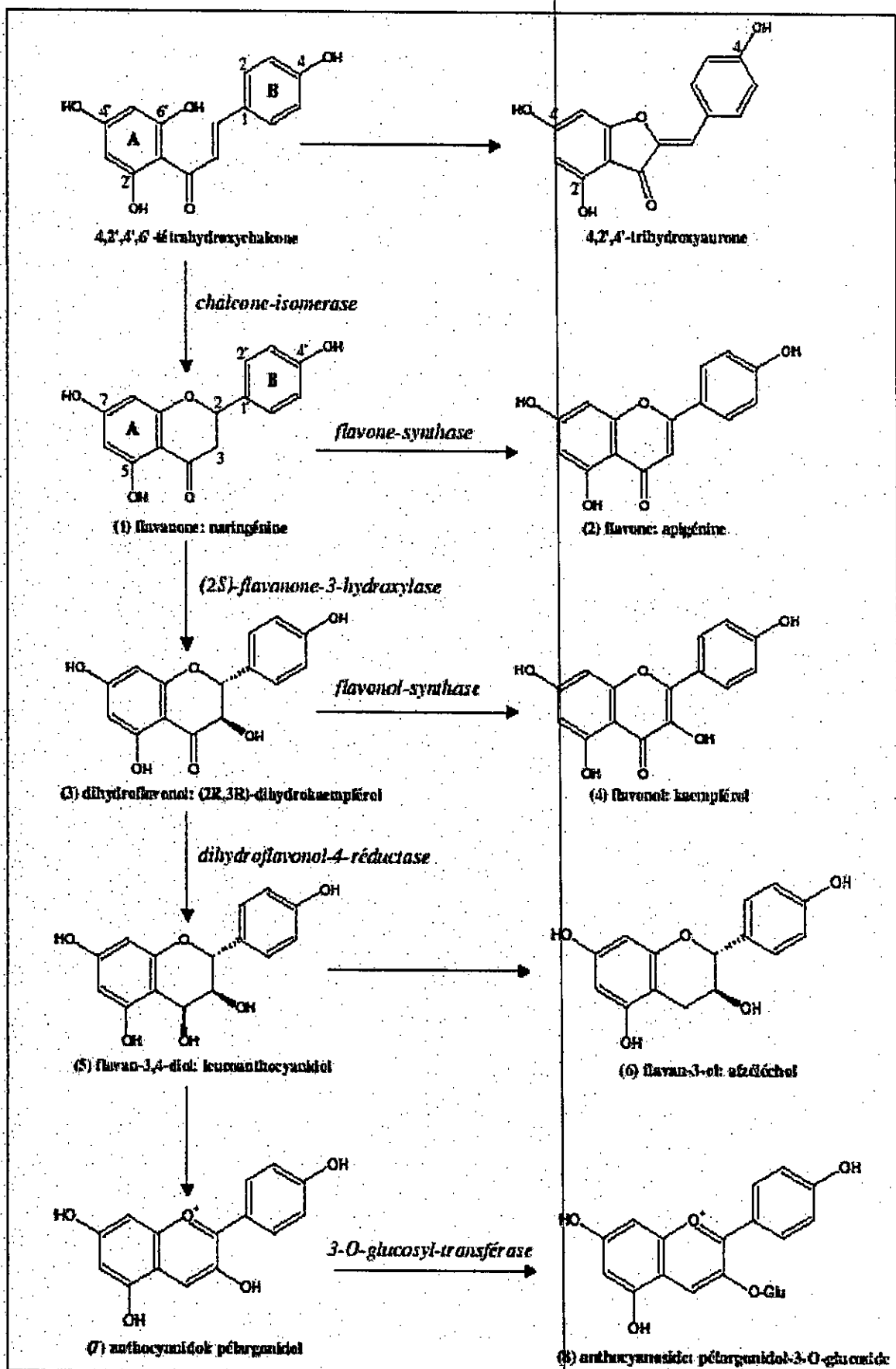


Figure10: Voie de biosynthèse des flavonoïdes [136].

4-3. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, Épinards, etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [137.138.139.140]. Le (Tableau2) regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes. Les flavones apigénine et lutéoline sont très spécifiquement détectées dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri. Pour ce dernier, les concentrations de ces deux flavones sont largement supérieures à celles présentes dans les tiges. Cependant, leurs analogues hydrogénés (flavanones), l' hespérétine et la naringénine sont exclusivement présents dans les agrumes [137]. Dans les tomates, il y a autant de naringénine que de quercétine. Cette dernière se retrouve de façon majoritaire dans la quasi-totalité des végétaux. Le kaempférol, autre flavonol, y est également largement détecté. Les isoflavones sont largement distribuées dans des légumes comme le soja, les haricots verts, les haricots noirs et les pois. Autres flavonoïdes souvent étudiés, les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées. Ils se trouvent surtout dans les myrtilles, cassis, airelles, groseilles, mais également, à un degré moindre, dans tous les autres fruits rouges comme les raisins, les fraises et les framboises. On peut aussi les trouver dans certains légumes comme le chou rouge et les radis [141].

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin, et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires [142,143].

Tableau 2: Sources alimentaires des flavonoïdes [138].

Flavonoïdes	Aliments
Flavanones	
Naringénine	fruits du genre <i>citrus</i>
Flavones	
Chrysin	peau des fruits
Apigénine	persil, thym, romarin, céleri
lutéoline	persil, céleri
Flavonols	
kaempférol	ails, brocoli, thé noir
quercétine	oignon, pomme, olive, vin rouge, tomate
myricétine	canneberge, vin rouge
Flavan-3-ols	
épicatéchine	thé vert, thé noir
Catéchine	thé vert, thé noir
épigallocatechine	vin rouge
Anthocyanidols	
Cyanidol	cassis, myrtilles
Malvidol	raisins, fraises, cassis
Apigénidol	framboises, fraises

4-4. Propriétés des flavonoides:

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes [144].

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937), chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) [145]. Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permirent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

4-5. Les flavonoïdes comme antioxydant

D'après Halliwell [146], les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ROS.
- L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

4-5.1. Inhibition enzymatique:

La xanthine oxydase (XO) catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique. Par conséquent, la xanthine oxydase est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde. 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 les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains [147]. Ces résultats ont été confirmés par Cos et ses collaborateurs qui ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production d'acide urique [148]. Ils ont ainsi déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité

inhibitrice de la xanthine oxydase. Les différents points qui ressortent de cette étude sont les suivants :

- La taxifoline, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine ne peuvent inhiber la xanthine oxydase qu' à des concentrations supérieures à 100 mM.
- La flavone, la 4' -hydroxyflavone et la naringénine sont incapables d'inhiber la production de l' acide urique.

Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols n'ont donc aucune influence sur l' activité de la xanthine oxydase.

- Seuls les flavonols et les flavones ont la capacité à inactiver l' enzyme.

Ceci montre l'importance de la double liaison C2-C3 dans l'inhibition de la xanthine oxydase. En effet, les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols diffèrent des flavones et des flavonols par l'absence de la double liaison entre C-2 et C-3. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Il est donc possible qu'une structure plane soit importante pour l'inhibition de la xanthine oxydase.

- En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, on observe que l' absence du groupe hydroxyle en C-3 augmente légèrement l' activité.
- Toutes les flavones ont montré des activités presque similaires quelque soit les substituants du cycle B, indiquant que le cycle B n' a que peu d'influence sur l' inhibition de l' enzyme pour les flavones
- Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine .

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase [149].

4-5-2. Chélation des ions métalliques:

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques [150.151]. Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont montré les résultats suivants [152] :

- Le flavonol (3, 5-OH; 7, 3', 4'-OEtOH) possède une activité supérieure à celle du (3-OGlu; 5-OH; 7, 3', 4'-OEtOH), ce qui indique l'importance du groupement 3-OH.
- Le (3-OGlu, 5-OH; 7, 4'-OEtOH; 3'-OH) est moins actif que le (3-OGlu, 5-OH; 7-OEtOH; 3', 4'-OH). Ceci démontre l'efficacité d'un groupement catéchol sur le cycle B (3', 4'-OH).
- La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés.

On peut résumer (Figure 10) les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques :

- 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.

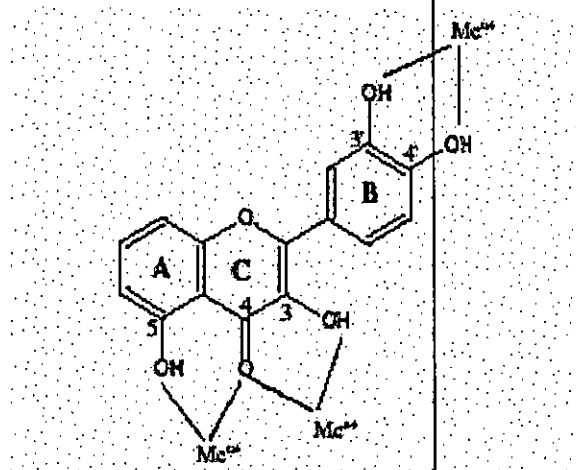


Figure 11: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques [152].

4-5-3. Piégeage des radicaux libre:

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox [153], les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où $\text{R}\cdot$ représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle. Le radical flavonoxy ($\text{FL-O}\cdot$) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Figure 11).

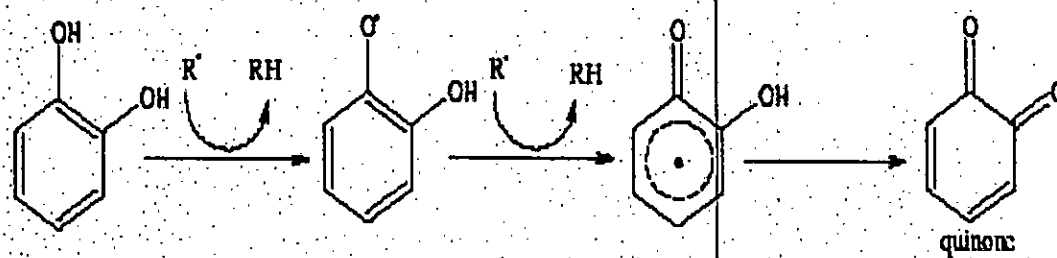


Figure 12 : Piégeage des ROS ($\text{R}\cdot$) par les flavonoïdes [153].

En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Nous constatons que la capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox du couple $\text{FL-O}\cdot / \text{FL-OH}$ mais aussi de la réactivité du radical flavonoxy.

4-5-4. 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 [152.153.154.155.156.157.158.159]. En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres, la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants:

1. La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
2. La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
3. 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 (Figure 12).

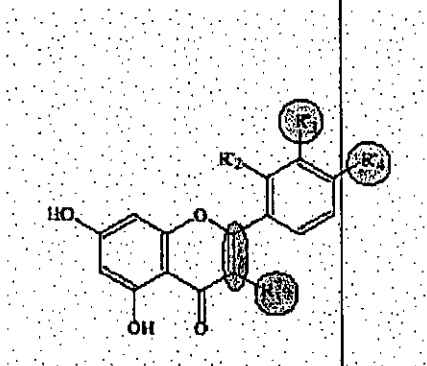


Figure 13 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes [154].

4-6. 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 pro-oxydants. 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. Certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro* [160.161].

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' pentaméthoxy flavone) induit l'apoptose des cellules HL-60 à des concentrations supérieures à 2.7 mM [162]. Alors, le potentiel prooxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes.

4-6. Autres activités biologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses.

4-6-1. Effet antiallergique:

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase

et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺-dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [163].

4-6-2. Effet anti-inflammatoire:

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes [149]. Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que L'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

4-6.3. Effet anti-ulcèreux:

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, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes [163]. D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel [164]. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes.

4-6.4. Effet anticancéreux:

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale [165]. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important

durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones [166]. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir: la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres [163]. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène [167] et inhibe l'activité de la collagénase [168].

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [169]. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [170,171]. Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [172]. Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés [173].

4-7. Le gingembre :

4-7-1. Définition :

Le *Zingiber officinalis* communément appelé "Gingembre" est une grande plante herbacée vivace à feuilles lancéolées inflorescence dense avec des bractées latérales de la famille des. Le mot Gingembre vient du sanskrit "singabera" qui signifie en forme de corne.

Originaire de l'Inde, le gingembre est cultivé dans le sud-est asiatique et en Chine. Le rhizome ramifié dans un seul plan, est une drogue très anciennement utilisée en Inde et en Chine ou il a été découvert il y a plus de 2500 ans [174].



Figure 14: les rhizomes du Gingembre.

4-7-2. Composition chimique :

Le rhizome est très riche en amidon (60%), renferme de 1 à 2.05 p cent d'huile essentiel et une résine. La composition de l'huile essentielle varie de façon importante selon l'origine géographique. Les éléments caractéristiques sont des carbures sesquiterpéniques ; zingiberène, curcumène accompagnés d'aldéhyde et d'alcool monoterpéniques. Les constituants responsables de la saveur très marquée de la drogue sont des Gingéroles [174].

4-7-3. Propriété pharmacologique :

Les rhizomes du Gingembre ont un goût piquant et sucré aux qualités chauffantes, ils agissent comme diaphorétique, expectorant, stimulant et antidépresseur. Les rhizomes du gingembre stimulent les tissus de l'organisme et se prescrit souvent contre les affections liées à un défaut d'assimilation. Les rhizomes du gingembre se prescrit aussi contre les rhumes, toux, grippe, indigestion, vomissements, éructations, douleurs abdominales, mal des transports, laryngite, arthrite, hémorroïdes, céphalée, diarrhée, maladie cardiaque et amnésie passagère. Les rhizomes du gingembre sont rubéfiants et peut de ce fait, soulager efficacement les états douloureux, comme rhumatisme ou douleur musculaire, et stimules la circulation. Les rhizomes du gingembre dilué, appliqués en massage autour de l'abdomen et de l'estomac régule la digestion, stimule et adoucit l'estomac et favorise l'appétit.

Les rhizomes du gingembre sont antalgique antiseptique et antioxydant [175,176].

*Matériel et
méthodes*

II. Matériel et méthodes

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 des aglycones et des hétérosides flavoniques des rhizomes du gingembre sur les fonctions mitochondriales et cellulaire liées aux stress oxydant.

1. Matériel végétal :

Les rhizomes du gingembre « Zingiber officinalis » sont achetés chez un herboriste à Jijel.

