

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA  
TERRE ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : biologie moléculaire et cellulaire / immunobiologie approfondie

### Thème

---

# L'effet protecteur des polyphénols dans la préservation hypothermique du cœur

---

Présenté par: M<sup>elle</sup> DJOUAD Amina.

M<sup>elle</sup> ROUAIGUIA Hadjira.

Devant le jury composé de :

- Président: Mr HEMICI. Ahmed M.A.A Université de Guelma
- Examinatrice : M<sup>me</sup> BOUSSENANE Hanane M.A.A Université de Guelma
- Encadreur: M<sup>me</sup> SIRIDI BRAIK Asma M.A.A Université de Guelma

Juin 2014

# Remerciements

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à **DIEU** qui nous a donné courage et volonté pour achever ce travail*

*Nous adressons nos remerciements à **Monsieur HEMISSI Ahmed**, Maitre assistant à l'université de Guelma, d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de notre mémoire et à **Madame BOUSSENANE Hanane**, Maitre assistante à l'université de Guelma, qui nous fait l'honneur de juger cette mémoire, qu'elle veuille trouver ce le témoignage de notre immense gratitude et de toute notre considération.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier très chaleureusement notre directrice de mémoire ♥ **Madame SIRIDI BRAIK Asma** ♥ pour sa disponibilité, ses conseils et son suivi tout au long de travail durant les moments les plus difficiles qui ont permis de mener à terme ce travail. Nous lui assurons le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

*Merci Mme pour votre soutien.*

*A toutes les techniciennes du Département de Biologie qui nous ont aidées.*

*Nous voudrions de tout cœur et vivement remercier tous ceux qui ont contribué de loin de près, d'une façon ou d'une autre à notre formation et à la réalisation de ce travail.*

# *Dédicace*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A ma mère et mon père*

*A mes sœurs Assia et Rania*

*A mon frère Saber*

*A ma collègue Hadjira*

*A mes professeurs*

*A toute ma famille*

*A mes amis(es)...*

*Amina*

## Dédicace

*Je remercie tout d'abord ♥ ALLAH ♥ le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire et tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que Je dédie :*

*♥ A mes très chers parents, pour leur amour et leur présence à coté de moi ♥*

*♥ A mes très chers frères et sœurs (Toha + Soussou) pour leur aide, leur amour et leur soutien de tous les jours ♥*

*♥ A Achraf, Linda, Fotna ♥*

*♥ A ma famille et mes amis ♥*

*♥ A ma collègue Amina ♥*

*♥ A mes professeurs ♥♥ A tous ceux que j'aime ♥...*

*Hadjira*

# ***SOMMAIRE***

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

## **Partie bibliographique**

### **Chapitre I: La préservation d'organe**

I.1. Transplantation d'organe ..... 3

    I.1.1. Aspect immunologique ..... 3

    I.1.2. Principe de préservation ..... 4

I.2. L'ischémie / reperfusion ..... 7

    I.2.1. Définition de l'ischémie ..... 7

    I.2.2. Conséquences de l'ischémie ..... 8

    I.2.3. Définition de la reperfusion ..... 9

    I.2.4. Conséquences de la reperfusion ..... 9

### **Chapitre II: Le stress oxydatif**

II.1. Définition du stress oxydatif ..... 12

II.2. Définition des radicaux libre ..... 13

II.3. Nature et source des ERO ..... 13

    II.3.1. Composés oxygénés radicalaires ..... 13

    II.3.2. Composés oxygénés non radicalaires ..... 14

II.4. Les systèmes de défense antioxydants ..... 14

    II.4.1. Système antioxydant enzymatique ..... 14

    II.4.2. Système antioxydant non enzymatique ..... 16

II.5. Oxydation des molécules biologiques ..... 17

II.5.1. Peroxydation lipidique .....	17
➤ Marqueurs biologiques .....	18
II.5.2. Oxydation de l'ADN .....	18
➤ Marqueurs biologiques .....	19
II.5.3. Oxydation des protéines .....	19
➤ Marqueurs biologiques .....	20
II.6. Evaluation du stress oxydatif .....	20
II.7. Prévention du stress oxydatif .....	20
 <b>Chapitre III: La propolis</b>	
III.1. Définition et étymologie .....	22
III.2. Histoire de la propolis .....	22
III.3. Propriétés physicochimiques de la propolis .....	22
III.4. Composition de la propolis .....	23
III.4.1. Composition de la propolis brute .....	23
III.4.2. Composition de la propolis purifié .....	23
III.5. La récolte de la propolis .....	24
III.5.1. La récolte de la propolis par les abeilles .....	24
III.5.2. La récolte de la propolis par l'apiculteur .....	25
III.6. Utilisation de la propolis .....	25
III.6.1. Le cosmétique .....	25
III.6.2. La médecine .....	25
III.7. Propriétés biologiques de la propolis .....	26
III.7.1. Propriétés antioxydante et antiradicalaire .....	26
III.7.2. Propriétés anti-inflammatoire .....	26
III.7.3. Propriétés immunomodulatrices .....	26

III.7.4. Propriétés anticancéreuses .....	26
III.7.5. Propriétés antimicrobiennes .....	26
III.7.6. Autres propriétés .....	27
<b>Chapitre IV: Les polyphénols</b>	
IV.1. Définition des polyphénols .....	28
IV.2. Classification des polyphénols .....	28
IV.2.1. Polyphénols monomériques .....	29
IV.2.2. Polyphénols sous forme de polymères .....	33
IV.3. Propriétés biologiques des polyphénols .....	34
IV.3.1. Activité antioxydante .....	39
IV.3.2. Activité antimicrobienne .....	4
IV.3.3. Effet antiallergique .....	37
IV.3.4. Effet anti-inflammatoire et immunologique .....	38
IV.3.5. Effet anticancéreux .....	38
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>Matériels et méthodes</b>	
I. Matériels .....	40
I.1. Produits spécifiques à l'étude .....	40
I.2. Matériel animal et conditions d'hébergement .....	40
II. Méthodes .....	40
II.1. Protocole expérimental .....	40
II.1.1. Sacrifice des animaux et prélèvement du cœur .....	41
II.1.2. Traitement des cœurs prélevés : phase de l'ischémie froide .....	41
II.2. Evaluation du statut oxydatif au niveau du tissu cardiaque .....	42
II.2.1. Préparation des homogénats du cœur .....	42

II.2.2. Dosage tissulaires .....	42
a. Mesure du taux du Malondialdéhyde cytosolique (MDA) .....	42
b. Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) .....	43
II.3. Etude histologique des cœurs préservés à froid .....	45
II.4. Analyse statistique .....	45
<b>Résultats et discussion</b>	
Résultats et interprétations .....	46
Discussion .....	54
Conclusion et perspectives .....	59
Références bibliographiques .....	60
Annexes	
Résumés	



## *Liste des abréviations*

<b>AIF</b>	Apoptosis Inducing Factor
<b>AGPI</b>	Acides gras polyinsaturés
<b>ARN et ADN</b>	Les acides ribo- et désoxyribonucléiques
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub></b>	La quercétine
<b>C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	La chrysin
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice de l'antigène
<b>Cu</b>	Le cuivre
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Ion Cuivre
<b>Cyt :</b>	Cytochrome C.
<b>DTNB</b>	Acide 5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoïque)
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediamine tétra-acétique,
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>Fe</b>	Fer
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Ion Fer
<b>FLO•</b>	Radical flavoxyle
<b>GPx</b>	Le glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	Le glutathion réduit
<b>GSSG</b>	Le glutathion oxydé
<b>H<sup>+</sup></b>	Ion Hydrogène
<b>HLA</b>	Leucocyte antigène humain
<b>HNE</b>	L'hydroxynonéal
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène

<b>HTK</b>	Crustiol
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma
<b>IL</b>	Interleukine
<b>MDA</b>	Malonaldialdéhyde
<b>Mn</b>	Le manganèse
<b>mPTP</b>	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate hydrogéné
<b>NO<math>\cdot</math></b>	Monoxyde d'azote
<b>O<math>_2^{\cdot-}</math></b>	L'anion superoxyde
<b>OH</b>	Hydroxyl
<b>OH<math>\cdot</math></b>	Le radical hydroxyle
<b>O-Gly</b>	O-glycosyl
<b>OMe</b>	Omethyl
<b>NO<math>\cdot</math></b>	Le monoxyde d'azote
<b>PAF</b>	Platelet-activating-factor
<b>RCT</b>	Récepteur de cellule T
<b>RH</b>	Radical hydroxyle
<b>RLO</b>	Radicaux libres oxygénés
<b>ROO<math>\cdot</math></b>	Radical peroxy,
<b>Se</b>	Le sélénium
<b>SH</b>	Groupes thiol
<b>SOD</b>	La superoxyde dismutase
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TBARS</b>	Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>Zn</b>	Le zin

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b>	Voies de reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T .....	3
<b>Figure 2:</b>	Impact du calcium au niveau de la cellule .....	8
<b>Figure 3:</b>	Mécanismes de mort cellulaire apoptotique au cours de la reperfusion post-ischémique .....	10
<b>Figure 4:</b>	Mécanismes de mort cellulaire nécrotique au cours de la reperfusion post-ischémique .....	10
<b>Figure 5:</b>	Evènements successifs de la cascade inflammatoire après reperfusion, aboutissant à l'invasion des leucocytes .....	11
<b>Figure 6:</b>	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants .....	12
<b>Figure 7:</b>	Sources des espèces radicalaire et non radicalaire de l'oxygène et de l'azote .....	13
<b>Figure 8:</b>	Réactions de détoxification des ERO .....	15
<b>Figure 9:</b>	Etapas de la peroxydation lipidique .....	18
<b>Figure 10:</b>	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires .....	19
<b>Figure 11:</b>	Aspect de la propolis .....	23
<b>Figure 12:</b>	Exemples d'acide phénoliques .....	29
<b>Figure 13:</b>	Structure de base des flavonoïdes .....	30
<b>Figure 14:</b>	Structures chimiques des flavones et des flavonols .....	31
<b>Figure 15:</b>	Structures chimiques des flavanones et flavanonols .....	31
<b>Figure 16:</b>	Structures chimiques des flavanones et flavanonols .....	32
<b>Figure 17:</b>	Structures chimiques des anthocyanes .....	32
<b>Figure 18:</b>	Structures chimiques des chalcones et aurones .....	33
<b>Figure 19:</b>	Exemple de structure de base des tanins condensés .....	33
<b>Figure 20:</b>	Effets biologiques des polyphénols .....	34
<b>Figure 21:</b>	Piégeage des ERO (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure Stable .....	35
<b>Figure 22:</b>	Critères structuraux essentiels liés à l'activité antiradicalaire des flavonoïdes .....	36
<b>Figure 23:</b>	Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques .....	36
<b>Figure 24:</b>	Inhibition de la lipoxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes .....	39
<b>Figure 25:</b>	Schéma de réaction entre le TBA et le MDA .....	43
<b>Figure 26:</b>	Schéma de réaction entre le DTNB et le GSH .....	44
<b>Figure 27:</b>	Variations des taux du MDA cytosolique au niveau des cœurs préservés .....	46