1-1 préparation des extraits :

a- préparation de l'extrait brut :

Les rhizomes ont été broyé à l'aide d'un mortier, la poudre issue de la pulvérisation, a été mise en macération dans une solution hydro-éthanolique (3 :7) pendant sept jours, après on procède à la filtration du mélange à l'aide du papier filtre. Le filtrat est ensuite évaporé à sec par un rota vapeur à la température de 65°C ,deux tours/min. L'extrait brut ainsi obtenu est pesé et conservé à 4°C. L'extraction est poursuivie afin d'extraire les aglycones et les hétérosides flavoniques. Pour cela, l'extrait brut est suspendu dans l'eau et la solution aqueuse subit une série d'affrontements par quatre solvants différents [174].

b- Affrontement :

Les quatre solvants utilisés sont:

- éther de pétrole.
- Ether diethyl solvant préférentiel des aglycones flavoniques.
- Acétate d'éthyle : solvant préférentiel des mono glycosides.
- n-butanol solvant préférentiel des di et triglycosides.

b-1. affrontement par l'éther de pétrole :

On ajoute 100 ml d'éther de pétrole à la phase aqueuse. Après agitation énergique et repos de 10 min, on met le mélange dans une ampoule à décantation ,deux phases sont obtenues :

- une phase supérieure qui correspond à la phase éther de pétrole.
- Une phase inférieure qui correspond à la phase aqueuse.

b-2 . affrontement par l'éther diéthylique :

Sur la phase aqueuse obtenue après affrontement par l'éther de pétrole, on a répété les mêmes opérations mais avec l'éther diéthylique, Deux phases sont obtenues :

- la phase éther diéthylique
- la phase aqueuse.

b-3. affrontement par l'acétate d'éthyle

Même technique que précédemment mais avec le solvant acétate d'éthyle, les deux phases obtenues sont :

- la phase acétate d'éthyle.
- la phase aqueuse.

b-4. affrontement par le n-butanol :

Même technique suivie pour obtenir les deux phases :

- la phase n-butanol
- la phase aqueuse.

Après, toutes les phases subissent une évaporation à sec dans le rota vapeur , chacune des phases à la température qui lui convient :

- la phase éther de pétrole, une évaporation atmosphérique.
- la phase éther diéthylique à 34°C
- la phase acétate d'éthyle à 76.8°C
- la phase n-butanol à 50°C

Les différents extraits ainsi obtenus, sont pesés à l'aide d'une balance électronique sensible et sont conservés à 4°C.

1-2. Analyse chimique des extraits des rhizomes du gingembre:

a-Chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait éthanolique des rhizomes du gingembre:

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée à des fins préparatifs ou analytique. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Les flavonoides des rhizomes du Gingembre sont recherchés et séparés par chromatographie sur couche mince. Nous avons utilisé le gel de silice comme phase

stationnaire toluène- méthanol – éthanol.- éther de pétrole (4.3.3.3 v/v) comme système solvant [177]. Les spots des produits séparés sont observés par UV à 254 et 336 nm et les rapports frontaux sont ensuite calculés selon la formule suivante :

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

b-Chromatographie sur couche mince de la phase acétate d'éthyle des rhizomes du Gingembre (CCM des hétérosides flavoniques)

L'acétate d'éthyle est le solvant préférentiel des hétérosides flavoniques. Pour la CCM de ce type de flavonoïdes, qui sont la forme glycosylées des aglycones flavoniques, nous avons utilisé le gel de silice comme phase stationnaire et le système (n-butanol-acide acétique glacial- eau) (4.1.5v/v) comme système solvant. Les spots sont observés par UV à 254 et 336 nm.

c-Chromatographie sur couche mince de la phase éther diethlique des rhizomes du gingembre (CCM des aglycones flavoniques)

L'éther diéthylique est le solvant préférentiel des aglycones flavoniques. Pour la CCM de ce type de flavonoïdes, nous avons utilisé le gel de silice comme phase stationnaire et le système (chloroforme- ethyl acetate) (6:4 v/v) comme système solvant. Les spots sont observés par UV à 254 et 336 nm.

Tableau 3. Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes [109].

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

1-3. Préparation des différentes dilutions

Après la préparation des différents extraits, nous avons préparé les solutions mères à partir desquelles les concentrations utilisées (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8}) sont ensuite préparées par dilution dans l'eau distillée. Pour la préparation de la concentration 10^{-2} par exemple, nous avons pris 1 ml de la solution mère avec 99 ml d'eau distillée.

2- Sacrifice des animaux et prélèvement du foie :

Notre travail est réalisé sur des rats femelles de souche Wistar, fournies par l'institut Pasteur d'Alger. Les rats avaient libre accès à l'eau et à la nourriture.

Pour réaliser notre étude *in vitro*, les rats ont été sacrifiés par knock-out. Au moment du sacrifice, le foie est isolé et est rapidement plongé dans le tampon TSE (tris -sucrose - EGTA).

3- Evaluation de l'activité antioxydante des rhizomes du Gingembre *in vitro* :

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} , 10^{-4} , 10^{-6} et 10^{-8}), 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 résulter lors de l'administration.

3-1. Isolement des mitochondries du foie :

L'isolement des mitochondries se fait selon la méthode décrite par Rustin et al [178]. Elle est basée sur le principe de centrifugation différentielle, toutes les opérations se déroulent à 4°C. Le foie du rat est prélevé comme on a décrit précédemment, plongé dans le tampon TSE (250 mM sucrose - 50mM Tris - 5mM EGTA à PH 7.2), pesé, rincé une deuxième fois par le même tampon et est coupé en petits morceaux, qui sont rincés une deuxième fois dans le tampon TSE avant d'être potterisés à l'aide d'un Potter en verre manuel. L'homogénat est ensuite centrifugé à 1770 tours/min à 4°C pendant 10 min. le surnageant issu de la première centrifugation est centrifugé à 11000 tours/min pendant 5 min à 4°C. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans le tampon TSE, puis centrifugé à nouveau à 11000 tours/min pendant 5 min à 4°C. Le culot est récupéré une dernière fois dans le tampon TS (50mM tris, 250mM sucrose PH = 7.2 à 4°C) et est centrifugé à 11000 tours/ min. Le culot issu de la dernière centrifugation est resuspendu dans le tampon TS.

3-2. préparation de la matrice mitochondriale :

Les mitochondries isolées comme décrit précédemment, sont resuspendus après la dernière centrifugation dans la solution hypotonique (KH_2PO_4 , MgCl_2) cette préparation est congelée puis décongelée 6 à 7 fois avec potérisation accrue après chaque décongélation. Après la dernière décongélation la solution est centrifugée à 11000 tours/ min pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est récupéré, il représente la matrice mitochondriale [179].

3-3. préparation de la fraction cytosolique :

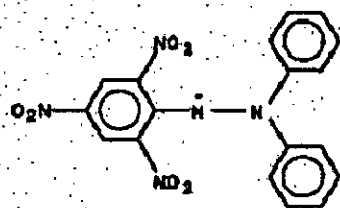
Le foie est prélevé et est trempé rapidement dans le tampon phosphate contenant 1.17% de chlorure de potassium, puis coupé en petits morceaux, avant de le potteriser, l'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 2000 tours/ min pendant 15 min à 4°C, le culot ainsi obtenu est récupéré dans le tampon phosphate puis centrifugé à 9600 tours/ min à 4°C pendant 30 min pour obtenir le surnageant post mitochondrial [180].

3-4. dosage des protéines :

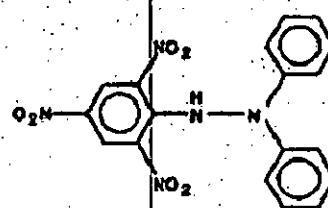
Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry. Le culot final contient des protéines à la moyenne de 70 mg/kg [179].

3-5. Test de l'effet scavenger des extraits, vis à vis du radical libre stable DPPH°

Le pouvoir scavenger des extraits du Gingembre est déterminé en utilisant le diphényl-2-picryl- hydrazyl, le radical libre stable DPPH° en solution éthanolique (100 μM). Le DPPH° est largement utilisé pour tester la capacité des composés d'agir en tant qu'éboueurs des radicaux libres ou donneurs d'hydrogène. 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 [181].



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

Dans une cuve en quartz, on ajoute à 1.5 ml de la solution DPPH°, 15 µl de notre extrait puis on mesure la DO chaque 15 seconde pendant 5 min à 517 nm dans un spectrophotomètre shimadzu mini UV 1240. Le pourcentage de réduction est par la suite calculé selon la relation :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{\text{DO. Contrôle} - \text{DO mélange}}{\text{DO Contrôle}} \times 100$$

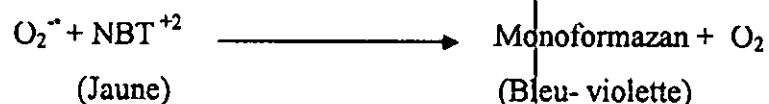
Dont :

DO contrôle : est la densité optique de la solution éthanolique du DPPH°.

DO mélange : est la densité optique du mélange réactionnelle (Solution éthanolique DPPH° + extrait à tester).

3- 6. Production de l'anion superoxyde :

La génération de l'O₂⁻ est mesuré par le principe de la réduction du NBT au monoformazan qui absorbe à 560 nm.



les mitochondries sont incubées pendant une minute dans une cuve en quartz avec 1.2 ml du tampon respirant mélangé avec la roténone 2 µM juste avant l'emploi, 1 µM de cyclosporine et 120 µM du NBT. la génération de l'O₂⁻ commence quand on ajoute 6 mM du succinate, à ce moment, on mesure la DO chaque 15 seconde pendant 5 min [182].

3-7. dosage du MDA:

pour doser le marqueur de la peroxydation lipidique, le MDA, nous avons préparé une solution mitochondrial (0.2 mg/ml de mitochondrie sont suspendues dans du NaCl 9 ‰). Dans des tubes en verre on met 1 ml de la solution mitochondrial plus 100 µl de l'extrait, les tubes sont ensuite incubés dans le bain marie à 37°C avec agitation, puis on ajoute 100 µl du mélange FeCl₂ (500 µM) et FeCl₃ (1500 µM), les tubes sont réincubés à 37° pendant 30 min. Après l'Addition du TCA 3% tous les tubes sont centrifugés à 30 tours/min pendant 15

min à 4°C. De chaque tube on prend 1 ml du surnageant et on lui ajoute 1ml du TBA1% avant d'incuber les tubes 30 min à 95°C. Enfin et après le refroidissement, on mesure la DO à 530 nm [182]. la concentration du MDA est donc calculé selon la formule :

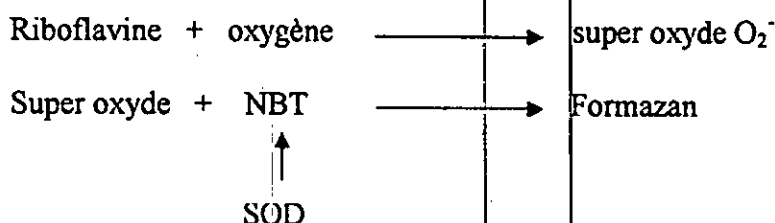
$$[\text{MDA}] = \frac{\text{DO}}{0.0184}$$

3-8. Dosage de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase :

3-8-1. Dosage de la SOD

a. Principe de la méthode :

La détermination de l'activité de la SOD dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du NBT (nitrobleu tetrazolium), c'est à dire sa capacité à inhiber la formation du Formazan par les super oxydes qui sont générés par une photo réaction à partir de l'oxygène et la riboflavine.



b- Estimation de la SOD :

5 µl de la matrice mitochondrial + 2 ml du milieu réactionnel : (0.1 ml de la solution sodium cyanide, 1ml de la solution méthionine, 1ml de la solution EDTA, 0.1 ml de la solution NBT, 0.1ml de la solution riboflavine , tampon phosphate QSP 10 ml), sont irradié en utilisant la lumière pendant 10 min . On mesure le changement de l'absorbance à 560 nm, cela pour le tube témoin, pour les essais on ajoute 5 µl des différents concentration de nos extrais [183].

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule :

$$\% = \frac{\text{DO du témoin} - \text{DO de l'essai}}{\text{DO du témoin}}$$

Facteur de corrélation : 6.35 uni/ml

3-8-2. dosage de la catalase :

a- le principe :

La détermination de l'activité de la catalase dépend du changement de l'absorbance, qui résulte de la décomposition de H₂O₂ par la catalase, Ce changement est mesuré à 240 nm chaque 1 min pendant 3 min en utilisant le spectrophotomètre Shimadzu.

b- estimation de l'activité de la catalase :

Dans une cuvette en quartz de 3 ml, on met 100 µl de la matrice, 2.9 ml de la solution H₂O₂ 19 m mol /l préparée dans le tampon phosphate On note le changement de l'absorbance à 240 nm chaque minute pendant 3 minutes [184].

L'activité enzymatique est exprimée en unit/mg de protéines.

$$F = \frac{2.303}{T} \text{ Log } \frac{A_1}{A_2} \quad \text{unit / mg de proteines}$$

T : l'interval de temps par min

A₁: absorbance à 0 min

A₂: absorbance à 1 min

3-9.la mesure du gonflement mitochondrial :

Le gonflement mitochondrial est évalué en mesurant le changement de l'absorbance de la suspension mitochondriale, à 540 nm, par le spectrophotomètre Shimadzu UV24000

chaque 15' pendant 5 min. 1.8 ml du tampon swelling (250m M sucrose, 5mM KH₂PO₄, PH7.8) avec 2 µM de roténone à 25°C avec 6mM succinate et 1mg /ml de mitochondrie sont incubés 1min, après on ajoute nos extraits à différentes concentrations [185].

Evaluation statistique :

Les résultats numériques et graphiques sont présentés sous forme de moyenne ± écart type. Nous avons également fait la comparaison des moyennes par le test de Student, pour tester la signification de la différence entre la moyenne les traités et le témoin. Pour cela on doit calculer la valeur de t qui est donnée par la formule suivante :

$$t = \frac{|\bar{X}_A - \bar{X}_B|}{\sqrt{\frac{s^2}{N_A} + \frac{s^2}{N_B}}} \quad \text{Avec : } s^2 = \frac{s_A^2 (N_A - 1) + s_B^2 (N_B - 1)}{[(N_A - 1) + (N_B - 1)]}$$

X_A : moyenne pour le témoin.

X_B : moyenne pour le traité.

$|\bar{X}_A - \bar{X}_B|$ signifie la valeur absolue de la différence entre les deux moyennes.

N : le nombre de rats.

Après le calcul de t, on cherche dans la table de t la valeur correspondante au degré de liberté qui est égale à : N_A + N_B - 2.

La valeur trouvée par le calcul de t nous renseigne sur la signification de la différence entre le témoin et le l'essai selon le risque d'erreur P.

P > 0.05 : la différence n'est pas significative (ns).

0.05 > P > 0.01 : la différence est significative (*).

0.01 > P > 0.001 : la différence est hautement significative (**).

P ≤ 0.001 : la différence est très hautement significative (***)

*Résultats et
interprétations*

III-Résultats et interprétation :

1- le rendement du gingembre

Les rhizomes du Gingembre et après pulvérisation sont laissés macéré dans une solution hydro-alcoolique (éthanol- eau 7:3) pendant 7 jours, la poudre pèse 100g. Après évaporation nous avons obtenu l'extrait brut qui pèse 6.45g, ce dernier a subit plusieurs affrontements par quatre solvants différents, qui sont par ordre de polarité croissante : l'éther de pétrole, l'éther diétyl, l'acétate d'éthyl et le n-butanol.

La figure 14 montre le rendement du gingembre en différentes phases extraite à partir de l'extrait brut. Nous remarquons que l'extrait brut est riche en phase n-butanol qui est le solvant préféré des di et triglycosides représente 49.69%, alors que les aglycone flavonique représenté par la phase éther diétyl et les hétérosides (monoglycoside) flavoniques par la phase acétate d'éthyle ne représente que 2.1% et 2.4% respectivement.

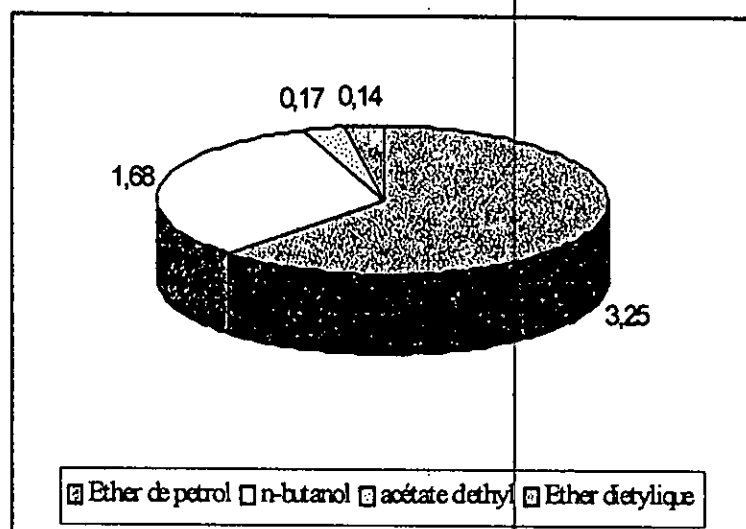


Figure15: rendement de l'extrait brut des rhizomes du Gingembre en phases : n-butanol, acétate d'ethyl, Ether diéthylique

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. Les valeurs des Rf ainsi que la fluorescence des spots figurent dans les tableaux 4, 5 et 6 suivants.

Tableau 4. Comportement chromatographique sur couche mince de l'extrait éthanolique des rhizomes du gingembre.

Rf en cm	0.14	0.18	0.25	0.33	0.44	0.47	0.52	0.56	0.79
Fluorescence	violette	violette	violette	violette	violette	violette	violette	violette	violette

Tableau 5. Comportement chromatographique sur couche mince des aglycones flavoniques des rhizomes du Gingembre

Rf en cm	Fluorescence
0.07	bleu
0.09	jaune
0.13	violette
0.21	violette
0.26	violette
0.41	violette
0.46	violette
0.52	violette
0.57	violette
0.63	violette
0.74	jaune

Cette analyse par chromatographie nous a permis de révéler la présence de flavones et de flavonoles dans les extraits des rhizomes du Gingembre. La fluorescence jaune en UV ainsi que les valeurs des Rf dans les systèmes solvants utilisés sont en faveur d'une structure flavone. Alors que la fluorescence Bleu et violette en UV est probablement en faveur d'une structure flavonole.

Tableau 6. Comportement chromatographique sur couche mince des hétérosides flavoniques des rhizomes du Gingembres

Rf en cm	Flurescence
0.03	Violette
0.07	Violette
0.13	Bleu
0.28	Bleu
0.3	Marron
0.34	Maron
0.39	Marron
0.44	Marron
0.46	Violette
0.5	Violette
0.56	Violette

3- Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique du gingembre, des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques du Gingembre *in vitro*:

2-1 Evaluation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre :

L'activité antioxydante des rhizomes du Gingembre *in vitro* a été évaluée par le test du DPPH (1.1 diphényle 2 picryl hydrazyl), qui consiste à mesurer la capacité des extraits à piéger les radicaux libres " effet scavenger" et cela en déterminant le pourcentage de réduction du radical physiologique stable DPPH°. Dans le tableau 7 et la figure 16 qui représentent la variation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique, des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques des rhizomes du Gingembre ainsi que celui de la propolis et de la vitamine E, nous remarquons que les hétérosides et les aglycones flavoniques du Gingembre ont un pouvoir scavenger très puissant qui varie entre 85%et 91 % respectivement contre 43.36% seulement de la vit E.

La propolis également est très puissante et représente 83% de réduction du DPPH°, cependant l'extrait brut des rhizomes du Gingembre ne représente que 43.16% mais son association à la propolis améliore son pouvoir réducteur qui atteint 77.63%.

Tableau 7. Variation de l'effet scavenger de l'extrait etanolique, des Aglycones flavonique et des Heterosides flavoniques du Gingembre vis-à-vis du radical libre DPPH° *in vitro*:

La concentration de l'extrait	10 ⁻²						
L'extrait de	quercitrine	Vit E	propolis	Extrait brut du gingembre	Gingembre +propolis (1/1)	phaseAcétate D'éthyle	PhaseEther diethylique
Le pourcentage de réduction du DPPH°	77.87%	73.36%	83%	43.16%	77.63%	91.07%	85.79%

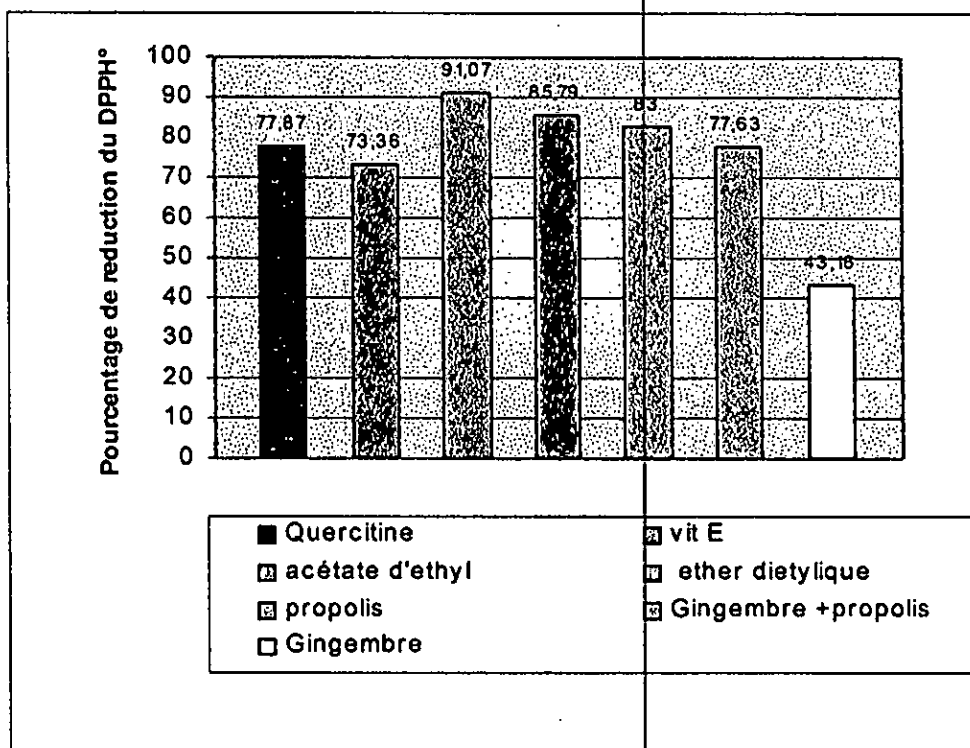


Figure 16. Variation de l'effet scavenger de l'extrait etanolique, des Aglycones flavonique et des Heterosides flavoniques du Gingembre vis-à-vis du radical libre DPPH° *in vitro*:

2-2 Evaluation de la production mitochondrial de l'anion super oxyde:

Parmi les radicaux libres formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire super oxyde, il n'est pas très réactif mais constitue le précurseur d'autres espèces très réactives, ce qu'il lui confère une importance incomparable pour l'évaluation de l'état du stress oxydatif.

Nous avons testé nos extraits; les extraits éthanolique des rhizomes du gingembre et de la propolis, les aglycones flavoniques et les hétérosides flavoniques des rhizomes du gingembre, sur la production de l'anion super oxyde par les complexes de la chaîne respiratoire.

Les résultats sont représentés dans le tableau 8 Et les figures 17 et 18. Nous remarquons que L'extrait éthanolique des rhizomes du gingembre entraîne une diminution de la production mitochondriale de l'O²⁻. Cette diminution est proportionnel à la concentration, est très hautement significative à la concentration de 10⁻² et 10⁻⁸. La diminution de la production de l'O²⁻ est plus remarquable avec les aglycones flavonique des rhizomes du gingembre, elle est de 11.33% à la concentration 10⁻² et 18.79% à 10⁻⁸.

Les hétérosides à leur tour ont un effet plus au moins inhibiteur de la production de l'O²⁻ qui atteint environ 50% à 10⁻² et 40% à 10⁻⁴. L'association des extraits éthanoliques: propolis/ rhizomes du Gingembre augmente le pouvoir d'inhibition de la production de l'O²⁻ en comparaison avec les résultats de chaque extrait seul. D'après nos résultats, on déduit que les aglycones flavoniques présente le pouvoir inhibiteur de la production de l'O²⁻ le plus grand atteint même à la concentration 10⁻⁸ 80%.

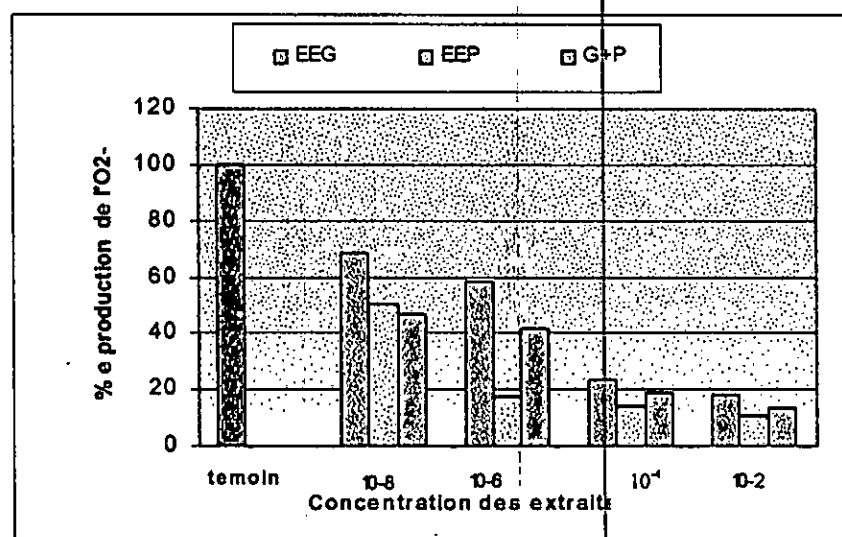


Figure 17. Variation de la production de l'anion super oxyde, en présence des extraits éthanoliques du Gingembre et de la propolis et de leur association à différentes concentrations *in vitro*:

Tableau 8. Variation de la production de l'anion super oxyde, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

Les extraits	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
Extrait éthanolique du Gingembre	18.42 ± 4.91 ***	23.71 ± 8.88 ***	58.15 ± 18.86 ***	68.63 ± 22.02 ***
Extrait éthanolique de la propolis	10.42 ± 2.42 ***	13.93 ± 3.47 ***	17.19 ± 3.95 ***	50.62 ± 11.93 ***
Gingembre + propolis (1/1)	13.09 ± 2.67 ***	19.02 ± 4.49 ***	41.4 ± 11.33 ***	46.79 ± 12.68 ***
Aglycones flavonique du Gingembre	11.33 ± 3.06 ***	14.85 ± 2.61 ***	14.79 ± 3.63 ***	18.79 ± 4.55 ***
Hétérosides flavoniques du Gingembre	48.89 ± 11.51 ***	58.54 ± 14.35 ***	63.82 ± 14.76 ***	79.73 ± 18.96 **

Temoin: 100% ± 5.61

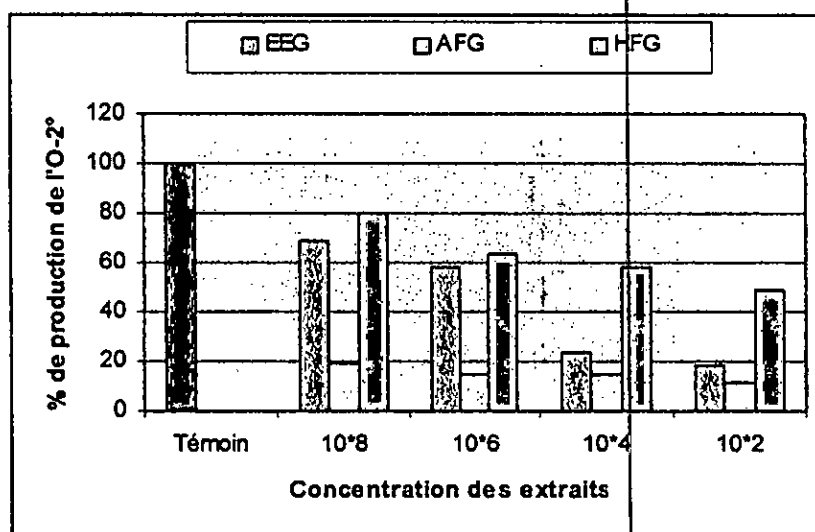


Figure 18. Variation de la production de l'anion super oxyde , en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

3-2 Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondrial : dosage du MDA

Le MDA est le marqueur de la peroxydation lipidique le plus souvent dosé, grâce à la simplicité de la méthode. Les résultats de la 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 des extraits éthanoliques de la propolis et des rhizomes du Gingembre, ainsi que les aglycones flavoniques et les hétérosides flavoniques des rhizomes du Gingembre sont représentés dans le tableau 9 et les figures 19 et 20.

Tous les extraits incubés avec les mitochondries hépatiques de rat à différentes concentrations 10⁻² à 10⁻⁸ abouti à une diminution des taux du MDA marqueur de la peroxydation lipidique induite *in vitro* le FeCl₂/FeCl₃, sauf l'extrait éthanolique des rhizomes du Gingembre qui à la concentration 10⁻⁸ présente une diminution non significative. les valeurs vont de 2.15 à 13.72 contre le témoin 17 nmoles/mg de protéines. La diminution des taux du MDA est concentration dépendante.

Tableau 9. Variation des taux du MDA mitochondrial généré suite à la peroxydation lipidique induite *in vitro* par le FeCl₂/FeCl₃ en présence de différentes concentrations de l'extrait éthanolique des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques des rhizomes du Gingembre.