<b>Figure 28:</b>	Variations des taux du GSH cytosolique au niveau des cœurs préservés .....	<b>48</b>
<b>Figure 29:</b>	Coupes longitudinales du cœur sain non traité .....	<b>49</b>
<b>Figure 30:</b>	Coupes longitudinales du cœur témoin préservé non traité .....	<b>50</b>
<b>Figure 31:</b>	Coupes longitudinales du cœur préservé traité par l'éthanol .....	<b>50</b>
<b>Figure 32:</b>	Coupes longitudinales du cœur préservé traité par la propolis .....	<b>51</b>
<b>Figure 33:</b>	Coupes longitudinales du cœur préservé traité par la quercétine .....	<b>52</b>
<b>Figure 34:</b>	Coupes longitudinales du cœur préservé traité par la chrysine .....	<b>53</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Composition des différentes solutions de conservation .....	<b>7</b>
<b>Tableau 2:</b> La composition des différentes propolis en polyphénols .....	<b>24</b>
<b>Tableau 3:</b> Principales classes de composés phénolique .....	<b>29</b>
<b>Tableau 4:</b> Modes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols .....	<b>37</b>

# *Introduction*

La transplantation du cœur est parfois la seule issue thérapeutique pour beaucoup de pathologies cardiovasculaires qui entraînent une perte de fonction irréversible du cœur.

Pour maintenir la viabilité des greffons cardiaques, la conservation repose actuellement sur la préservation au froid avec l'utilisation d'une solution spécialisée dont la formule (agents imperméants, d'antioxydant, d'électrolytes, précurseurs d'ATP) favorise une meilleure reprise de fonction du greffon (réversibilité) et améliore sa survie pendant l'ischémie.

D'autre part, l'ischémie, séquence incontournable en transplantation d'organe est à l'origine de processus physiopathologiques qui vont finalement agir de manière synergique et contribuer aux lésions du greffon. Ces lésions peuvent être aggravées par la reperfusion du greffon lors de son implantation chez le receveur.

En effet, les dommages qui résultent de la diminution des apports en oxygène et en substrats des cellules cardiaques ischémisées sont d'ordre métabolique (le contenu en ATP diminue et le lactate s'accumule). Cependant, la reperfusion fournit aux cellules, dont le fonctionnement est perturbé, un apport excessif en oxygène provoquant ainsi d'autres dégâts à savoir : un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, une déplétion en ATP, une accumulation des espèces réactives de l'oxygène et une ouverture d'un méga pore mitochondrial. Ce dernier semble être un élément déclencheur du phénomène de mort cellulaire qui est responsable de la dégradation du tissu ayant subi une ischémie.

Par ailleurs, le stress oxydatif apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et antioxydantes est rompu en faveur des pro-oxydants. Cet état est rencontré dans le phénomène d'ischémie-reperfusion ou bien dans plusieurs autres maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, cancer et diabète.

Ces dernières années ont vu apparaître un débordement d'informations sur le rôle thérapeutique possible des antioxydants d'origine exogène tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les oligoéléments, et les composés phénoliques, y compris les flavonoïdes.

En effet, les polyphénols, métabolites secondaires des végétaux sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiallergiques et immunomodulatrices. Ces activités ont très souvent un lien avec leur activité antioxydantes et notamment leur capacité à piéger les radicaux libres.

Par ailleurs, la propolis, un des produits naturels de la ruche, possède de nombreuses propriétés biologiques et thérapeutiques qui sont en rapport avec sa composition chimique riche en polyphénols.

Dans un contexte d'amélioration de la survie du cœur (greffon) lors de sa conservation hypothermique et afin de minimiser les conséquences des effets nuisibles de l'ischémie produits lors cette préservation du cœur avant sa reperfusion, notre travail expérimental s'intéresse à étudier l'effet protecteur de quelques produits phénoliques dans la préservation hypothermique du cœur.

Partant de cet objectif, nous avons adopté la méthodologie suivante :

- Conservation des cœurs dans des solutions de préservation supplémentées ou non d'antioxydants phénoliques.
- Evaluation du stress oxydatif au niveau des tissus cardiaques conservés.
- Etude histologique des cœurs préservés dans les différentes solutions.

Le tapuscrit est structuré en deux parties :

La première partie est une mise au point bibliographique qui commence par le chapitre de la transplantation et préservation d'organe, le deuxième chapitre s'intéresse au stress oxydatif, le troisième chapitre est une description de la propolis dont l'extrait est utilisé dans notre étude et le dernier chapitre décrit la structure et les propriétés des polyphénols .

Quand à la deuxième partie, elle est conçue en une première partie décrivant les méthodes et le matériel utilisés pour la réalisation de ce travail. La deuxième partie rassemble tous les résultats de notre étude ainsi que leurs interprétations et leur discussion.



*Revue*  
*Bibliographique*

*Chapitre I :*  
*Préservation d'organe*

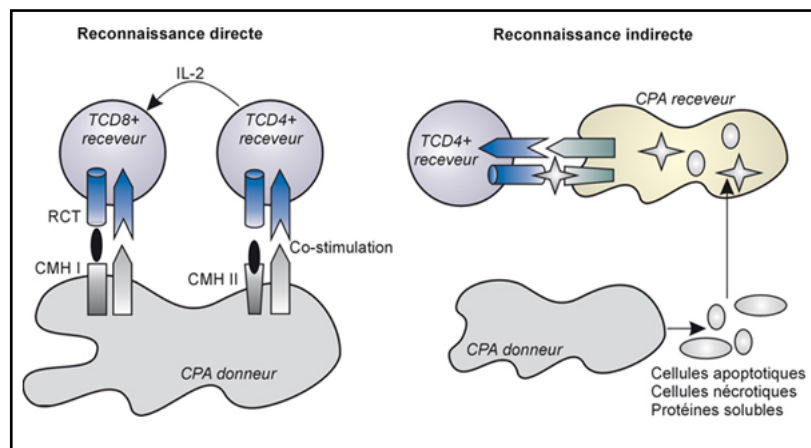
## I. 1. Transplantation d'organe

La transplantation d'organes consiste à prélever (sur un cadavre, sur un mort encéphalique ou sur un vivant) certains organes (reins, cœur, poumons, foie, pancréas...) en vue de les transplanter chez un receveur malade atteint d'une maladie organique incurable ou terminale.

### I. 1. 1. Aspect immunologique

L'aspect immunologique de la transplantation réside dans le rejet du greffon par le receveur. En effet, la transplantation d'un organe allogénique est avant tout caractérisée par une réponse immunitaire contre l'organe greffé. Le rejet hyperaigu implique les anticorps reconnaissant des déterminants du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), les anticorps anti-HLA (*Human Leukocyte Antigen*).

Cependant, le rejet cellulaire est dû à la reconnaissance par les lymphocytes T du receveur des antigènes allogéniques du donneur dans un contexte CMH. (**Figure 1**) (**Bernard M et al., 2009**)



**Figure 1 :** Voies de reconnaissance des alloantigènes par les lymphocytes T  
(Bernard M et al., 2009)

*CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; CPA : cellule présentatrice de l'antigène ; RCT : récepteur de cellule T ; T CD8+ et T CD4+ : lymphocytes T CD8+ et T CD4+*

De nos jours, ce type de rejet est évité dans la majorité des cas par l'analyse des compatibilités HLA entre le donneur et le receveur. Ce problème est également pallié par l'administration des immunosuppresseurs au receveur. La conception du traitement immunosuppresseur s'appuie sur l'association d'un traitement d'**induction** (les anticorps

anti-lymphocyte ou les anticorps monoclonaux anti-récepteur de l'interleukine 2), c'est-à-dire un traitement qui est censé diminuer l'incidence du rejet aigu dans les 3 mois qui suivent la transplantation, et d'un traitement de **maintenance** qui est destiné à limiter ou prévenir le développement du rejet chronique après cette période initiale. (**Bernard M et al., 2009**)

### **I. 1. 2. Principe de préservation**

La transplantation d'organe solide se résume à ces 4 phases :

- prélèvement du greffon (explantation) et éventuellement arrêt de l'organe,
- stockage et transport à froid (hypothermie),
- implantation,
- reperfusion. (**Belzer F.O et Southard J.H, 1988**).

#### **a. L'hypothermie**

L'hypothermie est l'élément essentiel de la conservation. Elle réduit le métabolisme tissulaire, c'est-à-dire elle ralentit l'activité enzymatique catalytique nécessaire à la viabilité cellulaire. Le métabolisme serait diminué de 12 à 13 fois lorsque la température passe de 37°C à 0°C. (**Belzer F.O et Southard J.H, 1988**).

Il est nécessaire de réduire la demande et la consommation du greffon en oxygène et en énergie, car celui-ci se trouve en état d'ischémie (privation du tissu d'oxygène). Dans ce cas la synthèse d'énergie sous forme d'ATP n'est plus assurée par la phosphorylation oxydative mais par la glycolyse anaérobie dont le rendement est très inférieur.

Le tissu ischémique n'a presque plus de réserve énergétique. Il en résulte un déséquilibre entre l'offre et la demande. Il est donc important de réduire ses besoins grâce à l'hypothermie. (**Fornas D, 2010**).

En ralentissant l'activité cellulaire, ce refroidissement permet de prolonger le temps de préservation, tout en provoquant, en contrepartie, des effets néfastes pour la cellule en bloquant des enzymes clés du métabolisme. Les enzymes membranaires ATP-dépendantes seraient très sensibles au froid. (**Raison J.K, 1973**)

D'un point de vue pratique, l'hypothermie est apportée par la réfrigération de la solution de préservation. L'organe est ainsi refroidi pendant le rinçage puis la conservation. (**Fornas D, 2010**).

Comme l'hypothermie ne stoppe pas complètement le métabolisme, elle ne suffit pas, à elle seule, à conserver l'organe prélevé. Il convient d'apporter en plus, des électrolytes et d'autres composants pour mimer l'environnement physiologique habituel.

## **b. Solution de préservation**

### **b. 1. Le rôle de solution de préservation**

La solution de préservation d'organe doit être capable de protéger les cellules des effets délétères de l'ischémie-reperfusion, en réduisant le métabolisme à un niveau faible et en satisfaisant les besoins métaboliques minimums durant la conservation. Ainsi, elle doit, plus précisément, en plus de son rôle de vecteur de l'hypothermie, prévenir ou limiter les effets suivants :

- le gonflement cellulaire et l'œdème,
- l'accumulation intracellulaire de calcium,
- la perte en substrat énergétique,
- l'acidose intracellulaire,
- les lésions oxydatives, et
- l'inflammation (**Badet L et al., 2006**)

### **b. 2. Composition de la solution de conservation :**

Les solutions de conservation des organes sont formulés pour atténuer les effets de l'ischémie, et leur efficacité dépend à la fois de leur composition et du type d'organe. Ils sont composés :

- ***d'agents imperméants*** : saccharides (mannitol, sucrose, raffinose), colloïdes (hydroxyethyl amidon, dextran, polyéthylène glycol) et anions (phosphate, sulfate, lactobionate, gluconate), ces molécules permettent de réduire l'œdème cellulaire en maintenant une osmolarité extracellulaire suffisante

- ***d'antioxydant*** : le glutathion neutralise la formation de radicaux libres lors de la reperfusion.

- ***d'électrolytes*** : le potassium et le sodium

- ***d'un système tampon*** : phosphates ou histidine pour prévenir l'acidose

- *de précurseurs d'ATP* : adénosine et phosphate, ils stimulent le métabolisme énergétique lors de la reperfusion du greffon. (**Tableau1**) (**Fornas D, 2010**).

Il existe différents types de solution de préservation des organes dont l'indication dépend de l'organe à conserver. Pour la conservation des viscères, 4 solutions semblent s'imposer

- *Crustiol* (ou HTK), solution qui permet une bonne conservation des viscères intra abdominaux (foie, reins, pancréas) mais pour une durée limitée.

- *Viaspan ou solution de Belzer* (UW), garantie une conservation prolongée pour le foie, rein et pancréas.

- *Celzior*, développé récemment par un laboratoire français (Sanofipasteur), cette solution constitue un mélange des concepts l'UW et de l'HTK, elle a été formulée spécifiquement pour la conservation des greffons cardiaque.

- *Euro-Collins*, utilisée pour la conservation des poumons. (**Chappaz L, 2010**).

**Tableau 1 :** Composition des différentes solutions de conservation (Fornas D, 2010).

NOM DE MARQUE	PLEGISOL (St Thomas)	EURO-COLLINS Solution	VIASPAN (Belzer UW)	CUSTODIOL (Breitschneider's HTK solution)	CELSIOR	RINGER LACTATE	PERFADEX (LPD)	SOLTRAN
Laboratoire Composition	Aguettant	Fresenius	Du Pont Pharmaceuticals	Dr. F. Köhler Chemie GmbH	SangStat	AGUETTANT	BioPhausia AB	Baxter
<b>Electrolytes (mmol/l)</b>								
Potassium	18	115	125	9	15	5,4	6	80
Sodium	120	10	25	15	100	131,23	138	84
Magnésium	18		5	4	13		0,8	41
Calcium	1,2			0,015	0,25	1,8		
Chlorure	160	15		50	40	111,7	142	
Sulfate			5				0,8	41
<b>Imperméant (mmol/l)</b>								
Mannitol				30	60			33,8 g/l
Acide lactobionique			100		80			
Glucose		184					5	
Raffinose			30					
<b>Agent oncotique</b>								
Dextran 40							5%	
Hydroxyéthyl starch			50 g/l					
<b>Antioxydant (mmol/l)</b>								
Glutathion			3 (total)		3 (réduit)			
Allopininol			1					
<b>Métabolite (mmol/l)</b>								
Acide glutamique					20			
Ketoglutarate				1				
Adénosine			5					
Aspartate								
<b>Tampon (mmol/l)</b>								
Histidine				198	30			
Bicarbonate	10	10						
Phosphate		42,5					0,8	
Diphosphate		15	25					
Tryptophane				2				
Citrate								54
Lactate						28,5		
<b>Solvant</b>								
Eau ppi	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L

## I. 2. L'ischémie / reperfusion

### I. 2. 1. Définition de l'ischémie

L'ischémie peut se définir comme un arrêt ou une insuffisance de l'apport sanguin dans un tissu ou dans un organe. Cette insuffisance ne concerne pas seulement l'apport en oxygène, mais aussi celui des substrats et des produits du métabolisme.

L'ischémie peut être due à une compression artérielle ou à une présence d'un caillot sanguin qui vient se bloquer dans une zone artérielle déjà rétrécie (athérosclérose). L'ischémie peut se manifester aussi en cas d'accident vasculaire cérébral ou un infarctus de myocarde et dans la greffe d'organe (phase de l'implantation et de la conservation).

Les tissus les plus sensibles à l'ischémie et les plus étudiés sont le cerveau et le cœur. (Baidi Z, 2011)

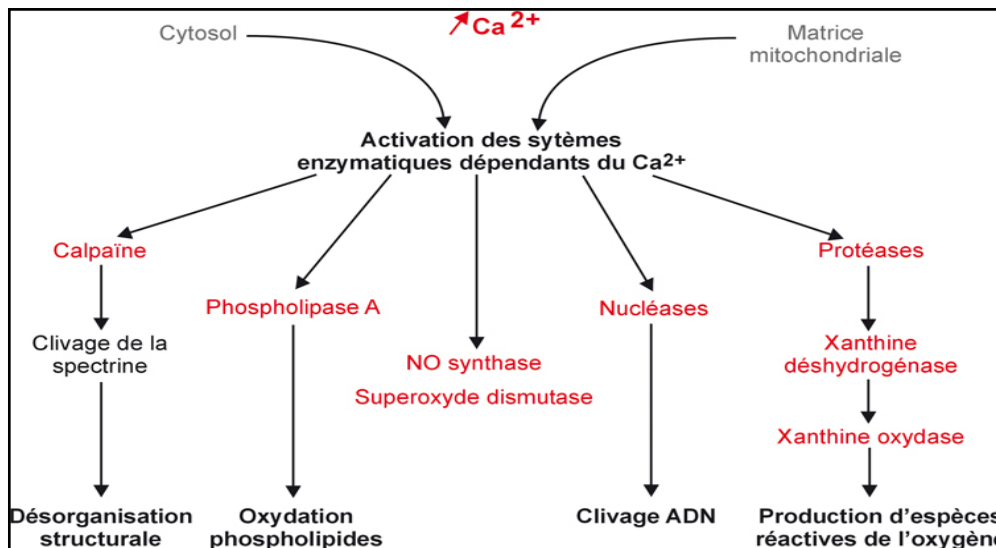
## I. 2. 2. Conséquences de l'ischémie

### a. Acidose et surcharge calcique

Pendant l'ischémie, la production de l'ATP diminue. Par conséquent, la glycolyse anaérobie est activée en produisant l'acide lactique.

Les ions  $H^+$  produits dans cette voie métabolique et résultant de l'hydrolyse de l'ATP, sont responsables d'une baisse du pH intracellulaire, par conséquent, il se produit un phénomène d'« acidose », qui s'installe dans les 10 premières minutes de l'ischémie.

L'augmentation de la concentration des ions  $H^+$  induit une activation de la pompe  $Na^+/H^+$  dans le sens d'expulsion de protons, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la concentration intracellulaire des ions  $Na^+$ . Pour compenser cette hausse en sodium, l'échange  $Na^+/Ca^{2+}$  est activé dans le sens d'expulsion de  $Na^+$ , ce qui est responsable d'une augmentation de la concentration calcique cytosolique et donc, de la hausse de la concentration du calcium intramitochondrial. Cette surcharge calcique peut affecter de nombreuses voies enzymatiques ou non enzymatiques pouvant conduire à des dommages cellulaires plus ou moins graves (**Figure 2**). (**Khodr I, 2013**).



**Figure 2** : Impact du calcium au niveau de la cellule. (**Bernard M et al., 2009**)

### b. Gonflement cellulaire

Les troubles ioniques non compensés entraînent une perte de la polarité membranaire, un gonflement cellulaire par entrée d'eau et une désorganisation du cytosquelette. Des lésions cellulaires irréversibles, essentiellement par nécrose, peuvent alors apparaître. (**Cour M et Argaud L, 2010**).



Les modifications métaboliques et ioniques qui ont lieu pendant l'ischémie, favorisent les dommages observés pendant la reperfusion.

### **I. 2. 3. Définition de la reperfusion**

La reperfusion offre un second souffle aux cellules ischémisées dont le métabolisme a été perturbé en lui apportant une quantité excessive d'oxygène. Cependant, cet apport peut, dans le cas d'une ischémie prolongée, provoquer des dégâts cellulaires considérables qui peuvent nuire à la vie cellulaire. Cette reperfusion a lieu lors de la phase de l'implantation au cours de la greffe d'organe. (Meyer G, 2010).

### **I. 2. 4. Conséquences de la reperfusion**

#### **a. Production des radicaux libres et mort cellulaire**

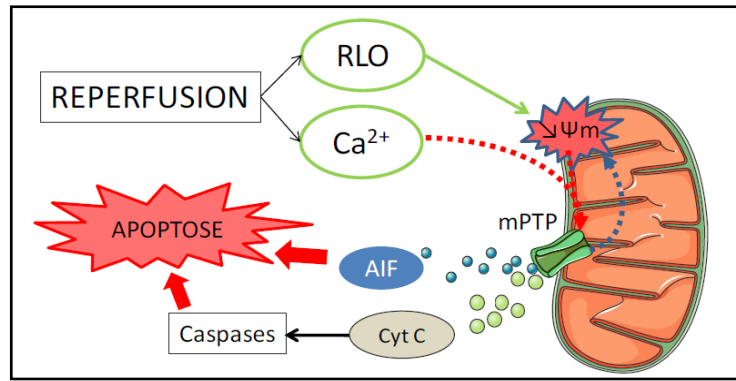
Le stress oxydant et la surcharge calcique sont des facteurs clés de la mort cellulaire au cours de la reperfusion post-ischémique. Ils sont à l'origine de l'apparition de nécrose cellulaire mais conduisent également à une activation de différents facteurs pro-apoptotiques.

La surcharge calcique associée à la production des radicaux libres est considérée comme étant à l'origine d'une perméabilité transitoire de la membrane mitochondriale au cours de la reperfusion. Ce phénomène se traduirait par un accroissement soudain de la perméabilité de la membrane mitochondriale pour l'eau et les molécules de taille inférieure à 1,5 kDa.

Cette perméabilité serait la conséquence de l'activation d'un mégapore de nature protéique, non sélectif, activé par le  $\text{Ca}^{2+}$  et désigné sous le nom de pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP).