Les extraits	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
Extrait éthanolique du Gingembre	4.88 ± 0.72 **	8.36 ± 1.44 *	11.38 ± 2.76 *	13.72 ± 1.25 n.s
Extrait éthanolique de la propolis	2.15 ± 0.24 **	5.55 ± 2.19 **	7.48 ± 1.00 **	8.96 ± 0.85 *
Gingembre + propolis 50%-50%	2.47 ± 0.46 **	5.21 ± 0.65 **	7.27 ± 1.55 **	8.52 ± 2.73 *
Aglycones flavonique du Gingembre	3.25 ± 1.64 **	6.48 ± 0.79 **	6.30 ± 0.09 *	9.05 ± 5.33 *
Hétérosides flavoniques du Gingembre	5.28 ± 0.53 **	9.75 ± 2.02 **	8 ± 0.54 **	10.07 ± 3.68 *

Témoin: 17 ± 8.8 n moles / mg de protéines

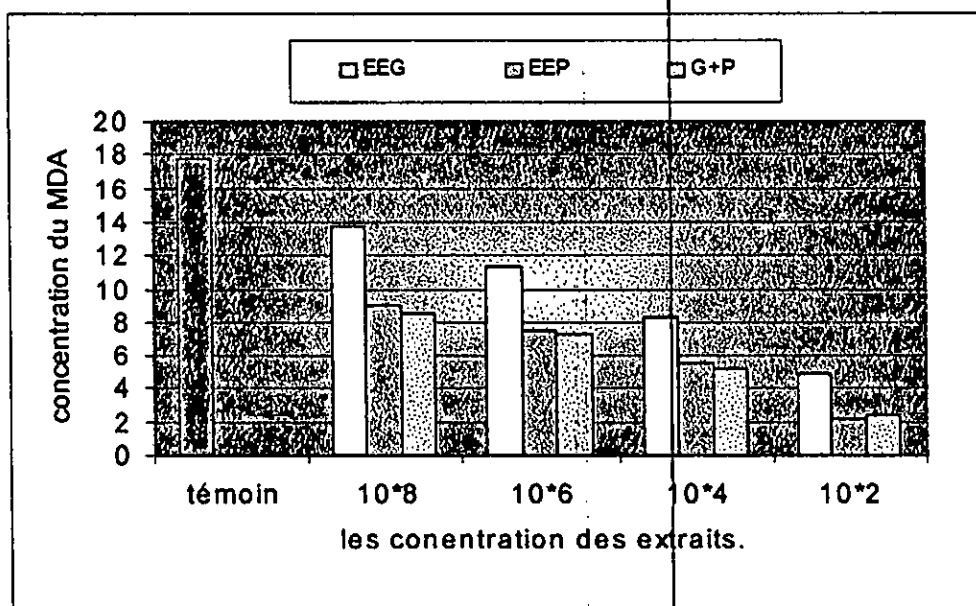


Figure 19. Variation des taux du MDA mitochondrial généré suite à la peroxydation lipidique induite *in vitro* par le FeCl₂/FeCl₃ en présence de différentes concentrations des extraits éthanoliques des rhizomes du Gingembre et de la propolis et de leur association.

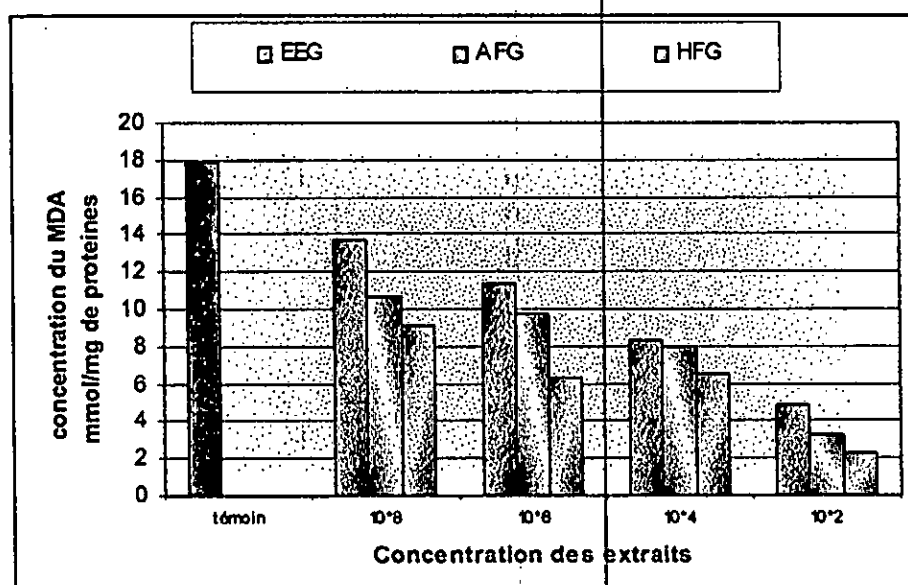


Figure 20. Variation des taux du MDA mitochondrial généré suite à la peroxydation lipidique induite *in vitro* par le FeCl₂/FeCl₃ en présence de différentes concentrations de l'extrait éthanolique des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques du Gingembre.

4-2 .Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

4-2-1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial et cytosolique

L'activité enzymatique de la Mn SOD ou la SOD mitochondrial ainsi que l'activité enzymatique de la Cu-Zn SOD ou SOD cytosolique est mesurée en présence des différentes concentrations des extraits éthanoliques de la propolis et des rhizomes du gingembre et de leur association, ainsi qu'en présence des aglycones flavoniques et des hétérosides flavoniques des rhizomes du Gingembre présentées dans le tableau 10 et les figures 21 et 22.

Nous remarquons que l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial hépatique augmente à 10^{-2} jusqu'à 10^{-4} avec tous les extraits cependant à 10^{-6} et 10^{-8} ces extraits n'ont pas d'effets sauf les aglycones flavonique qui montre une augmentation de l'activité enzymatique, d'une façon très significative, atteint 4387 et 3883,6 respectivement.

Pour la SOD cytosolique, on remarque qu'à la concentration de 10^{-6} les extraits n'ont pas d'effet alors qu'à 10^{-4} et 10^{-2} l'activité enzymatique augmente significativement.

Tableau 10 Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différente concentration *in vitro*:

Les extraits	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}
Extrait éthanolique du Gingembre	4755,5 ± 7.05 ***	4641,4 ± 12.10 ***	3160,4 ± 19.52 n.s	3132,2 ± 25.68 n.s
Extrait éthanolique de la propolis	8185 ± 17.49 ***	4600,7 ± 22.82 ***	3100 ± 16.44 n.s	30993 ± 15.40 n.s
Gingembre + propolis 50%-50%	4337.7 ± 57.90 ***	4633,5 ± 21.59 ***	3120,5 ± 5.65 ns	3085,8 ± 27.75 n.s
Aglycones flavonique du Gingembre	4931,5 ± 102,5 ***	4828,7 ± 40,9 ***	4387 ± 71,9 ***	3883,6 ± 30.8 **
Hétérosides flavoniques du Gingembre	4843,2 ± 134,4 ***	4541 ± 102,5 ***	3107 ± 256,8 n.s	3028 ± 30,8 n.s

Témoin: 3090 ± 125.3 UI/g de protéines

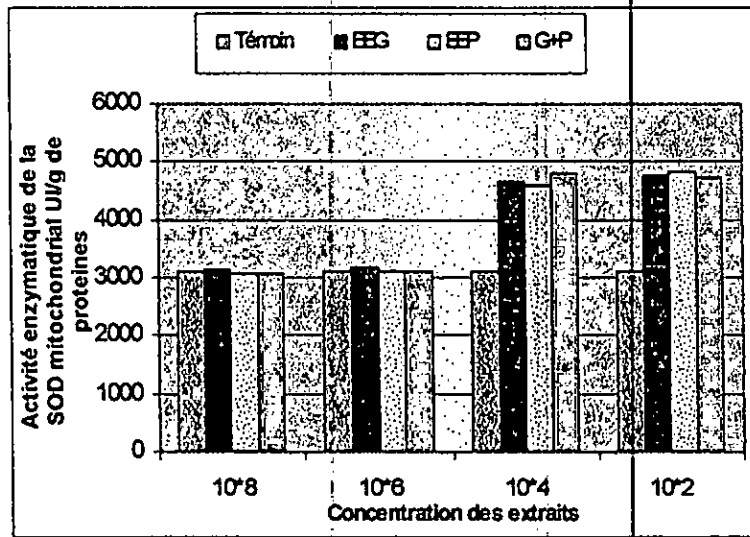


Figure 21. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différente concentration *in vitro*:

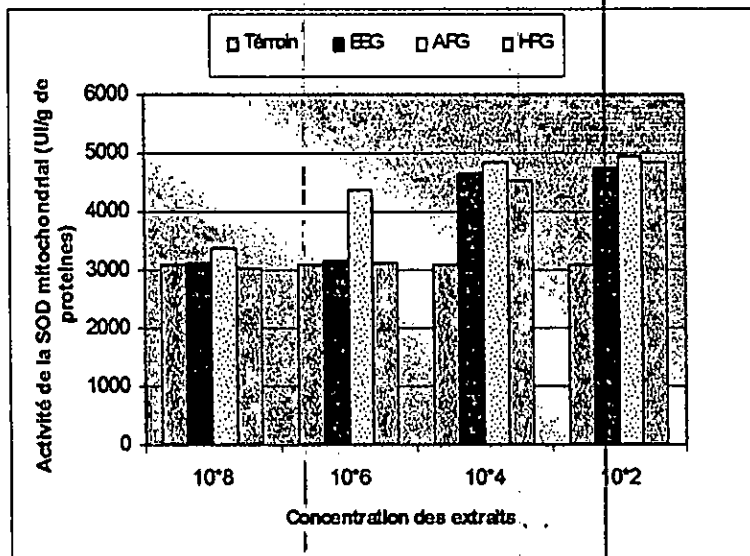


Figure 22. Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondrial hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

Tableau 11. Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

Extraits	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
Extrait éthanolique du Gingembre	3084 ± 32,18 ***	2409,16 ± 47,86 ***	1798,66 ± 214,13 n.s	1795 ± 134,25 n.s
Extrait éthanolique de la propolis	2968,33 ± 27,53 ***	2436,66 ± 25,16 ***	1797,8 ± 103,58 n.s	1796,66 ± 25,65 n.s
Association Gingembre + propolis	3031,66 ± 189,2 ***	2408,3 ± 294,61 ***	1798,33 ± 650,1 n.s	1798,03 ± 321,4 n.s
Aglycones flavonique du Gingembre	34784 ± 995,1 ***	2582 ± 320,4 ***	1861,76 ± 118,28 **	1800,68 ± 106,25 n.s
Hétérosides flavoniques du Gingembre	2531,33 ± 757,9 ***	2217 ± 328,8 ***	1796,66 ± 240,64 n.s	1795 ± 720,9 n.s

Témoin: 1794.2 ± 134.70 UI/g de protéines

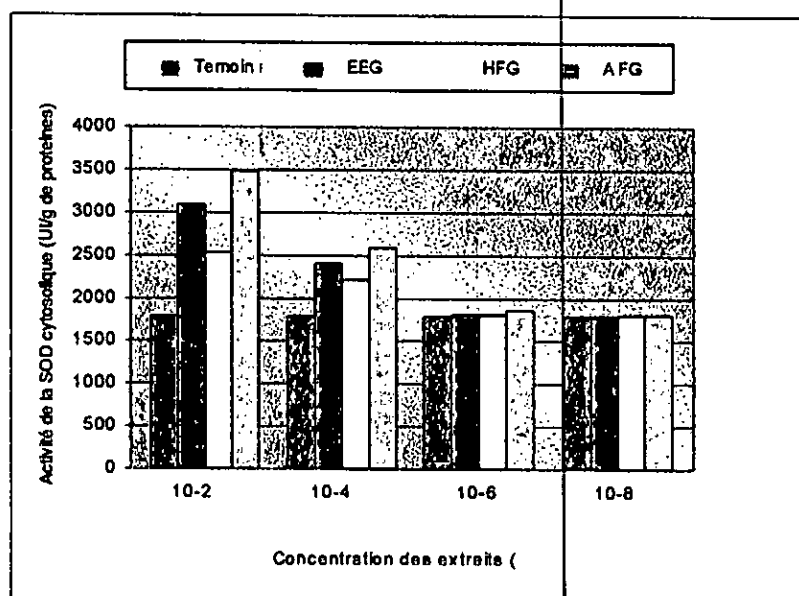


Figure 23. Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différentes concentrations *in vitro*:

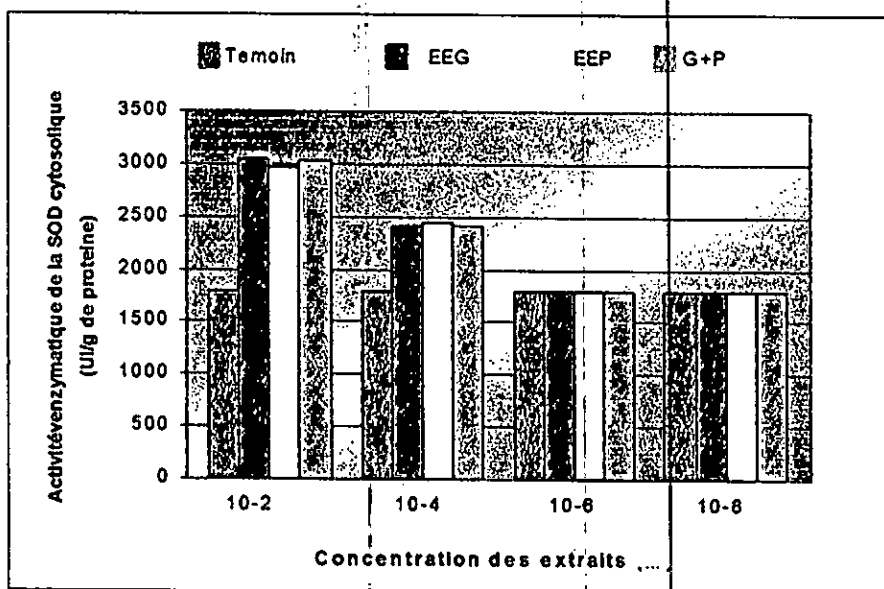


Figure 24. Variation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

4-2-2 .Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique

L'activité enzymatique de la catalase hépatique mitochondrial et cytosolique a été mesurée en présence de différents extraits des rhizomes du gingembre.

Les résultats sont représentés dans les figures 24 et 25 respectivement et dans les tableaux 12 et 13. Pour l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale, une augmentation non significative ($p > 0,05$) de l'activité enzymatique est observée à 10^{-8} avec tous les extraits. Dès la concentration 10^{-6} , on constate une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique avec les extraits du gingembre, les résultats obtenus avec tous les extraits sont comparables ($p > 0,05$). On constate une augmentation très hautement significative ($p < 0,01$) de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique à 10^{-2} de l'extrait éthanolique des aglycones flavoniques et des hétérosides qui atteint, 4641,5333.27, 4787.67 Respectivement.