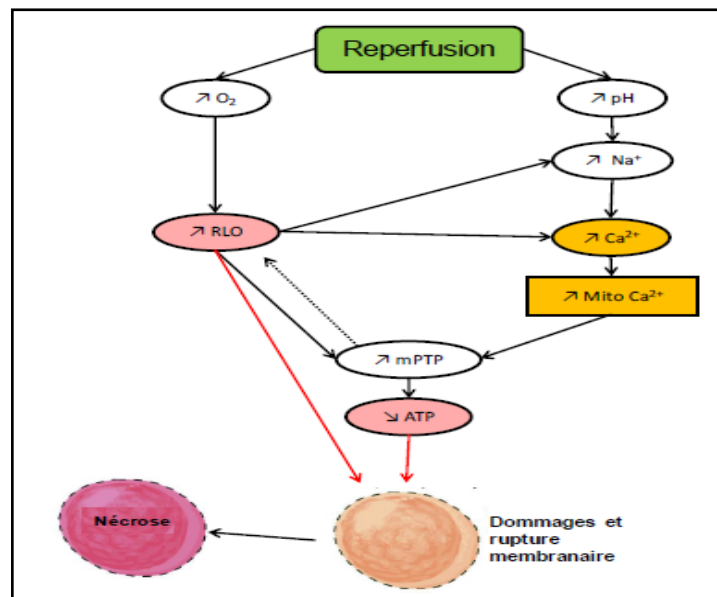
Ce phénomène serait à l'origine de la dissipation du gradient électrochimique des protons, d'une perte de l'homéostasie ionique et d'un déséquilibre de la balance redox en faveur de l'oxydation conduisant à la disruption de la mitochondrie.

Par ailleurs, la mitochondrie ainsi altérée relargue différents facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c ou la protéine AIF (**Figure 3**), mais va également accentuer la déplétion en ATP aggravant ainsi l'altération de l'homéostasie ionique, à l'origine d'un gonflement cellulaire et d'altérations membranaires pouvant aboutir à la nécrose cellulaire (**Figure 4**). (Meyer G, 2010).



RLO : radicaux libres oxygénés ; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale ; AIF : Apoptosis Inducing Factor ; Cyt : cytochrome C.

**Figure 3 :** Mécanismes de mort cellulaire apoptotique au cours de la reperfusion post-ischémique. (Meyer G, 2010).



**Figure 4 :** Mécanismes de mort cellulaire nécrotique au cours de la reperfusion post-ischémique. RLO : radicaux libres oxygénés ; mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale. (Meyer G, 2010).

### b. phénomène inflammatoire

Au cours de la reperfusion, l'apport sanguin aggrave les lésions ischémiques existantes, en provoquant le développement d'un état inflammatoire des tissus avec activation et/ou libération de différents médiateurs aux conséquences dramatiques. (Figure 5).

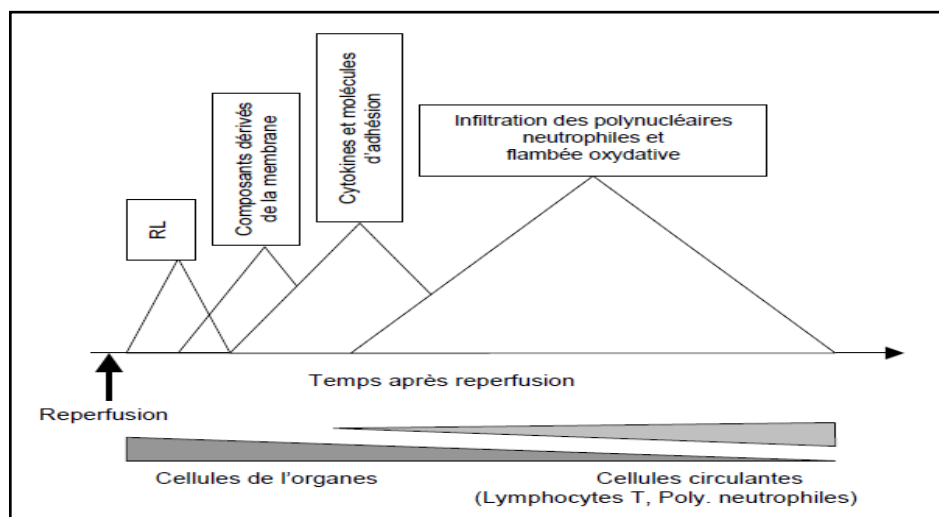
L'endothélium vasculaire occupe une place centrale dans le développement de ce processus inflammatoire. On observe d'abord la libération de médiateurs dérivés de la membrane (dérivés de l'acide arachidonique : leucotriènes et thromboxane A<sub>2</sub> et le platelet-activating-factor PAF). Ils ont une action fondamentale dans le processus inflammatoire (chimiotactisme des polynucléaires, libération de lymphokines).

Il s'en suit la libération de cytokines (TNF, IL et IFN $\gamma$ ) et l'expression de molécules d'adhésion qui favorisent le contact, l'adhésion et la migration de cellules dans les tissus (intégrines comme les CD11/CD18 des leucocytes, des sélectines comme la sélectine L des leucocytes).

Les polynucléaires neutrophiles ayant adhérents à l'endothélium vont, à leur tour, libérer des médiateurs (radicaux libres, cytokines, PAF et protéases).

Enfin on observe une infiltration des lymphocytes et neutrophiles à travers l'endothélium. Les cellules parenchymateuses sont atteintes.

L'endothélium vasculaire ainsi endommagé par l'ischémie, la reperfusion et le phénomène inflammatoire, serait à l'origine du développement d'un état d'athérosclérose de la greffe. Cela gêne le flux sanguin et le système microvasculaire n'assure plus la reperfusion du tissu post-ischémique.



**Figure 5 :** Evènements successifs de la cascade inflammatoire après reperfusion, aboutissant à l'invasion des leucocytes. (Fornas D, 2010).

***Chapitre II :***  
***Stress oxydatif***

## II. 1. Définition et origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), en faveur de ces dernières. (**Figure 6**).

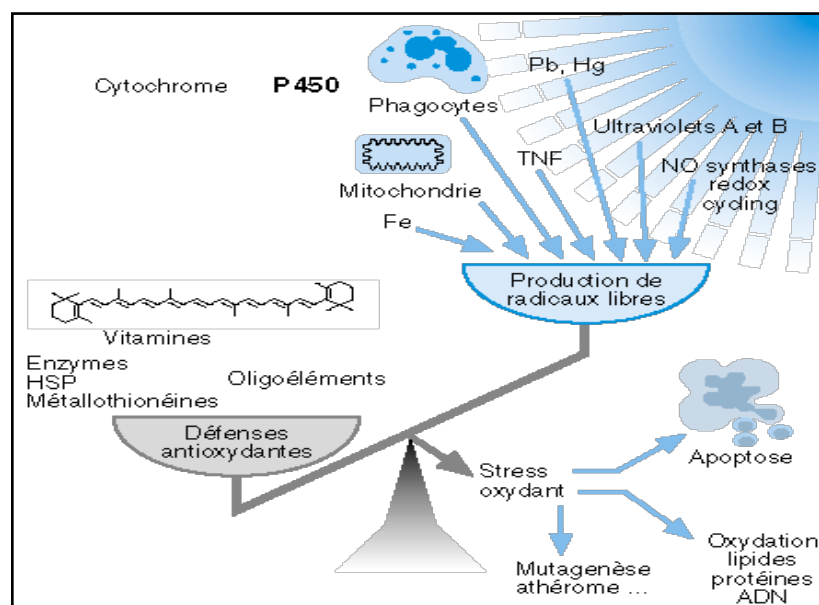
Ce déséquilibre peut avoir diverses origines :

- La surproduction endogène d'agents prooxydants suite à une réaction inflammatoire importante ou à une exposition à des facteurs prooxydants tels que les polluants environnementaux (tabac, amiante, métaux toxiques, herbicides), la consommation d'alcool ou de certains médicaments (catécholamines), l'exposition prolongée au soleil (rayon ultraviolets). Cette surproduction est susceptible de surpasser nos défenses antioxydantes naturelles.

- Une défaillance du système antioxydant due à une anomalie génétique (déficit dans l'expression d'enzymes de défense antioxydante) ou à un déficit nutritionnel en antioxydants d'origine végétale (polyphénols, caroténoïdes, vitamines C et E) et en oligoéléments (Fer, cuivre, zinc et manganèse) (**Gueye Papa M, 2007**)

Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme provoquant ainsi plusieurs maladies (cardiovasculaires, diabète, cancer, maladies neuro-dégénératives).

(**Nkhili E-Z, 2009**)



**Figure 6** : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants (**Favier A, 1997**)

## II. 2. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont une forme particuliers d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié). Le champ magnétique crée par sa rotation ou spin n'est pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules (protéine, lipide, ADN...etc.).

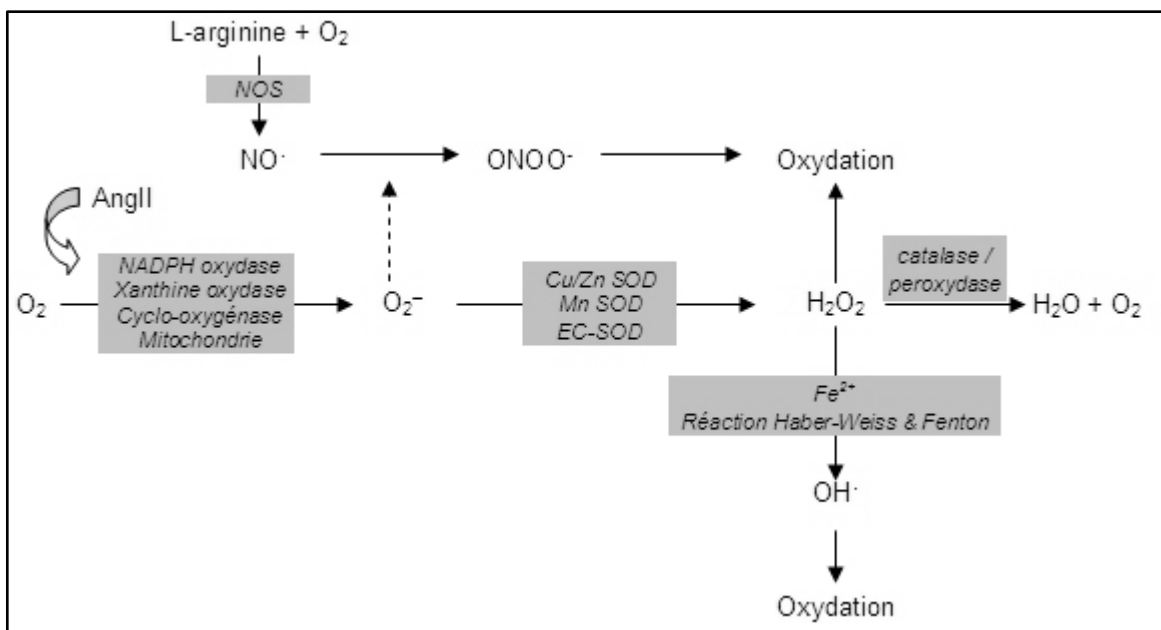
La réactivité des RL ne doit pas être exagérée car elle est très variable selon la nature du radical. (Badid N, 2012).