Tableau 12. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavoniques et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

Extraits	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
Extrait éthanolique du Gingembre	2263,86±781,5 ***	2061,86±219,18 ***	1798,66± 214,13 **	1795±134,25 *
Extrait éthanolique de la propolis	2968,33± 27,53 ***	2436,66± 25,16 ***	1797,8± 103,58 **	1796,66± 25,65 *
Association Gingembre + propolis	3031,66± 189,2 ***	2408,3±294,61 ***	1798,33± 650,1 ***	1798,03± 321,4 **
Aglycones flavoniques du Gingembre	34784± 995,1 ***	2582± 320,4 ***	1861,76±118,28 ***	1800,68± 106,25 ***
Hétérosides flavoniques du Gingembre	2531,33±757,9 ***	2217± 328,8 ***	1796,66±240,64 **	1795± 720,9 **

Témoin: 1697.86±130.10 UI/g de protéines

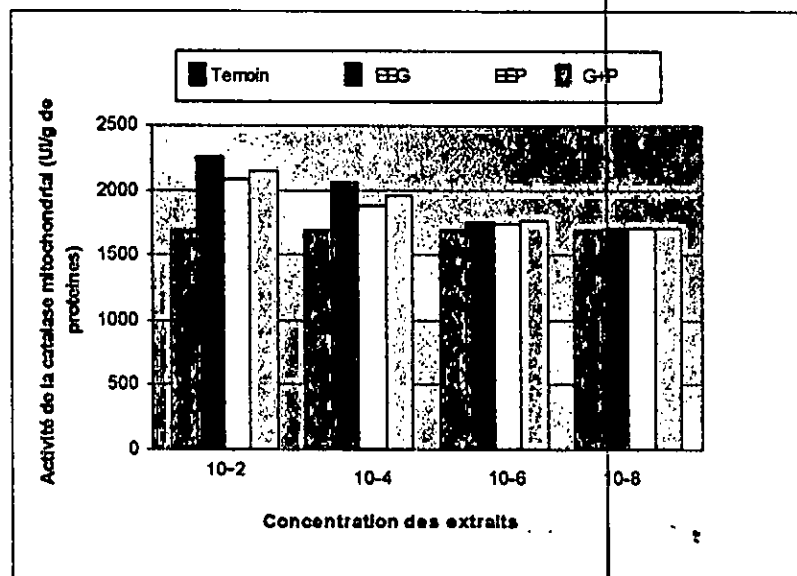


Figure 25. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différentes concentrations *in vitro*:

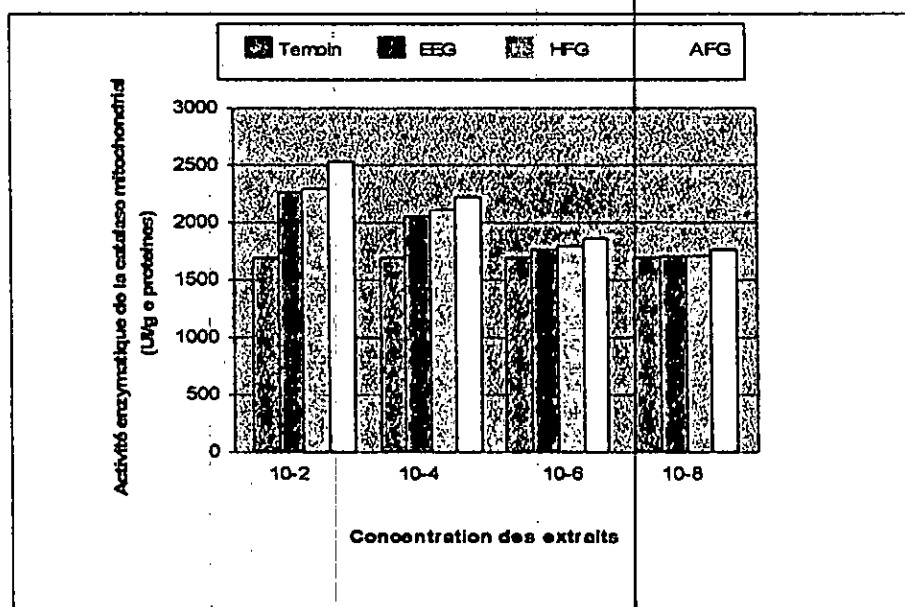


Figure 26. Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondrial hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

Tableau 13. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

Extraits	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
Extrait éthanolique du Gingembre	4641±664,58 ***	3866,23±167,90 ***	3300±119,5 **	3225±173,78 n.s
Extrait éthanolique de la propolis	3886,33±879,17 ***	3254,5±991,7 n.s	3243±722,7 n.s	3224.5±263,51 n.s
Association Gingembre + propolis	4092,43±102,88 ***	3647,93±106,83 ***	3289± 210,01 *	3219.9±771,8 n.s
Aglycones flavonique du Gingembre	5333,27 ±423,64 ***	3961,46± 233,96 ***	3345±100,87 **	3216± 277,36 n.s
Hétérosides flavoniques du Gingembre	4787,67±166,97 ***	4228,26± 278,8 ***	3310±348,23 **	3214.6± 131,42 n.s

Témoin: 3226.6 ±575.00 UI/g de protéines

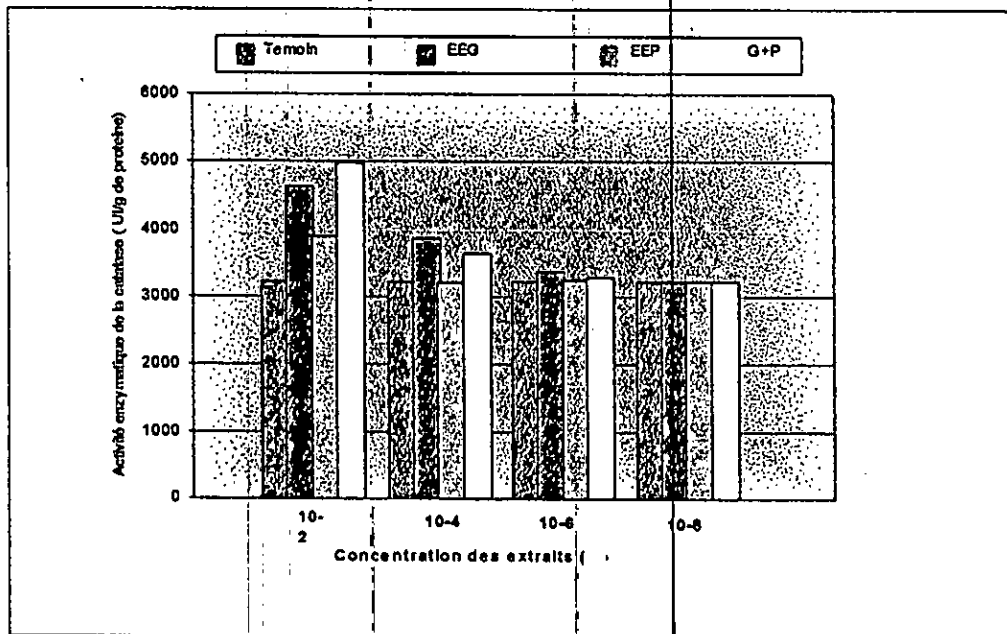


Figure 27. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique de rat, en présence des extraits éthanolique du Gingembre et de la propolis et de leur association à différente concentration *in vitro*

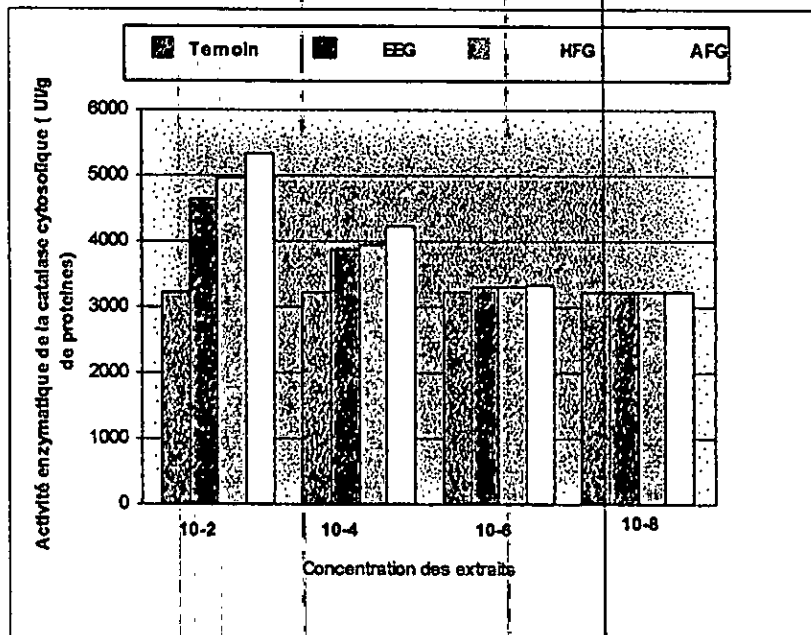


Figure 28. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique de rat, en présence de l'extrait éthanolique, des Aglycones flavonique et des Hétérosides flavoniques du Gingembre à différentes concentrations *in vitro*:

5-2. Evaluation du gonflement mitochondriale:

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 de l'extrait éthanolique, des aglycones et des hétérosides flavoniques des rhizomes du gingembre sur le gonflement mitochondrial ou sur l'induction ou l'inhibition de l'ouverture du (PTP) *in vitro*, sont représentés dans les tableaux 13, 14, 15, 16, 17, et les figures 29 et 30.

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 μ M de CaCl_2 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, les aglycones et l'association gingembre-propolis entraînent une diminution du gonflement mitochondrial de façon très hautement significative avec les deux concentrations étudiées, de la concentration 10^{-2} à 10^{-4} . En effet, on enregistre un gonflement de 31.51%, 38.14%, 33.92 % et 46.32%, 53.13%, 40.87% successivement avec l'extrait éthanolique et les aglycones, par rapport aux témoins, et une réduction du gonflement mitochondrial hautement significative à 10^{-6} , à 10^{-8} on enregistre une diminution non significative sauf avec l'extrait des aglycones elle est hautement significative, atteint 61.98%. Avec l'extrait des hétérosides flavoniques, on note une diminution hautement significative de 10^{-2} à 10^{-4} , à 10^{-6} elle est significative atteint 68.11% cependant elle est non significative à la concentration 10^{-8} .

Comparant ces résultats, on constate que l'extrait des aglycones a un effet sur le gonflement mitochondrial supérieur à celui des autres extraits.

Tableau 14. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations de l'extrait éthanolique du Gingembre *in vitro*.

	Témoin	EEG 10 ⁻²	EEG 10 ⁻⁴	EEG 10 ⁻⁶	EEG 10 ⁻⁸
Absorbance	-0,030±0,001	0,172±0,003	0,150±0,001	0,165±0,001	0,169±0,003
(Chaque min	-0,399±0,002	-0,099±0,001	-0,118±0,002	-0,200±0,003	-0,245±0,001
pendant	-0,533±0,007	-0,175±0,006	-0,190±0,001	-0,285±0,055	-0,304±0,006
5min)	-0,666±0,004	-0,203±0,003	-0,290±0,055	-0,345±0,058	-0,400±0,008
	-0,714±0,007	-0,222±0,004	-0,300±0,005	-0,399±0,002	-0,501±0,001
	-0,734±0,003	-0,246±0,001	-0,340±0,003	-0,402±0,004	-0,599±0,006
% du gonflement	100%	*** 31,51%	*** 46,32%	** 54,75%	n.s 81,60%

Tableau 15. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations de l'extrait éthanolique de la propolis *in vitro*

	Témoin	EEP 10 ⁻²	EEP 10 ⁻⁴	EEP 10 ⁻⁶	EEP 10 ⁻⁸
Absorbance	-0,030±0,001	0,156±0,002	0,126±0,001	0,114±0,001	0,100±0,001
(Chaque min	-0,399±0,002	-0,035±0,001	-0,058±0,001	-0,098±0,001	-0,110±0,037
pendant	-0,533±0,007	-0,069±0,005	-0,072±0,069	-0,115±0,005	-0,213±0,003
5min)	-0,666±0,004	-0,110±0,002	-0,179±0,004	-0,190±0,005	-0,290±0,006
	-0,714±0,007	-0,205±0,008	-0,280±0,004	-0,290±0,001	-0,345±0,005
	-0,734±0,003	-0,265±0,002	-0,381±0,007	-0,390±0,002	-0,390±0,007
% du gonflement	100%	*** 36,10%	** 51,90%	** 53,13%	** 61,17%

Tableau 16. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations des extraits éthanoliques du Gingembre et de la propolis en association *in vitro*.

	Témoin	G+P 10 ⁻²	G+P 10 ⁻⁴	G+P 10 ⁻⁶	G+P 10 ⁻⁸
Absorbance	-0,030±0,001	0,162±0,001	0,141±0,005	0,128±0,002	0,102±0,005
(Chaque min	-0,399±0,002	-0,049±0,001	-0,098±0,001	-0,102±0,005	-0,201±0,004
pendant	-0,533±0,007	-0,115±0,005	-0,220±0,001	-0,290±0,003	-0,310±0,002
5min)	-0,666±0,004	-0,189±0,006	-0,265±0,003	-0,381±0,003	-0,410±0,011
	-0,714±0,007	-0,211±0,001	-0,310±0,005	-0,441±0,002	-0,512±0,006
	-0,734±0,003	-0,249±0,005	-0,390±0,002	-0,501±0,001	-0,620±0,005
% du gonflement	100%	*** 33,92%	*** 53,13%	** 68,25%	n.s 84,86%

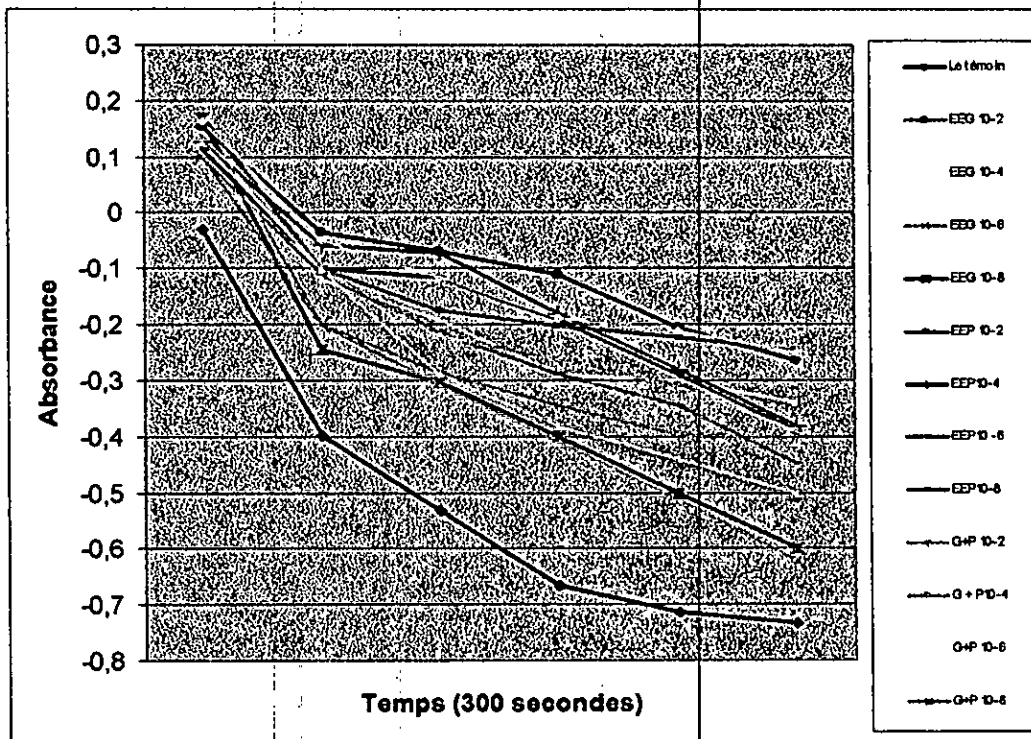


Figure 29. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations des extraits éthanoliques du Gingembre et de la propolis et de leur association *in vitro*.

Tableau 17. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations des aglycones du Gingembre *in vitro*.