## II. 3. Nature et source des ERO

### II.3. 1. Composés oxygénés radicalaires

#### a. L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

Il peut se former par réaction de l'oxygène avec un électron qui provient généralement d'une fuite au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'inflammation est, par ailleurs, une source importante de production de l'anion superoxyde, il s'agit du complexe enzymatique NADPH oxydase membranaire des cellules phagocytaires, des xanthines oxydases et des cyclo-oxygénases (Figure 7). (Bouhadjra K, 2011)



**Figure 7 :** Sources des espèces radicalaire et non radicalaire de l'oxygène et de l'azote (Savard S, 2005)

### **b. Le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ )**

Le radical hydroxyle est le plus réactif des radicaux libres oxygénés. Il est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques et se forme par la réaction de Fenton ou par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction de Haber-Weiss) (**Figure 7**) ou sous l'effet de radiations ionisantes (rayons X ou gamma). De par sa demi-vie courte, et à la faible distance qu'il peut parcourir, il diffuse peu et agit directement sur le site de production. (**Mongens M, 2013**)

### **c. Le monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$**

Une autre espèce radicalaire le monoxyde d'azote est, elle aussi, produite par des systèmes enzymatiques qui sont les différentes NO Synthases (ou NOS) à des fins de médiations cellulaires. (**Figure 7**). (**Chaaya R-Y, 2010**)

## **II.3. 2. Composés oxygénés non radicalaires**

### **a. Peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Ce n'est pas un radical libre proprement dit, mais une molécule car tous ses électrons périphériques sont appariés. Cependant, il peut générer des radicaux hydroxyles  $\cdot\text{OH}$  en présence de cations métalliques tels que  $\text{Fe}^{2+}$  (réaction de Fenton) ou  $\text{Cu}^{2+}$ . (**Figure 2**)

Il se forme par dismutation de l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sous l'action de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). (**Figure 2**). (**Justine P, 2005**)

### **b. Oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ )**

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde. (**Beaudeau J.L et al., 2006**)

## **II. 4. Les systèmes de défense antioxydants**

Les systèmes de défense antioxydants entraînent le piégeage des radicaux libres. Ils sont de nature enzymatique et non enzymatique.

### **II. 4. 1. Système antioxydant enzymatique**

Ce système est composé d'enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase capables d'éliminer les radicaux libres.

**a. La superoxyde dismutase (SOD)**

Les SOD sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule de peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire.

Le peroxyde d'hydrogène formé est pris en charge par les catalases et les glutathion peroxydases à sélénium. (Figure 3). (Chambers D.E et al., 1985)

**b. La catalase**

La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène (Figure 8). (Garait B, 2006)

**c. La glutathion peroxydase (GPx)**

Les glutathion peroxydases à sélénium constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c (cytochrome c peroxydases), le NADH (NADH peroxydases). (Figure 8).

L'activité anti-oxydante de ces peroxydases est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium. (Lenzi F, 2011)

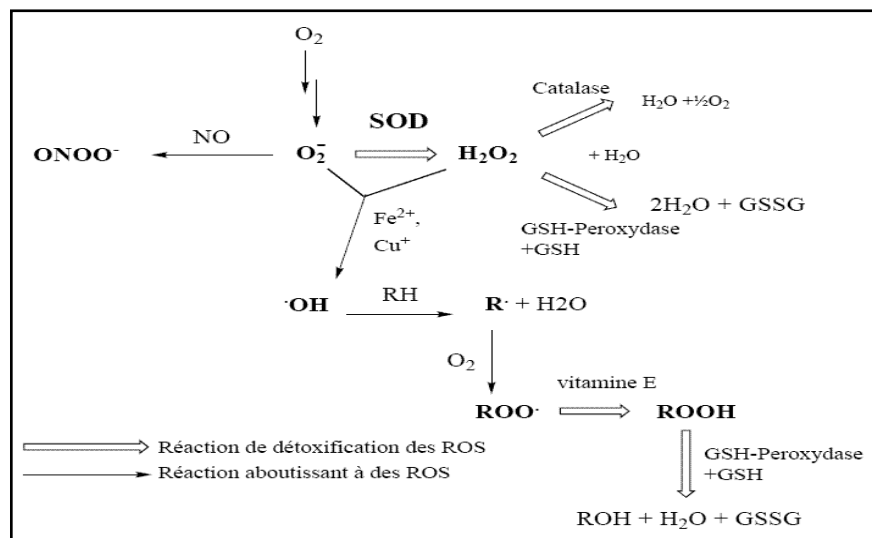


Figure 8 : Réactions de détoxification des ERO (Manallah A, 2012)



## II. 4. 2. Système antioxydant non enzymatique

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons ceux qui sont hydrosolubles et ceux liposolubles.

### a. Antioxydants hydrosolubles

#### ➤ L'acide ascorbique

La vitamine C se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$  et l' $\bullet OH$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E. (Garait B, 2006)

#### ➤ Le glutathion réduit

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine. Il réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' $H_2O_2$  est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté. (Bouhadjra K, 2011).

#### ➤ Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante. (Halliwell B, 1999).

#### ➤ Les polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoides, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils sont pourvus de propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en

réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices. (Favier A, 2003).

### **b. Antioxydants liposolubles**

#### **➤ La vitamine E**

La vitamine E étant liposoluble, se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine E est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines. (Mongens M, 2013)

#### **➤ L'ubiquinone**

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ERO. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ERO. (Babior B., 2000).

#### **➤ $\beta$ carotène**

Le  $\beta$  Carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités : précurseur de la vitamine A, capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante. (Kabouche S, 2010).

## **II. 5. Oxydation des molécules biologiques**

Certains radicaux libres, étant très réactif, réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides.

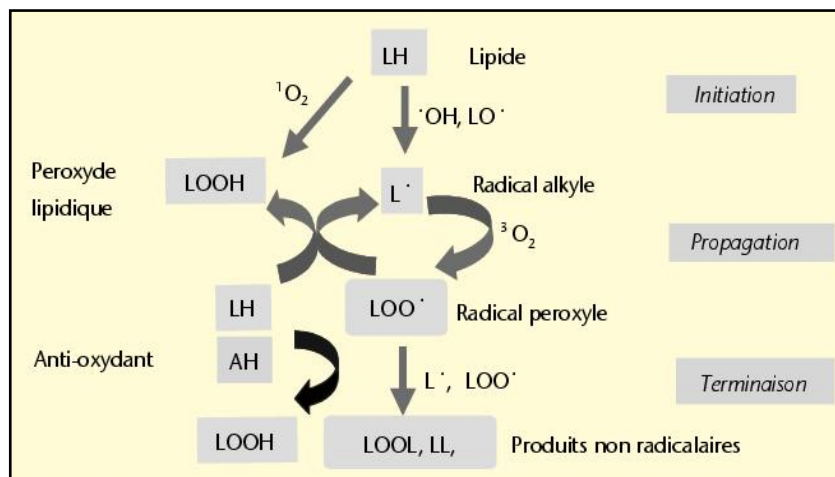
### **II. 5. 1. Peroxydation lipidique**

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. Les ERO sont capables d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde.

Cette oxydation est une réaction en chaîne qui se poursuit par la transformation du radical peroxyde, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué.

Les radicaux diènes conjugués, sous l'action de l'oxygène, se transforment en hydroperoxydes qui peuvent, soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase, soit continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et alcanes volatiles. **(Figure 9).**

Le radical peroxyde peut évoluer en un peroxyde cyclique dont la coupure peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde (MDA) ou l'hydroxynonéal (HNE). **(Badid N, 2012).**



**Figure 9** : Etapes de la peroxydation lipidique **(Josiane C et Pierre C, 2006)**

### ➤ Marqueurs biologiques

La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi ces produits formés, on peut citer l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. **(Gueye Papa M, 2007).**

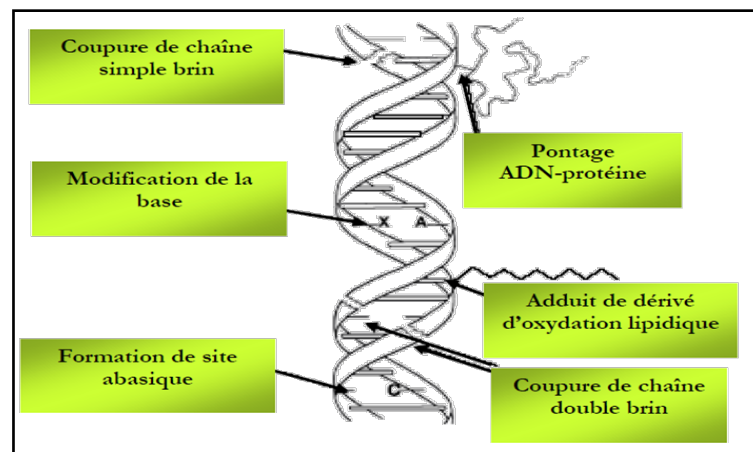
## II. 5. 2. Oxydation de l'ADN

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires. Les lésions induites par les radicaux libres au niveau de ces molécules peuvent consister en des modifications de bases, des

cassures simple-brin ou double-brin de la chaîne oligonucléotidique, ou des pontages avec des résidus protéiques.

En effet, Les modifications observées après action du radical hydroxyle sont très nombreuses et peuvent consister en une conversion des bases ou oxydation du désoxyribose entraînant une coupure des brins (**Figure 10**).

Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome. (**Therond P, 2006**).



**Figure 10** : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires.

(**Auberval N, 2010**)

### ➤ Marqueurs biologiques

Lorsqu'une guanine d'un nucléotide est hydroxylée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine, le nucléotide obtenu est la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ou 8 OHdG est non fonctionnel et excisé entièrement. La 8OHdG se retrouve dans les urines et le plasma et peut être dosée par des techniques de chromatographie. Elle est le témoin de dommages oxydatifs irréparables causés sur l'ADN par le stress oxydant. (**Auberval N, 2010**).