	Témoin	AFG 10 ⁻²	AFG 10 ⁻⁴	AFG 10 ⁻⁶	AFG 10 ⁻⁸
Absorbance	-0,030±0,001	0,139±0,001	0,141±0,007	0,159±0,002	0,168±0,005
(Chaque min	-0,399±0,002	-0,080±0,003	-0,099±0,001	-0,122±0,001	-0,149±0,004
pendant	-0,533±0,007	-0,111±0,002	-0,172±0,003	-0,163±0,003	-0,193±0,001
5min)	-0,666±0,004	-0,175±0,003	-0,212±0,002	-0,245±0,004	-0,278±0,002
	-0,714±0,007	-0,213±0,002	-0,265±0,002	-0,311±0,006	-0,367±0,008
	-0,734±0,003	-0,299±0,003	-0,300±0,003	-0,387±0,001	-0,455±0,001
% du gonflement	100%	*** 38,14%	*** 40,87%	** 52,72%	** 61,98%

Tableau 18. Variation du gonflement mitochondrial hépatique de rat en fonction des différentes concentrations des hétérosides flavoniques du Gingembre *in vitro*.

	Témoin	HFG 10 ⁻²	HFG 10 ⁻⁴	HFG 10 ⁻⁶	HFG 10 ⁻⁸
Absorbance	-0,030±0,001	0,144±0,004	0,157±0,001	0,161±0,015	0,172±0,001
(Chaque min	-0,399±0,002	-0,100±0,002	-0,160±0,002	-0,171±0,002	-0,183±0,002
pendant	-0,533±0,007	-0,189±0,001	-0,290±0,001	-0,308±0,004	-0,359±0,005
5min)	-0,666±0,004	-0,289±0,002	-0,302±0,003	-0,342±0,002	-0,402±0,025
	-0,714±0,007	-0,345±0,002	-0,410±0,002	-0,403±0,004	-0,492±0,002
	-0,734±0,003	-0,401±0,003	-0,489±0,008	0,500±0,003	-0,541±0,001
% du gonflement	100%	** 54.63%	** 66.62%	* 68.11%	n.s 73.70%

Discussion

IV. Discussion :

Les êtres vivants y compris l'Homme, trouvent leur énergie dans la respiration mitochondriale, dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, un contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration aboutit à la production des ROS, une production que l'on peut comparer aux inévitables déchets des centrales industrielles d'énergie. Si usuellement cette production de radicaux super oxydes reste et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2 %), elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (efforts physiques, hypoxie).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactive de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme la vitamine E, C et Q ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par autre systèmes. Ainsi la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. Ce type d'antioxydants est appelé piégeurs ou éboueurs. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïde... etc

L'autre stratégie utilisée est de nature enzymatique, visant à détruire les super oxydes et peroxydes. Ainsi les super oxyde dismutase sont capable d'éliminer l'O₂- par une réaction de dis mutation.

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 [188,189]. Certains flavonoïdes agissent par action sur la production des ROS [190]. Il est clairement démontré aujourd'hui que certains de ces flavonoïdes possèdent des propriétés à la fois antioxydantes 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 [189,191,192].

Dans notre travail réalisé *in vitro* l' $O_2^{\cdot-}$ réduit le NBT au formazan à pH 7.4 à 50 nm. Mais après l'addition de nos extraits des rhizomes du gingembre, la formation du formazan est limitée et l'absorption à 560nm diminue. L'absorption à 0 nm est proportionnelle à la production de l' $O_2^{\cdot-}$. Nos extraits tester par cette méthode en une série de concentration : 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} réduisent significativement la production de l' $O_2^{\cdot-}$, cette activité est dose dépendante. C'est à dire le pourcentage de production de l' $O_2^{\cdot-}$ diminue à chaque fois qu'on augmente la concentration de l'extrait.

Cette réduction de la production mitochondriale de l'anion super oxyde est due, probablement, à la contribution de deux phénomènes ou mécanismes. Le premier, consiste à l'inhibition partielle des complexe III de la chaîne respiratoire, par l'extrait éthanolique et par les aglycones flavoniques et les hétérosides flavoniques des rhizomes du gingembre. Le mécanisme d'inhibition du complexe III peut impliquer une compétition entre les flavonoïdes de l'extrait brut ou les aglycones et les heterosides 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 [182]. En effet, une étude récente réalisée *in vitro* [188], montre que le trans-resvératrol, un polyphenol qui développe plusieurs propriétés antioxydantes de capture et d'inactivation des ROS [193], 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 [194]. 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' $O_2^{\cdot-}$ [195,196].

La diminution des radicaux $O_2^{\cdot-}$ dans la matrice mitochondriale peut être aussi expliquée par le pouvoir scavenger des flavonoïdes et des polyphénols en général. L'effet scavenger de l'extrait éthanolique, des glycosides et des aglycones flavoniques des rhizomes du gingembre Gingembre, est confirmé par la méthode au (DPPH $^{\circ}$), basée sur la réduction du radical 1,1 diphényle 2- picrylhydrazyl. La molécule du DPPH $^{\circ}$ est caractérisée comme radical libre physiologique stable, par la vertu de la délocalisation de l'électron célibataire sur la molécule entière, donc cette molécule ne dimérise pas comme c'est le cas avec la plupart des radicaux libres. La délocalisation donne la couleur violette qui caractérise la solution éthanolique du (DPPH $^{\circ}$) qui absorbe à 517 nm. Quand on ajoute à cette solution les différentes

concentration de nos extraits des rhizomes du Gingembre, la molécule du DPPH oxydée se réduit et la couleur violette devient jaune [197,198].

Les résultats obtenus avec les aglycones et les hétérosides flavoniques des rhizomes du gingembre, sont mieux que ceux de la quercétine présentant des propriétés antiradicalaires dirigées contre les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ [187].

Cette activité est probablement due à la diversité des aglycones et des hétérosides flavoniques des rhizomes du gingembre. La chromatographie monodimensionnelle sur couche mince a révélé onze types d'aglycones et onze type d'hétérosides dans notre extrait.

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 [30,152]. La chromatographie sur couche mince des rhizomes du gingembre a révélé la présence des aglycones flavoniques. Ces composés présentent les éléments de structure décrits ci-dessus et sont de ce fait des piègeurs efficaces de ROS.

Les cibles préférentielles des ROS sont les lipides conduisant à la peroxydation lipidique, provoquant ainsi, 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 [209, 210].

Cet effet protecteur est peut être du à la captation des molécules du MDA par les principes actifs du gingembre ou bien à l'inhibition des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique au niveau mitochondrial et cytosolique. Les extraits du gingembre 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, par son pouvoir chélateur des ions [211] et sa capacité à réduire le Fe^{+2} inhibant ainsi la réaction de fenton et

du potentiel de la membrane mitochondriale où serait impliqué le pore mitochondrial de transition de perméabilité (PTP) [204-206]. Nous avons évalué l'effet des extraits des rhizomes du gingembre dans la prévention de l'ouverture de ce pore qui constitue le point de non retour du processus apoptotique, et nos résultats ont montré un grand pouvoir inhibiteur du gonflement mitochondrial, surtout les glycones, entraînent une réduction très hautement significative et de façon concentration dépendante du gonflement mitochondrial induit par le CaCl_2 à $100 \mu\text{M}$. En effet, à 10^{-2} et 10^{-4} , on enregistre une réduction de l'amplitude du gonflement par 38.14% et 40.87% respectivement.

La réduction de l'amplitude du gonflement mitochondrial peut être expliquée par le fait que les principes actifs du gingembre 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 bongkreique qui en se liant sur l'ANT inhibe le PTP et le gonflement mitochondrial, ou bien à la capacité de ces principes actifs à piéger les radicaux hydroxyles responsable de l'oxydation des groupements thiol (SH) et l'ouverture du PTP. On peut proposer également que les flavonoïdes par leur 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 des rhizomes du gingembre agissent par un mécanisme antiparallèle à celui de la curcumine [207].

la peroxydation des acides gras polyinsaturés [212]. 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 [30.213].

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.

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 [199, 200, 201]:

Notre étude *in vitro* montre que les rhizomes du gingembre, les aglycones et les hétérosides flavoniques du gingembre additionnés aux fractions mitochondriales entraînent une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique des enzymes antioxydante la SOD et la catalase mitochondriale. L'explication probable de cet effet *in vitro* est l'activation de l'enzyme par nos extraits. Aucune étude à notre connaissance n'a été réalisée sur l'effet du gingembre sur l'activité enzymatique de la SOD et la CAT mais nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs études montrant la réduction de l'activité enzymatique lors d'un stress [202, 203].

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 [194]. 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

Conclusion

V.CONCLUSION :

La mitochondrie central énergétique de l'organisme est la source principale de la production des ROS, ces dernier sont indispensable à la physiologie de l'organisme mais leurs excès dans l'organisme aboutit à de nombreux sévère pathologie.. La protection des fonctions mitochondriales et des systèmes antioxydants par les molécules naturelles comme les flavonoïdes semble constituer une stratégie très intéressante dans la prévention de plusieurs pathologies graves.

D'après nos résultats il s'avère que les flavonoïdes des rhizomes du Gingembre ont montré un grand pouvoir antioxydant:

- Ils sont des piègeurs puissants des radicaux libres oxygénés, effet confirmé par le teste au DPPH.
- Ils inhibent la production des radicaux superoxydes par la mitochondrie essentiellement par le complexe III en protégeant ainsi les membranes cellulaires, mitochondriales de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes de la peroxydation protéique.
- Ils inhibent le gonflement mitochondrial et par la suite l'apoptose par empêchement de l'oxydation des groupements thiols de pore de transition de perméabilité.
- Ils augmente l'activité enzymatique des enzymes antioxydante , la SOD et la catalase.

Nos résultats sont encourageant néanmoins d'autres études complémentaires seront nécessaires. Dans ce cadre et en perspective, on propose :

- Etude in vivo de l'activité antioxydante des rhizomes du Gingembre.
- Etude sur des modèles de cellules en culture.
- Etude polarographique pour bien préciser le site d'action des flavonoïdes des rhizomes du Gingembre sur les complexes de la chaîne respiratoire.
- Détermination des concentrations prooxydantes de l'extrait éthanolique et des hétérosides ainsi que des aglyconnes flavoniques des rhizomes du Gingembre.
- Il sera important de faire l'identification, des études analytiques des flavonoïdes et des polyphénols en général des rhizomes du Gingembre et d'exprimer la relation *structure-activité antioxydante* des flavonoïdes.
- En fin, il est nécessaire de faire des expériences par des molécules pures des rhizomes du Gingembre (des acides phénols, des flavonoïdes, des terpènes...etc.) pour bien déterminer les classes de molécules potentiellement actives.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques.

1. Shnept E., Origins of plastids. *Levin.RA. éd, London. 1992*pp. 53-76.
2. Vellai T, and Vida G. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc. R. Soc. London B: Biol Sci* 1999; 266: 1571-1577.
3. Guéry B, Choukroun G, Westeel PF, Noël LH, Cordonnier C, Rotig A, Munnich A, and Chauveau D. Néphropaties de l'adulte par mutation A324G de l'ADN mitochondrial. *Flammarion Médecine-Sciences—Actualités néphrologiques* 2002. pp 109-126.
4. Marc M., Biologie cellulaire. *MASSON, Paris, 8^{me} éd. 2000*pp 279-311.
5. Overly C. C., Rieff H. I. and Hollenbeck P. J., Organelle motility and metabolism in axons VS dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. cell. Sci*, 1996.109: 971- 980.
6. Hsin-Chen LEE, Pen-Hui Yin, Ching-Wen CHL, and Yau-Huei Wel. Increase of mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 2000; 348: 425-432.
7. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD. Energy conversion: Mitochondria and chloroplasts. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (eds) *Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York* 1994, p 653-720.
8. Wallace D. C., Broion M. D. and Lott M. T., Mitochondrial genetics. In: Rimon D.L., Connor J.M., ryeriz R.E., Emaergy AEH éd, principles and practice of medical genetics. *Churcill Livingstone, London*1997, pp 277-332.
9. Callen J. C., Biologie cellulaire des molécules aux organismes. *Dunod éd, 1999.Paris*, pp 52-72.
10. Giuseppe Petrosillo, Francesca M Ruggiero, and Giuseppe Paradies. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *The FASEB Journal* 2003; 17: 2202-2208.
11. Smeitink J, van den Heuvel L, and DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 342-352.
12. Jan AM Smeitink, Lambert WPJ Van den Heuvel, Werer JH Koopman, Leo JJ Nejtman, Cristina Ugalde, and Peter HGM Willems. Cell biological consequences of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Current Neurovascular Research* 2004; 1: 29-40.
13. Gilkerson RW, Selker JML, Capaldi RA. The crystal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 2003; 546: 355-358.

14. Sarate M., oxidative phosphorylation at the fin of the siecle. *Science*, 1999.283: 1488-1493.
15. Peter N., Campbell A., Anthony D., Biochimie illustrée. Maloine éd, 2002. pp 213-238.
16. Etienne HM. La voie de réduction dans la mutation des cytochromes de type c mitochondriaux : étude de la protéine CCMH d'Arabidopsis thaliana. Thèse de doctorat, *Louis Pasteur Strasbourg I* 2004, pp: 1-3
17. Maria LG, Milena MP, Annalisa B, Adrea B, Anna F, Carla B, Gabriella F, Giovanna PC, and Giorgio L. Mitochondrial production of reactive oxygen species and role of coenzyme Q as an antioxidant. *Experimental Biology and Medicine* 2003; 228: 506-513.
18. Scheffer L F., Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliver Rev.*, 2001.49: 3-26.
19. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, and Korsmeyer SJ. Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
20. Jean-Claude Callen. Biologie cellulaire des molécules aux organismes. Dunod, Paris 1999, pp 282-314.
21. Morin D, Vassilios Papadoupoulos, and Tillement JP. Prevention of cell damage in ischemia: novel molecular targets in mitochondria. *Expert Opin Ther Targets* 2002 ; 6 : 315-334.
22. Servais S., Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'age et d'une supplémentation en oméga-3.thèse de doctorat, *Université Claude Bernard- Lyon I, France*, 2004. pp.18-31
23. Halliwell, B. Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995 .61: 670S-677S.
24. Haton C., Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thèse de doctorat de l'université Paris VI, France*, 2005.pp 43-57.
25. YoshikawaT., Yamamoto., Naitoy., Free radicals in chemistry, biology and medicine, Ed. Oica international Londres, 2000.
26. Drog W., Free radicals in the physiological control of cell function. *Cell. Physiol. Rev.*2002., 82: 42.
27. Thannickal V. J., Fanburg B. L., Réactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol*, 2000. 279: 1005-1028.
28. Samia Ahmad. Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. *Kluwer Academic Publishers Boston Hardbound* 1995.

29. **Andreyev Yu A, Kushnareva Yu E, and Starkov AA.** Review: mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 2005; 70: 200-214.
30. **Marfak A.** 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*, 2003. pp 1-13.
31. **Gutteridge.** Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free radic. Res commun*, 1993.19:141- 158.
32. **Favier A.**, Le stress oxydant : Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des machanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique novembre*, 2003.pp 108-115
33. **Wolin .M.S.** Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms microcirculation, 1996, vol3, p 1-170
34. **Brookes PS.**Mitochondrial H (+) leak and ROS generation: an odd couple.*Free Radic Biol Med* 2005, 38 (1): 12-23
35. **Smith RAJ, Kelso GF, Blaikie FH, Porteous CM, Ledgerwood EC, Hughest G, James AM, Ross MF, Asin-Cayuela J, Cochemé HM, Filipovska A, and Murphy MP.** Using mitochondria-targeted molecules to study mitochondrial radical production and its consequences. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1295-1299.
36. **Boveris A, Costa LE, Poderoso JJ, Carreras MC, Cadenas E.** Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899:121-135.
37. **Yau-Huel Wei, and Hsin -Chen Lee.** Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227: 671-682.
38. **Kunduzova OR, Bianchi P, Parini A, and Cambon C.** Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2002; 448: 225-230.
39. **Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompert G, Cambon C, Parini A, and Frances B.** Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: 1460-1467.
40. **Mc Lennan HR, and Degli Esposti M.** The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32: 153-162.
41. **Sies H.** Physiological thiols compounds exert pro-and-antioxidant effects respectively in iron- and copper dependent oxidation of human low density lipoproteins. *BBA* 1999; 1345: 215-221.

42. Miwa S, St-Pierre J, Partridge L, and Brand MD. Superoxide and hydrogen peroxide production by Drosophila mitochondria. *Free Rad Biol Med* 2003; 35: 938-948.
43. Tretter L, and Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalysed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* 2004; 24: 7771-7778.
44. Starkov A, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Brown SE, Patel MS, and Beal MF. Mitochondrial ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* 2004; 24: 7779-7788.
45. Liu Y, Fiskum G, and Schubert D. Generation of reactive species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002; 80: 780-787.
46. Sipos, I, Tretter L, and Adam-Vizi V. Quantitative relation ship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve mitochondria. *J. Neurochem* 2003; 84: 112-118.
47. Genova, ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, and Lenaz G. The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulphur cluster 2. *FEBS Lett* 2001; 505: 364-368.
48. Korshunov SS, Korkina OV, Ruuge EK, Skulachev VP, and Starkov AA. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett* 1998; 435: 215-218.
49. Murphy MP. Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends Biotechnol* 1997; 15: 326-330.
50. Michael P, and Christiaan L. Apoptosis and aging: role of the mitochondria. *Journal of Gerontology: BIOLOGICAL SCIENCES* 2001; 56:475-482.
51. Degli Esposti M, Ballester F, Timoneda J, Crimi M, Lenaz G. The oxidation of ubiquinol by the isolated 'Rieske' iron- sulphur protein in solution. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283:258-265.
52. Yulia K, Anne NM, and Alexander A. Complex I mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P⁺) oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002 ; 368 : 545-553.
53. Morin D, Thierry Hauet, Michael Spedding, and Tillement JP. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Advances Drug Delivery Review* 2001.
54. Herrero A, and Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and non synaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32: 609-615.
55. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuk SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.

56. Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, and Jap BK. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 1998; 281: 64-71.
57. Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YL, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, and Kim SH. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* 1998; 392: 677-684.
58. Sies H. Physiological thiols compounds exert pro-and-antioxidant effects respectively in iron- and copper dependent oxidation of human low density lipoproteins. *BBA* 1999; 1345: 215-221.
59. Dardik R, Varon D, Tamarin L. Homocystein and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation. *Thromb Haemost* 2000; 83: 338-344.
60. Castronovo V. Alimentation et cancer. *Rev Med Liege* 2003; 58: 231-239
61. Shiva.S., Crawford.J.H., Ramachaudran.A., Creaser.E.K., Hillson.T., Brooks.P.S., Patel.R.P., Darley.V.M. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Bioche; JP*. 2004
62. Stevnsner T., Thorshund T., de Souza- Pinto N.C., Bohr V.A. Mitochondrial repair of 8 oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol* .2002, 37: 1189-1196.
63. Bohr V. A., Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med*, 2002.32: 804-812.
64. Etchtay,K.S., Murphy M.P., Smith P.A., TalboD.A., Brand M.D. Supperoxyde activates mitochondrial uncoupling proteins 2 for,es the matrix side. Studies using targeted antioxidants, *J.Biol che*. 2003.277:47129-47135.
65. Bohr V. A., Stevnsner T. and De Souza- Pinto N. C., Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 2002,286: 127-134.
66. Halliwell B., Gutteridge JM. Free radicals, lipid peroxidation and cell damage. *Lacent* 1984,2. 8411: 1095.
67. Esterbauer H., Schaur RJ and wollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, alonaldehyd and related aldehydes. *Free radic Biol Med*. 1991, 11. 1: 81-128
68. Chaudire J., Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in ling cell. *Free Radic. Damag Control*, 1994.25-65.
69. Mates J.M., Perez-GomezC., Nunez de Castro, I. Antioxydant enzy;es and hu;an diseases. *Clin Biochem* 32 .1999. 595-603

70. Comhair S.A. and Erzurum S. C., Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. physiol*, 2002.283: L 246-255.
71. Peter N., Campbell A., Anthony D., Biochimie illustrée. Maloine éd, 2002, pp 213-238.
72. Mitsui A., Hirakawa T., Yodoi J. Reactive oxygen-reducing and protein- refolding activities of adult T cell leukemia- derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res commun* 1992, 186 .3 : 1220-1226
73. Liu Y., Liu J., Iszard M.B., Andrews GK., Palmitert 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
74. Bremner G., Marzo L, Zamzanu N., Susin S. and Vieiral Kroemer G. Cooperation mortelle entre Bax et le ANT pour le contrôle mitochondrial de l'apoptose. *Med. Science*, 1993. 14: 1399-13401.
75. Bauman J.W., Liu Y.P., Klassen C.D. Increase in metallothionein by chmechals that induce oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991, 110 -2- : 347-357-4.
76. Koropatnick J; Leibbrand M, Cherien M.G. Organ- specific metallothionein induction in mice by X irradiation. *Radiat Res* 1989, 119 -2- : 356-365
77. Sato M, Sasaki M, Hojo H. Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor- alpha in rat tissues. *Int J Immunopharmacol* 1994, 16 -2- : 187 -195
78. Good M., Vasak M. Iron 2- substituted metallothionein: evidence for the existence of iron – thiolate clusters. *Biochemistry*. 1986: 25 -26- : 8353-8356.
79. Dean RT., Cheesman KH. Vitamin E protect proteins against free radical damage in lipid environment. *Biochem Biophys Res Commun* 1987,148.3: 1277-1282.
80. Scandalias J. G., Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant. Physiol*, 1993.101: 7-12.
81. Gardner P. R., Raineri L, Epstein L. B., and Whitec. W., Superoxide radical and iron modulate aconitase in mammalian cells. *J. Biol. Chem*, 1995.270: 13399- 13405.
82. Ho Y.S., Xiong Y., M a W., Spector A. and Ho D.S., Mice lacking catalase developed normally but slow differential sensitively to oxidant tissue injury. *J. Biol. Chem*, 2004.297: 32804- 32812.
83. Antunes F., Han D. and Cadenes E., Relative contribution of heart mitochondria glutathione peroxydase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo. *Free .Rad. Biol Med*, 2002.20: 463- 466.
84. Coline H. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat, Paris 6- Pierre et Marie Curie 2005, pp : 43-58.

85. **Lenzen S, Drinkgern J, and Tiedge M.** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Rad . Biol Med* 1996; 20: 463-466.
86. **Pelletier M, and Vallette FM.** Apoptose et maladies neurodégénératives. *La Lettre du Pharmacologue* 2001 ; 15 : 159-167.
87. **Young IS, Woodside JV.** Antioxidant in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186.
88. **Mario O.** Analyse fonctionnelle d'homologues végétaux de Bax Inhibitor-1 et développement d'un modèle de mort cellulaire programmée induite par Bax chez des cultures cellulaires de *Nicotiana tabacum*. Thèse de doctorat, *Laval QUÉBEC*, 2004.
89. **Olson M. and Kornbluth S.,** Mitochondria in Apoptosis and Human Disease. *Curr Mol Med*, 2001. 1(1): 91-122.
90. **Brossy-Wetzel E., Neumeyer D. D., Green D. R.,** Mitochondrial C- release in apoptosis occurs apstream of DEVD – Specific Caspase activation and independtly of mitochondrial transmembrane depolarisation. *EMBO*, 1998.17: 37-49.
91. **Vaux D.L. & Korsmeyer, S.J.** Cell death in development 1999. *Cell*, 96: 245-54
92. **Hengartner 2000. Hengartner N.O.,** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. 407: 770- 776.
93. **Association Francaise des Enseignants de Chimie Thérapeutiques (AFECT),** Médicaments antitumoraux et perspective dans le traitement des cancers. *TEC. et DOC. éd, paris, 2004.* pp 364-410.
94. **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.
95. **Vander M.S.,** Bcl-XL prevents cell death following growth factor with drawal by facilitaling mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell*, 1999. 3: 159- 167.
96. **Pollack. M and Leeuwenburgh C,** Apoptosis and Aging: Role of the Mitochondria. *Gerontology*, 2001. 56A 11: B475-B482.
97. **Bernadi P, vassanelli S, veronese P, colonna R, szabo I, zoratti M.** modulation of the mitonchondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. boils. chem.* 1992. 267: 2934-9.
98. **Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R and P.** regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitonchondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biovhim Biophys Acta.* 1994. 1187: 255-9.
99. **Ly JD., Grubb.DR., Lawen A.** The mitochondrial membrane potential in apoptosis an unupdate. *Apoptosis.* 2003. 8: 115-28
100. **Jurgensmeier.JM., Xie.Z., Deveraux.Q., Ellerby.L., Bredeseu.D .,**

- Reed.JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolate mitochondria. *Proc natl acad sci USA*.1989 .95: 4997-5002
101. De Giorgi.F., Lartigue.L., Bauer.MK., Shubert A., Gimm S., Hanson. GT., Remington. ST., Youle.RJ., Ichas.F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEBJ*.2002 .16:607-9
 102. Antonsson.B., Mentessuit.S., Taüper.S., EskesR., Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel- forming activity in liposomes and trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem.J* 2000 .345.2: 271-8
 103. Korsmeyer.SJ., Wei.ML., Saito.M., Weiler.S., OhKJ.,Schlessingr.PH. Proapoptotic cascade activates BID which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death differ*. 2000. 7: 1166-11
 104. Shimizu.S., Ide.T., Yanaguida.T., Tsujimoto.Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage- dependent anion channel that is permeable to cytochrom c. *J.Biol.Chem*. 2000 .275: 12321-5
 105. Vander Heiden.MG., Chaudel.NS., Shumacker PT., Thompson.CB . Bcl-XI prevents cell death folloing growth factor with drawel by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchang. *Mol. Cell* .1999. 3: 159-67
 106. Zamzami.N. Kroemer.G. The mitochondrion in apoptosis how pandors box open .*Nat Rev Mol Cel Biol*.2001 .2:67-71
 107. Klein JA, Longo- Guess CM, rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. the harlequin mouse mulation dowregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 2002. 419: 367-74.
 108. Zhivotovsky.B., Hansson.KP., Orrenius.S. Back to the future: the role of cytochrome c in cell death. *Cell Death Diff*. 1998. 5: 459-60.
 109. Slee EA, harte MT, Kluch RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES Green DR and Martin SJ .Ordering the cytochrome cinitiated caspase cascade : hierarchical activation of caspases -2 -3, -6, -7, -8, and -10 in av caspase -9dependent manner .*J cell boil*.1999.144:281-92 (b).
 110. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, simpson RJ and vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* .2000. 102: 43-53. !
 111. Ameissen. J.C. La sculpture du vivant, le suicide cellulaire ou la mort créatrice. 1999 2nd édition 2000. Paris.
 112. Mate WS, Ortiz-lombardia M, boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, Penninger J, Kroemer G and Alzari PM, the crystal structure of the mouse apoptosis inducing factor AIF .*Nat Struct Biol*. 2002. 9: 442-6.
 113. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE Brothers GM,

- Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninge JM and Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature*. 1999. 397: 441-6.
114. Li HL, Zhu H, Xu CJ and Wang X. Endonuclease G is an apoptosis Dnase when released from mitochondria. *Nature*. 2001. 412: 95-9.
115. Van loo G, schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R and vandenabeele P. endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell death*. 2001.8: 1136-42.
116. Faccio L, fusco C, chen A, martinotti S, bonventre JV, Zervos AS. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J. boill chem*. 2000. 275 : 2581-8.
117. Savopoulos JW, Carter PS, Turconi S, Pettman GR, Karran EH, Gray CW, Ward RV, Jenkins O and Casey CL. Expression, purification, functional analysis of the human serine protease Htr A2. *Protein Expr Purif*. 2000: 227-34.
118. Van loo G, van Gurp M, Depuydt B, srinivasula SM, Rodriguez I, alnemri ES, gevaert K, vandekerckhove J, declercq W and vandenabeele P. the serine protease Omi/Htr A2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi with caspase inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell. death differs*. 2002.9 : 20-
119. Vehagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RI, Simpson RJ and vaux DL. Htr A2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*. 2002.277: 445-54.
120. Enari M, hug H and nagata S. involvement of an ICE-like protease in fas-mediated apoptosis. *Nature*. 1995. 375: 78-81.
121. Longthorne VL and Williams GT. Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J*. 1997. 16: 3805-12.
122. Kischkel FC, hellbardt S, behrmann I, gremer M, pawlita M, krammer PH, peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (fas/CD95) -associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*. 1995. 14: 5579-88.
123. Slee EA, Adrain C and Martin SJ. Serial Killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell. Death. differs*. 1999. 6: 1067-74 (a).
124. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, chiannikulchai N, beckmann JS, mett IL, rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, sobe T, avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P and Wallach D. Targeted disruption of the mouse caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998.2 :

267-76.