### II. 5. 3. Oxydation des protéines

Les protéines subissent des modifications au cours du stress oxydant, soit sous l'action des radicaux libres oxygénés, soit en présence de métaux de transition, il s'ensuit plusieurs types de modification : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines. Tous les acides aminés peuvent être oxydés, les protéines ainsi modifiées deviennent plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées par le protéasome. (**Mongens M, 2013**)

### ➤ Marqueurs biologiques

Lorsque les acides aminés constituant une protéine sont oxydés, ils peuvent former un groupement carbonyle que l'on peut rechercher (réaction avec du 2,4-dinitrophenylhydrazine) mais il s'agit d'une méthode peu spécifique. Les carbonyles présentent l'avantage d'être stables ce qui rend leur méthode de dosage plus aisée. Elles s'accumulent lors de vieillissement cellulaire, de lésions d'ischémie-reperfusion, d'inflammation chronique et de nombreuses autres maladies (diabète, insuffisance rénale...) (Therond P, 2006).

## II. 6. Evaluation du stress oxydatif

Le stress oxydant est impliqué dans les processus de vieillissement et dans de nombreuses pathologies. Ainsi, de nombreuses techniques ont été développées pour l'évaluer. Le problème de disposer de marqueurs spécifiques, sensibles, fiables et d'exécution analytique aisée, ainsi que le manque de standardisation et d'optimisation des méthodes, compliquent l'interprétation des résultats. Dans ces conditions, il conviendra, pour identifier un stress oxydant, de choisir des marqueurs adaptés au phénomène à étudier et à sa localisation (marqueurs d'oxydation lipidique pour une agression extracellulaire, ou marqueur d'oxydation de l'ADN pour une irradiation attaquant le noyau cellulaire). De plus, une combinaison d'au moins deux marqueurs différents est souvent indiquée pour pallier l'absence d'un marqueur idéal. (Favier A, 2003)

Le stress oxydant peut être évalué par trois grandes voies d'approches :

- la mesure de la production des ERO.
- la mesure des capacités de défense (statut antioxydant).
- la mesure des désordres biochimiques spécifiques créés par l'attaque des radicaux libres sur les principales cibles moléculaires (protéines, lipides et acides nucléiques). (Gueye Papa M, 2007)

## II. 7. Prévention du stress oxydatif

Lorsque les ERO ont provoqué des dégâts cellulaires, il n'y a aucun moyen thérapeutique d'action. C'est pourquoi, la lutte contre le stress oxydant est essentiellement préventive avec des suppléments nutritionnelles en antioxydants tels que les oligoéléments (fer, zinc, sélénium, manganèse et cuivre), les vitamines C et E, le béta-

carotène et les polyphénols provenant exclusivement des végétaux. (**Van Antwerpen P et Nève J, 2006**)

Les propriétés biologiques de ces molécules issues du métabolisme secondaire des végétaux seront détaillées dans le chapitre suivant.

***Chapitre III :***

***La propolis***

### III.1. Définition et étymologie

La propolis est une substance résineuse, aromatique que les abeilles récoltent à l'aide de leurs mandibules sur les bourgeons et l'écorce de certains arbres tels que les bouleaux, les ormes, les cyprès...etc. **(Astrid Nathalie K, 2008)**

Les abeilles l'utilisent à l'entrée de leurs ruche pour en protéger l'accès, c'est ce qui indique son étymologie Grec «pro» signifiant devant on défense, et «polis» signifiant la cité. **(Ferhoum F, 2010)**

Le rôle de la propolis dans la ruche est double :

-par ses propriétés mécaniques (mastic), les abeilles l'utilisent comme un ciment pour obturer les fissures, réduire l'ouverture du trou de vol dans les régions à climat froid et pour consolider les cadres.

-par ses propriétés anti septiques (anti bactérienne, anti fongique), la propolis est utilisée pour recouvrir les corps étrangers à la ruche, pour vernisser les surfaces intérieures de la ruche afin d'en supprimer les aspérités, et pour enduire les alvéoles avant le dépôt des œufs ou le stockage du pollen ou du miel. **(Astrid Nathalie K, 2008)**

### III.2. Histoire de la propolis

Nommée « cire noire » dans les textes anciens, la propolis est connue et utilisée depuis les temps les plus reculés. Hippocrate recommandait l'application de celle-ci pour traiter les ulcères et les plaies. Elle servait également à momifier les cadavres en Egypte. A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, la propolis était en plein essor grâce à ses vertus anti-infectieuses, cicatrisantes et anti-inflammatoires, d'emplâtre, de lotion ou de fumigation.

De nos jours, elle est utilisée surtout en Europe de l'est, en Asie et notamment au Japon.

**(Abdusalam K et al., 1989)**

### III.3. Propriétés physicochimiques de la propolis

La propolis est une série de substance résineuse de consistance variable en fonction de la température. Dure et friable à 15°C, elle devient molle et malléable aux alentours de 25 à 45 °C et collante ou gluante en dessus, jusqu'à fondre vers 60 – 70°C en moyenne. Son odeur est variable selon son origine. **(Kadota S, 2002)** de même pour sa couleur. Elle varie du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir en passant par toute une gamme de brun extrêmement riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.) Elle est soluble partiellement dans l'alcool (éthanol, méthanol) l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le



chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, le glycol...etc. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants. Le pourcentage d'impureté est de 18 à 34 % et d'humidité est de 5,07 %, **Figure 11.** (Segueni N, 2011)



**Figure 11:** Aspect de la propolis. (Ferhoum F, 2010)

### III.4. Composition de la propolis

#### III. 4. 1. Composition de la propolis brute

Elle est variable selon l'origine botanique, elle dépend du type des plantes accessibles aux abeilles. La race d'abeille influence également cette composition. En effet, d'après Bankova (2000), les résultats ont montré une certaine différence de composition de la propolis récoltée par trois races d'abeilles (Sibeli S, 2005). Généralement, elle est constituée de 40 à 50 % de résine, de baume composé de flavonoïdes et d'acides phénoliques ou de leurs esters, 20 à 30 % de cire, 5 à 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % de matières diverses (organiques et minérales). (Abd El Hady F et al., 2002)

#### III.4. 2. Composition de la propolis purifiée

Selon la littérature, on a pu identifier jusqu'à 150 constituants différents qui font de la propolis une véritable usine de produits chimiques. (Clémence H, 2005)

La propolis est composée de flavonoïde (flavones, flavonoles et flavanones), des acides aromatiques, des esters aromatiques, terpanoïdes, acides aliphatiques, autres matières organiques et minérales et de nombreuses vitamines (dont la vitamine A et les vitamines du groupe B). (Bonvehi J et al., 1994) Les composés phénoliques semblent les plus dominants dans la composition de la propolis, en plus ce sont les principaux

composés responsables des activités biologiques de la propolis tels que l'activité antibactérienne, antivirale et antioxydante. **Tableau 2.** (Abd El Hady F et al., 2002)

**Tableau 2:** La composition des différentes propolis en polyphénols. (Ferhoum F, 2010)

Provenance	Polyphénols (mg équivalent de l'acide gallique /g de propolis)
Santiago : - San martin	80 – 131
- Banda	115 -253
-Capital	86 – 209
- Figurau	71 - 130
Chine : - Yuman	64,7 ± 1,5
- Hubei	224 ± 5,5
- Hainan	246 ± 4,8
- Shandoug	265 ± 3,3
- Neimongole	284 ± 4,9
- Argentine	212 ± 9,2
- Brésil	120 ± 2,5
- Bulgarie	220 ± 2,5
- Sud Afrique	99,5 ± 4,4
- Uzbekistan	147 ± 6,7

### III.5. La récolte de la propolis

La récolte de la propolis s'effectue d'abord par les abeilles et ensuite par l'homme

#### III.5.1. La récolte de la propolis par les abeilles

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses. Ces ouvrières sont très spécialisées dans cette activité. Leur travail se limite au colmatage de l'intérieur de la ruche. (Segueni N, 2011)

La récolte qui ne répond pas à des règles bien définies et constantes, dépend de nombreux facteurs :Facteurs saisonniers : la récolte a lieu, selon les cas, soit en début de saison(c'est à dire au printemps) soit le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne (au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage).(Greenaway E et al , 1990)

Facteurs géographiques : il a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées propulsent plus que les ruches de plaines. (Hegazi A.G, Abd El Hady, F. K, 2002)

Facteurs climatiques (la température): les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires. **(Bankova V, 2005)**

### **III.5.2. La récolte de la propolis par l'apiculteur**

La propolis peut être récoltée selon deux techniques diverses : Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence par température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux. Pour cela les apiculteurs utilisent différents dispositifs: grille moulée en matière plastique ou en métal. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous par la propolis. Le moment idéal se situe après la récolte d'été, les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, sachant que l'hiver approche. **(Segueni N, 2011)**

Cette propolis brute ainsi récoltée doit être purifiée avant toute utilisation.

### **III.6. Utilisation de la propolis**

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

#### **III.6.1. Le cosmétique**

Toujours utilisée en cosmétologie (crème, dentifrice, produit d'épilation), la propolis est surtout utilisée pour ces propriétés anesthésiques et cicatrisantes ; elle bloque les agents infectieux, stimule le nettoyage et la granulation des tissus. Elle est employée pour le traitement des brûlures, des plaies, des aphtes, des maux de gencives et de gorge. Elle peut être présentée sous forme de pommade contenant 10 à 30 % de propolis ou associée à du miel. **(Astrid Nathalie K, 2008)**

#### **III.6.2. La médecine**

La propolis cumule des propriétés antiallergiques et anti-inflammatoires. Les propriétés immunomodulatrices de la propolis rendent son usage intéressant dans le traitement des thyroïdites auto-immunes **(Garedew A et al., 2002)**. L'activité anti-inflammatoire de la propolis est due aux flavonoïdes qu'elle contient. Les flavonoïdes inhibent l'action de l'aldose réductase et exercent avec les autres molécules aromatiques une action antivirale (grippe, angines, sinusites, otites, herpes, hépatite B, zona). **(Lamprecht I, 2002)**

### **III. 7. Propriétés biologiques de la propolis**

La propolis possède un large spectre d'activité biologique

#### **III.7.1. Propriétés antioxydante et antiradicalaire**

Des extraits enrichis en flavonoïdes et en polyphénols issus de la propolis présentent des propriétés antioxydantes très importantes par inhibition de la lipoperoxydation de l'acide linoléique. (Segueni N, 2011)

#### **III.7.2. Propriétés anti-inflammatoires**

L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les flavonoïdes de la propolis lui confère cette action anti-inflammatoire, utile dans les inflammations de la cornée, de la trachée, du pharynx ou dans l'arthrite rhumatoïdale. Cet effet est dose-dépendant et est plus fort pour les extraits aqueux de propolis ou pour la cire de propolis utilisée sous forme de cataplasme (Clémence H, 2005).

#### **III.7.3. Propriétés immunomodulatrice**

La propolis est considérée comme modulateur de la réponse biologique. Elle stimule le système immunitaire à produire plus de macrophage. Ses effets biologiques bénéfiques sur le système immunitaire existent en partie grâce au CAPE. La propolis régule l'expression de gènes qui contribuent à la reconnaissance des micro-organismes et favorise donc la réponse immunitaire. La propolis, par sa richesse en agents défenseurs naturels devient une aide précieuse dans la compréhension du cancer et son traitement. (Gharbi M, 2011)

#### **III.7.4. Propriétés anticancéreuses**

Les propriétés anti-carcinogènes de la propolis ont été démontrées par de nombreuses études sur l'animal (Vohora S, 1991). Elles sont dues aux flavonoïdes et à un dérivé de l'acide caféique identifié comme étant un inhibiteur tumoral. (Arjun H et al., 2004)

#### **III.7.5. Propriétés antimicrobiennes**

##### **a. Activité antibactérienne**

Des travaux ont mis en évidence l'activité antibactérienne de la propolis. L'association avec des antibiotiques classique permettrait de réduire les phénomènes de résistance et de baisser les dosages de ces produits (Borcic I et al., 1998). Son spectre antibactérien est très large, en agissant sur les staphylocoques, les streptocoques, *Helicobacter pylori*, les *Bacillus*, les salmonelles ou encore les microcoques (Jarrahi M et

al., 2004). Cette activité est essentiellement due aux flavonoïdes, à certaines molécules aromatiques et à l'acide cinnamique. (Ferhoum F, 2010)

#### **b. Activité antifongique**

La propolis stimulerait le système immunitaire en augmentant la production macrophages, efficaces contre les affections fongiques. Ainsi, elle a une action contre les champignons pathogènes tels que *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* ou encore *Microsporum canis*. (Rhajaoui M et al., 2001)

#### **c. Activité antiviral**

Grâce à la présence des flavonoïdes, la propolis est efficace contre le poliovirus, les virus de type Herpes (par des esters de l'acide caféique) et l'adénovirus et présente aussi une relative efficacité dans la grippe, l'hépatite B ainsi que le zona. (Segueni N, 2011)

### **III.7.6. Autres propriétés**

La propolis possède de nombreuses propriétés biologiques et pharmacologiques faisant l'objet de plusieurs études. On peut citer des propriétés digestives (Miorin P et al., 2003), hypoglycémiantes (Soncourt M.P, 1984), hépatoprotective. (Eum-Hee P et al., 1996), régénération tissulaire. (Bankova V, 2005),...etc.

***Chapitre IV :***  
***Les polyphénols***

#### IV. 1. Définition des polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits.

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production.

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière. (Nkhili E-Z, 2009)

#### IV. 2. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols a été proposée par HARBORNE en 1980 **Tableau 3**. On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base.

Deux principales classes sont largement répandues :

- Monomérique
- Polymérique

**Tableau 3** : Principales classes de composés phénolique (Manallah A, 2012)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, Pomme, citrus
	Coumarines	Myristicine, eugénol	
	Isocoumarines	Scopolétine	
	Chromones	Myristicine, eugénol	
	Eugénine		
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiférine	
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
	Anthraquinones	Anthraquinones	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes, Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daïdzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
	Neolignanes	Eusiderine	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoïdes	Amentoflavone	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tannins condensés		

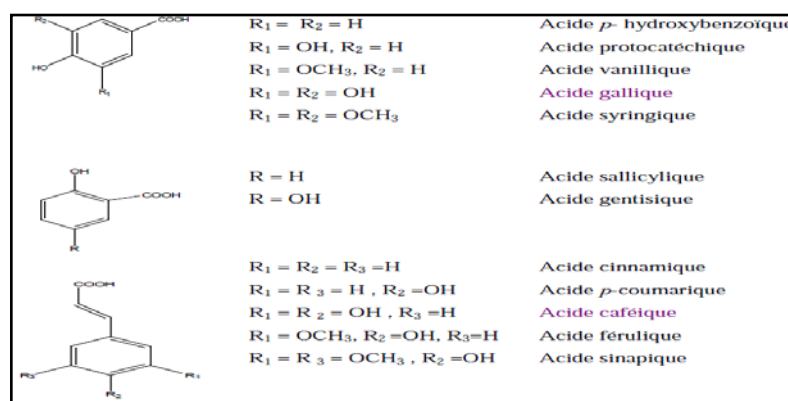
**IV. 2. 1. Polyphénols monomériques**

**a. Acides phénoliques**

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués **Figure 12**.

Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique,

Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique.



**Figure 12** : Exemples d'acide phénoliques (Bouguerne B, 2012)



## b. Les flavonoïdes

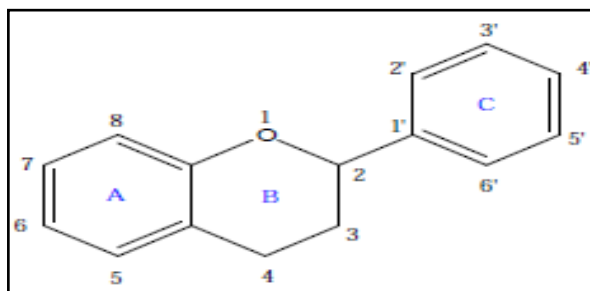
Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés phénoliques. Ils se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes.

Ces divers composés 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 organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Les flavonoides sont absorbés par l'homme à chaque fois qu'un aliment d'origine végétale est consommé.

Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones « **2-phényl-1 benzopyrane** », constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un cycle pyranique central **Figure 13**.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C.



**Figure 13** : Structure de base des flavonoïdes (Muanda N, 2010)

### b. 1. Flavones et flavonols

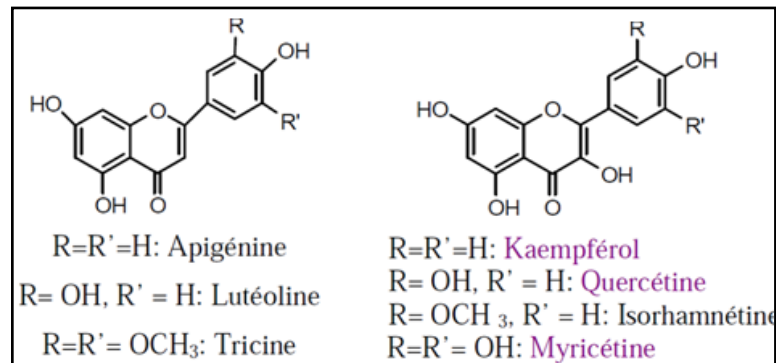
Dans plus de 90% des cas, le **noyau A** des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7

Le **noyau B** est monosubstitué dans 80% des cas en position 4', ou disubstitué en positions 3' et 4', ou trisubstitué (moins fréquemment) en positions 3', 4' et 5'. Ces substituants peuvent être des groupes OH (Hydroxyl) ou OMe (O-méthyl).

Le **noyau C** peut être substitué par un groupement OH, OMe ou O-Gly (O-glycosyl).

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 **Figure 14**.

Ces composés constituent le groupe le plus hydroxylé de la famille des flavonoïdes. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses : D-glucose, D-galactose, L-rhamnose et L-arabinose.

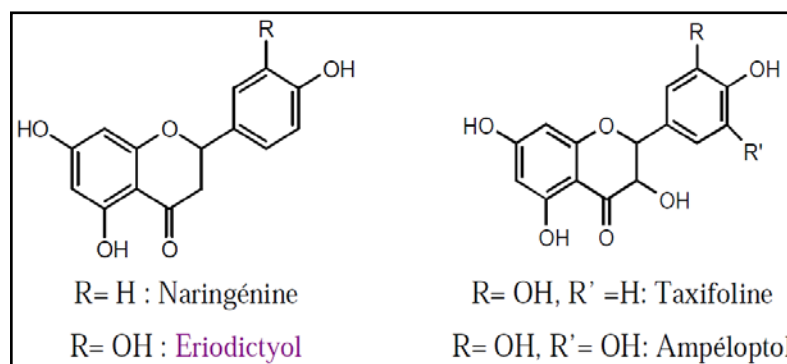


**Figure 14** : Structures chimiques des flavones et des flavonols (Adjadj M, 2009)

**b. 2. Flavanones et flavanonols**

Les flavanones et les flavanonols (dihydroflavonols) sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 **Figure 15**. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et flavonols.

Les flavanonols (encore appelés dihydroflavonols) se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3.



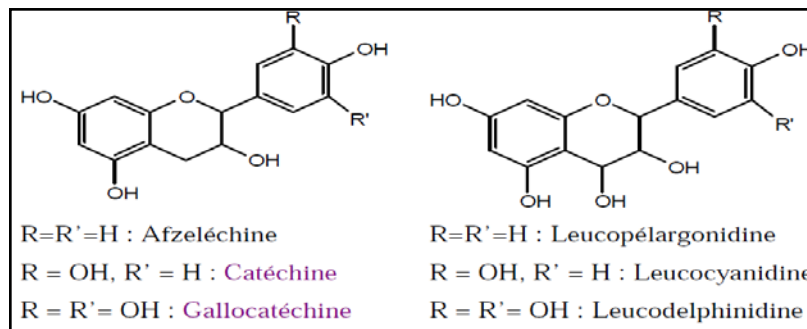
**Figure 15** : Structures chimiques des flavanones et flavanonols (Nkhili E-Z, 2009)

**b.3. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols**

À la différence des flavanones et des flavanonols, ces deux groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4.

Les flavan-3-ols (appelés aussi les catéchines) possèdent deux atomes asymétriques en C2 et C3.

Les flavan-3,4-diols se distinguent des catéchines par la présence du OH en position 4  
**Figure 16.** Ils possèdent trois atomes de carbones asymétriques.



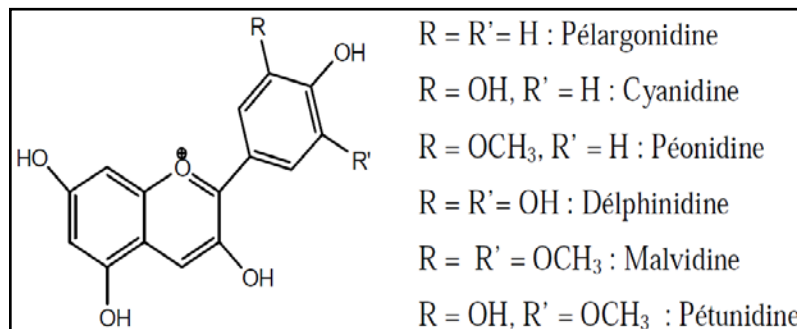
**Figure 16 :** Structures chimiques des flavanones et flavanonols (Nkhili E-Z, 2009)

**b. 4. Anthocyanes**

Ce sont des pigments très répandus dans les fleurs et les fruits.