125. **Algericas-Shimnich.A., Shenl-Bbarnhart BC, Murman.AE., Burlkhardt.JK., Peter.ME.** Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cel Biol.* 2002. 28:207-20
126. **Vanessa C., Christine M., Catherine B., Nicole C.** The splancnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of compound. *Am J physiol*, 2003.284: G980-988.
127. **Alan L., Miller N. D.** Antioxidant flavonoids: Sturcture, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1996. 1(2): 103-111.
128. **Rajnerayanama K., Reddy M., Charluvadi M. R and Krishna D. R.,** Bioflavonoides: Classification, pharmacological, Biochemical effect and therapeutic potential. 2001. *Indian Journal of pharmacology*, 33: 2-16.
129. **Chanyallon C., Blanchema-Son P., Cance B., 1994.** Les flavonoides. *Act Med Angiologie*, 197: 3846- 3850.
130. **Hanazaki Y.,Ogawa S.,Fukui S.,1994.** The correlation beetweren active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol Med*, 16: 845- 850.
131. **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.
132. **Williams R.I., Spencer J.P., Rice-Evans C.,** Flavonoids: Antioxidents or signalling molecules. *Free Radic Biol Med*, 2004.36(7): 838- 849.
133. **Cheng I. F., Breen K.,** On the ability of form flavonoid, bacilien, luteolin, naringenin and quercetin, to supress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biomaterials*, 2000. 13(1): 77- 83.
134. **Ligeret H., Barthelemy S., Zini R. T., tillement J.P., Labidalle S., and Morin D.,** Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004. 36: 919- 929.
135. **Chin O.K., Kim D.O., Lee C.Y.,** Superoxide radical scavenging activity of the m polyphenols in frush plums. *J Agric Food Chem*, 2003.51(27):
136. **Bruneton, J.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3^{ème} éd.). Paris: *Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier*, 1999, 1120p.
137. **Justen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T.** Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal*

138. **Bronner, W.E.; Beecher, G.R.** Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*. 1995, 705: 247-256.
139. **Hollman, P.C.H.; Hertog, M.G.L.; Katan, M.B.** Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem.* 1996, 57: 43-46.
140. **Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M.E.J.; McDonald, M.S.** Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J. Chromatography A*. 1997, 761: 315-321.
141. **Bruneton J.,** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (2^{ème} éd.). Paris: éditions Tec & Doc Lavoisier, 1993pp 266-293.
142. **Bankova V.,** Recent trends and important developments in propolis research. *E CAM*, 2005. 2(1): 29-33.
143. **Bankova V., Melena P., and Anna-Gloria S.,** Chemical composition on European propolis: Expected and Unexpected results. *Z.Naturforsch*, 2002.57C: 530-533
144. **Chanvallon C, Blanchema Son P., Cance-Sanchez B.,** Les flavonoides. *Act Med Angiology*, 1994.179: 3846- 3850.
145. **Marfak A.,** 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*, 2003pp 24-42.
146. **Halliwell, B.** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.* 1994, 52: 253-265
147. **Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S.** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 1994, 16: 845-850.
148. **Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van-Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D.** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*1998, 61: 71-76.
149. **Landolfi, R.; Mower, R.L.; Steiner, M.** Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol.* 1984, 33:1525-1530.
150. **Brown, J. E.; Khodr, H.; Hider, R.C.; Rice-Evans, C.** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 1998, 330, 1173-1178.
151. **Morris, C.J.; Earl, J.R.; Trenam, C.W.; Blake, D.R.** Reactive oxygen species and iron—a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*

- 1995, 27: 109-122.
152. 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.; Bast, A. Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996, 20: 331-342.
153. Jovanovic, S.V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116: 4846-4851.
154. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20: 933-956.
155. Cotelle, N.; Bernier, J.L.; Catteau, J.P.; Pommery, J.; Wallet, J.C.; Gaydou, E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones, *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20: 35-43.
156. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic. Biol. Med.* 1997, 22: 749-760.
157. Bors, W.; Michel, C.; Stettmaeir, K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* 1997, 6: 343-355.
158. Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.* 2000, 63: 1035-1042.
159. Dugas, A.J.; Castaneda-Acosta, J.; Bonin, G.C.; Price, K.L.; Fischer, N.H. Winston, G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod.* 2000, 63: 327-31.
160. Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H., Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *J.Agr. Food Chem*, 1997,45: 30-34.
161. Kessler M., Ubeau G., Jung L., Anti-and pro-oxydant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol.*, 2002 55: 1-11.
162. Elicoh-Middleton Jr., Chithan K., and Theoharis C., Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 2000,4(52): 673-751.
163. Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci.* 1999, 65: 337-53.
164. Izzo, A.A. PAF and the digestive tract. A review. *J Pharm Pharmacol.* 1996, 48: 1103- 11.
165. Bracke, M.; Vyncke, B.; Opdenakker, G.; Foidart, J.M.; De Pestel, G.;

- Mareel, M. Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro. *Clin Exp Metastasis*. 1991, 9:13-25.
166. Larocca, L.M.; Giustacchini, M.; Maggiano, N.; Ranelletti, F.O.; Piantelli, M.; Alcini, E.; Capelli, A. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *J Urol*. 1994, 152: 1029- 1033.
167. Scutt, A.; Meghji, S.; Canniff, J.P.; Harvey, W. Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia*. 1987, 43: 391-393.
168. Makimura, M.; Hirasawa, M.; Kobayashi, K.; Indo, J.; Sakanaka, S.; Taguchi, T.; Otake, S. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol*. 1993; 64: 630-636.
169. Chaudhry, P.S.; Cabrera, J.; Juliani, H.R.; Varma, S.D. Inhibition of human lens aldose réductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol*. 1983, 32: 1995-
170. Ong, K.C.; Khoo, H.E. Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol*. 1997, 29: 121-126.
171. Ong, K.C.; Khoo, H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci*. 2000, 67: 1695-1705.
172. Hertog, M.G.; Feskens, E.J.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993, 342:1007-1011.
173. Chu, S.C.; Hsieh, Y.S.; Lin, J.Y. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod*. 1992, 55: 179-183.
174. Bruneton J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (2^{ème} éd.). Paris: éditions Tec & Doc Lavoisier, 1993. pp 266-293.
175. Norman Sherly.C. Encyclopédie des remèdes naturels. *Copyrhit C 1999*. pp47
176. Kikuzaki, H., Tsai, S-M., Nakatanim N. Gingerdiol related compounds from the rhizomes of Zingiber officinale, phytochemistry, 1992. 31, 1783-1786.
177. Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M., Plant Drug Analysis a thin layer chromatography. *Springer- Verlag Berlin Heidelberg* 1983. pp 164
178. Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Gerard B., Rotig A., Saudubray G. M., Munnich A., Biochemical and biomolecular investigation in the respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 1994228. 35-51.
179. Lowry OH, Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R.J.. Protein

- measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951;193: 265-75, 1951.
180. Iqbal M., Som D.S., Yasumasa O., Masayoshi F., and Shigero O. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddy male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and toxicology*, 2003. 92: 33-38.
 181. Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Le Ridant A., Structure-property relationship of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 1998;25: 113-120.
 182. Zini R., Morin C., Bertelli A. A., Tillement J. P., Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1999;25:87-97.
 183. Beauchamp C., Fridovich I., Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem*, 1971. 44: 276-287.
 184. Claiborne A., Catalase activity. In: CRC handbook of methods for oxygen radical research. Ed Greenwald RA, CRC Press, Boca Raton, 1985.283-284.
 185. Kristal B. S., Park B. K. and Yu B. P., 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 1996. 271: 6033-6038.
 186. Association Française de Normalisation. Recueil des normes françaises, Essai-écotoxicologiques : environnement. ed AFNOR, pp 317-347.
 187. Rubia C, Sandra RG, Waldiceu AV, José RJ, Antonio CS, and Maria JVF. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. *AAPS Pharm Sci Tech* 2005.
 188. Morin D., Zini R., Tillement S.P., and Burdeau A., Prevention of cell damage in ischemic-reperfusion: mitochondrial respiratory chain as a pharmacological target. *Letters in drugs & Discovery*, 2004;1:279-284.
 189. Siess M. H., le Bon A. M., Canivenc-Lavier M. C., Suscheter M. Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors*, 2000;12(1-4): 193.
 190. Elicoh-Middleton Jr., Chithan K., and Theoharis C., Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 2000.4(52): 673-751.
 191. Sang S., Cheng X., Stark R. E., Rosen R.T., Yang C. S., HO C. T., Chemical studies on antioxidant mechanisms of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Med Chem*. 2002.10(7):2233-2237.
 192. Bridger S., Deaths from low dose paracetamol poisoning. *Br Med J*, 1998.316: 1724-1725.

193. Fremont L., Biological effect of resveratrol. *Life Sa.* 2000.66: 663-673.
194. Morin D., Thierry H., Spedding M., Tillement J. P., mitochondria as target for antiischémic drugs. 2001. 13:22-67.
195. Cormier A., Morin C., Zini R., Tillement J.P., *Neuropharmacology*, 2003. 44: 642-652.
196. Cormier A., Morin C., Zini R., Tillement J.P., Larguee G. Brain., In vitro effects of nicotine on mitochondrial respiration and superoxide anion generation. *Res.* 2001, 900:72-79.
197. Sohn Y.T., Oh J.H., Characterisation of physico- chemical properties of ferulic acid. *Arch Pharm Res*, 2003.26(12): 1002-1008.
198. Naranishi I., Ute Y., Miyazaki K., Yakumaru H., Ueda J., Ozawa T., Fukuhana S., Nagazawa H., Houi H., Ikota N., Efficient radical scavenging ability of artepillh C., a major component of Brazillian propolis, and the mechanism. *Org Biolmol Chem*, 2003.71(9):1452-1454.
199. Semsei I., Rao G., Richardson A., Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev*1991., 58: 13- 9.
200. Gülinnaz A., Eser Y., Lütfiye K., Gülriz M., Biltan E., Fatma Z., Age-Related Alterations in Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Rat Brain. 1998. *Tr. J. of Medical Sciences*, 28. 491-494.
201. Levine S. A. and Kidd P.M., Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California Eds A. *Biocurrents division*1996..
202. Kanwaljit C., Sangeeta P., Naveen T., Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. 2005. *BMC Pharmacology*, 5:2.
203. Bansal M. P., Vipin B., Ashwani K., Effect of alpha-tocopherol on pulmonary antioxidant defence system and lipid peroxidation in cigarette smoke inhaling mice. 2001. *BMC Biochemistry*, 2: 14.
204. Green D. R. and Reed J. C., Mitochondrial and apoptosis. *Science*, 1998.281: 1309-12.
205. Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A., Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 1997. 18: 44-51.
206. Pelletier M.,Vallette F. M., Apoptose et maladies neurodégénératives. *Pharmacol*, 2001.15: 9.
207. Luo J., Shi R., Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem*, 2005.46: 243-252.
208. Inal M., Altinisik M., Bilgin M. D., The effect of quercetin on renal ischemia and reperfusion injury in the rat. *Cell Biochem Funct* 2002. 20(4): 291-296.

209. **Milane H.**, 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 2004.*, pp 13-36.
210. **Ishige K., Schubert D. and Sagara Y.**, Flavonoïds protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 2001.30: 433-446.
211. **Sestili P., Guidarelli A., Dacha M., Canton O.**, Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Rad Biol & Med*, 1998.25(2): 196-200.
212. **Vasilyeva O. V., Lyubitsky O. I., Klebanov G. I.**, Effect of the combined action of flavonoids, ascorbate and alpha-tocopherol on peroxidation of phospholipid liposomes induced by Fe²⁺ ions. *Membr. Cell. Biol*, 2000. 14:47-56.
213. **Crespy V., Morand C., Besson C., Manach C., Denigne C., and Remesy C.**, Comparaison of the intestinal absorption of quercetin , phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr*, 2004.131: 2109-2114.

Funere

ANNEXE

A. Préparation des solutions tampons

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

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

PH = 7.2 à 4°C.

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

Sucrose ultrapur : 85.6g
Tris : 1.2g

PH = 7.2 à 4°C.

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

Sucrose ultrapur : 8.6g
KH₂PO₄ : 68mg

PH = 7.2 à 25°C.

B. Préparation de la Solution hypotonique: QSP 100ml

KH₂PO: 0.49g
MgCl₂: 047g

pH = 7.2

Effet des rhizomes du Zingiber officinalis sur le stress mitochondrial hépatique chez le rat *in vitro*.

Présenté par : Hanane Nadia BOUSSENANE | Dirigé par : MC: Saïd LEGHOUCI

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. Option : Phytopharmacologie.

Résumé :

Il est admis que la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources des ERO intracellulaires. Ces derniers se trouvent dans la cellule en quantité nécessaire pour son bon fonctionnement, mais leur excès conduit la cellule à un état de stress oxydant, qui est impliqué dans de nombreuses pathologies.

Aucune étude sur l'effet du Gingembre sur le stress mitochondrial n'a été effectuée.

Dans la première partie de notre travail, nous avons préparé, l'extrait brut ainsi que les aglycones et les hétérosides du gingembre.

Dans la deuxième partie, nous avons évalué la capacité de nos extraits à réduire le radical libre physiologique DPPH^o, et leur effet sur le stress mitochondrial : sur la production de l'anion super oxyde O₂⁻, sur l'activité des enzymes antioxydantes (la SOD et la catalase), sur le taux du marqueur de la peroxydation lipidique MDA et sur le gonflement mitochondrial. Les résultats obtenus sont satisfaisants, nos extraits ont montré un grand pouvoir réducteur vis à vis du DPPH^o, une diminution du pourcentage de production de l'O₂⁻, une augmentation de l'activité enzymatique (SOD - catalase) et une diminution du taux du MDA.

L'association de l'extrait brut du Gingembre à l'extrait brut de la propolis (50%-50%) à améliorer l'effet du Gingembre sur tous les paramètres cités.

Mots Clés : Gingembre, DPPH^o, MDA, Catalase, SOD, Anion Super Oxyde, Propolis, Association Propolis-Gingembre

Abstract :

It is admitted that the mitochondrion is regarded as one of the principal sources of the intracellular ROS. The latter is in the cell in quantity necessary for its correct operation, but their excess leads the cell to a state of oxidizing stress, which is implied in many pathologies. No study on the effect of Ginger on the stress mitochondrial was carried out.

In the first part of our work, we prepared the rough extract as well as the aglycones and heterosides of the ginger. In the second part, we have to evaluate the capacity of our extracts to reduce free radical physiological DPPH^o, and their effect on the stress mitochondrial : on the super production of the anion O₂⁻ oxidizes -, on the activity of the antioxydant enzymes (the SOD and the catalase), On the rate of the marker of lipid per oxidation MDA and on swelling mitochondrial. The results obtained are satisfactory, our extracts showed a great reduction with respect to the DPPH^o, a reduction in the percentage of Production of O₂⁻, an increase in the enzymatic activity (SOD - catalase) and a reduction in the taut of the MDA. The association of the rough extract of Ginger to the rough extract of the propolis (50%-50%) to improve the effect of Ginger on all the quoted Parameters.

Key Words: Ginger, DPPH^o, MDA, Catalase, SOD, Anion Super Oxidizes, Propolis, Propolis-Ginger Association

ملخص:

للميتوكوندري دور محوري في فزيولوجيا العديد من الأمراض خلال تخليق الجذور. وتخزين الموت الخلوي المبرمج، من جهة أخرى للفعالية المضادة للسرطان الحرة والمضادة للكسدة للفلافونويدات الزنجبيل، أظهرتها دراسات عدة، غير أن تأثير هذه المواد الفعالة على المدى البعيد، وتداخلاتها مع الوظائف الميتوكوندرية والموت الخلوي المبرمج لا تزال غامضة.

دراستنا المنجزة على فئران التجارب البيضاء تعالج تأثير المستخلص الإيثانولي والفلافونويدات الأسكريكالزنجبيل على الوظائف الميتوكوندرية، خارج خلوي. للدراسة خارجة خلوية، أظهرت أن المستخلصات فعالية مضادة للكسدة وأسرة للجذور الحرة، هذه الفعالية تتناسب طردياً مع تركيز المواد الفعالة. وهذا من خلال تقليص إنتاج المعقد III للسلسلة التنفسية للميتوكوندري لجذور فوق البيروكسيد، تقليص مستوى المالونديالدهيد الميتوكوندري والميتوزولي، زيادة النشاط الأنزيمي لأنزيمات لمؤيد أكسيد دسمتاز والكاتالاز الميتوزولي والميتوكوندري بالإضافة إلى تثبيط فتح ال-PTP وتثبيط الانتفاخ الميتوكوندري.

الكلمات المفتاح: الفلافونويدات، الميتوكوندري، مواد الكسدة، مضاد للكسدة، الانتفاخ الميتوكوندري، ال-PTP، جرد.

Université de JIJEL – Faculté des sciences. Département de Biochimie Microbiologie.