Les anthocyanes sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques.

Dans la nature, ces pigments n'existent pas sous forme aglycone, mais sous forme d'hétérosides. Les sucres sont souvent liés au chromophore en position 3et 5 **Figure 17.**

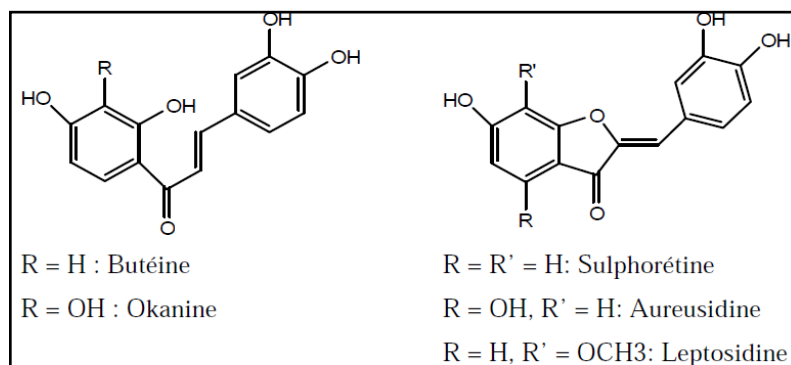


**Figure 17 :** Structures chimiques des anthocyanes. (Rezaire A, 2012)

### b. 5. Chalcones et aurones

Les chalcones sont différentes des autres types des flavonoïdes cités ci-dessus par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont donc constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, insaturée **Figure 18**. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont identiques à celles des autres flavonoïdes.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.



**Figure 18** : Structures chimiques des chalcones et aurones (Nkhili E-Z, 2009)

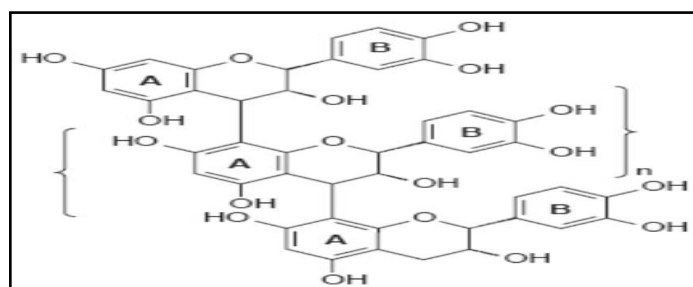
## IV. 2. 2. Polyphénols sous forme de polymères

### a. Tanins

Ils représentent un groupe hétérogène de structures chimiques variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes. On peut distinguer les tanins hydrolysables et tanins condensés.

• **Tanins hydrolysables** : ils sont constitués par une molécule de sucre estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés.

• **Tanins condensés (catéchiques)** : ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines). **Figure 19**.



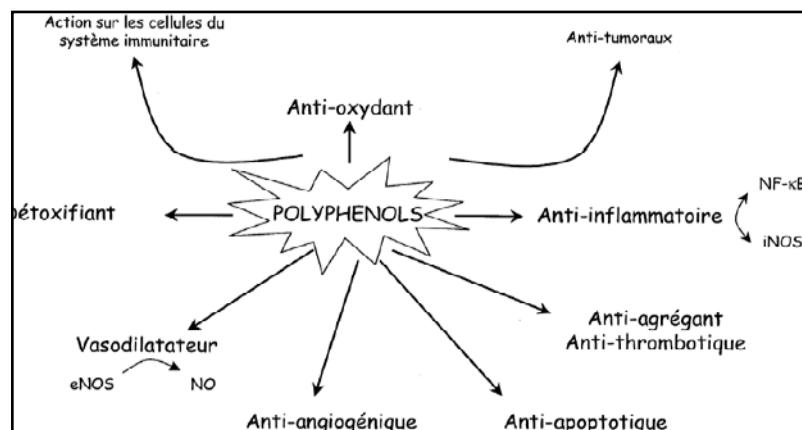
**Figure 19** : Exemple de structure de base des tanins condensés. (Ferradji A, 2011)

## b. Lignines

Ces composés de haut poids moléculaires contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères résultant de la condensation (copolymérisation) de trois alcools phénylpropéniques. (Donatien K, 2009)

### IV. 3. Propriétés biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont de plus en plus utilisés en thérapeutique. En effet ces composés montrent des activités antioxydantes, anti carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti thrombotiques, analgésiques, antibactériennes, antiviraux (Babar Ali, *et al*, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs **Figure 20**.



**Figure 20** : Effets biologiques des polyphénols (Manallah A, 2012)

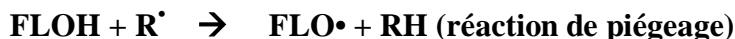
#### IV. 3. 1. Activité antioxydante

La capacité antioxydante est le principal rôle physiologique attribué aux polyphénols. Elle est assurée par divers mécanismes :

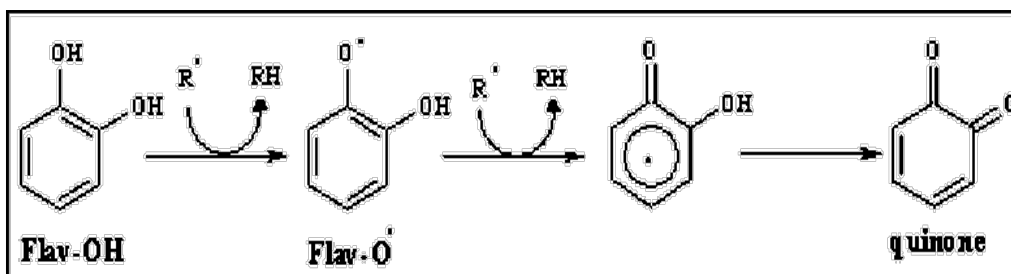
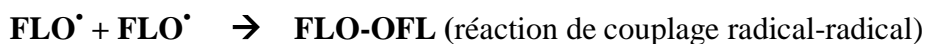
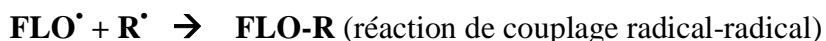
- Le piégeage direct des EOR
- La chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la protection des systèmes de défense antioxydants

### a. Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes, classe majeure des polyphénols, sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyyle (FLO•) **Figure 21**. Ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

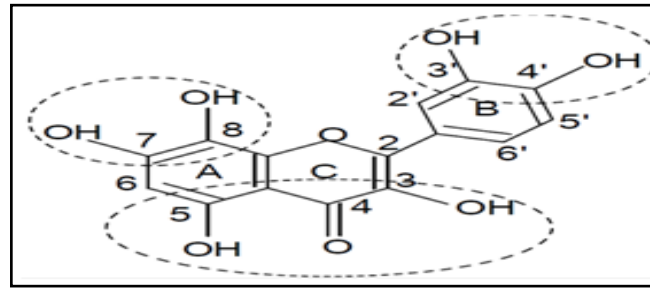


**Figure 21:** Piégeage des ERO (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable. (Yakhlaf G, 2010)

La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite **Figure 22** :

- Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire.
- Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5.

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante



**Figure 22 :** Critères structuraux essentiels liés à l'activité antiradicalaire des flavonoïdes. (Zeghad N, 2009)

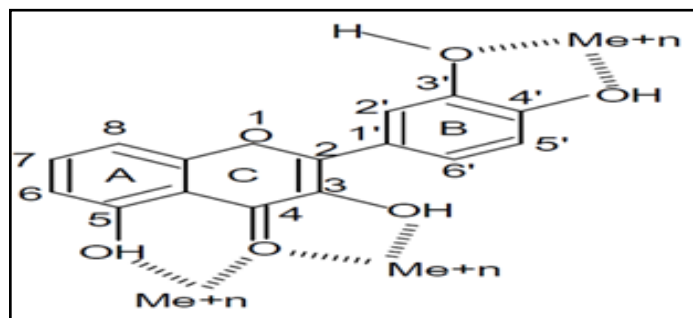
**b. Chélation des ions métalliques**

Les ions métalliques peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique en produisant le radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton :



Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs. Cette chélation nécessite trois sites principaux **figure 23 :**

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C



**Figure 23:** Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques.

(Meziti A, 2009)

### c. Inhibition des enzymes

L'inhibition de la production des EOR par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des EOR. Cette double action est bien illustrée par le cas de la xanthine oxydase, cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. L'étude de Hansaki et al. (1994) a montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains. Cos P et al., 1998 a confirmé les résultats de Hansaki, et ont établi les relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité d'inhiber la formation de superoxyde par inhibition de la xanthine oxydase (formation de complexes enzyme-inhibiteur) et/ou par réduction du superoxyde produit.

Par ailleurs, de nombreux flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs des métalloenzymes tels que lipoxygénase. (Athamena S, 2009)

### IV. 3. 2. Activité antimicrobienne

Les polyphénols sont des composés principaux antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action diverses et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de microorganismes procaryotes et eucaryotes (bactéries et champignons).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe.

#### Tableau 4.

**Tableau 4** : Modes d'actions antimicrobiennes de quelques polyphénols. (Djaballi S,2012)

Différents composés phénoliques	Exemples	Mécanisme
Phénols simples	Catéchol	Privation du substrat. Interruption de la fonction membranaire. Destruction de la paroi cellulaire et désactivation des enzymes.
Acides phénoliques	Epicatchine	
	Acide Cinnamique	
Quinones	Hypericine	
Tanins	Ellagitannine	Liaison aux protéines. Inhibition de l'enzyme. Privation du substrat. Complexe avec la paroi cellulaire. Interruption de la fonction membranaire.
Coumarines	Warfarine	Complexe avec les ions métalliques. Interaction avec l'ADN des eucaryotes (activité antivirale).



Parmi les polyphénols antibactériens, les flavonoïdes bloquent la synthèse des acides nucléiques d'*Escherichia coli*. Ils ont un pouvoir inhibiteur sur les différentes fonctions de la membrane cytoplasmique en réduisant la fluidité de la couche interne et externe. Ces composés ont une activité bactéricide et bactériostatique en perturbant les métabolismes énergétiques.

#### IV. 3. 3. Effet antiallergique

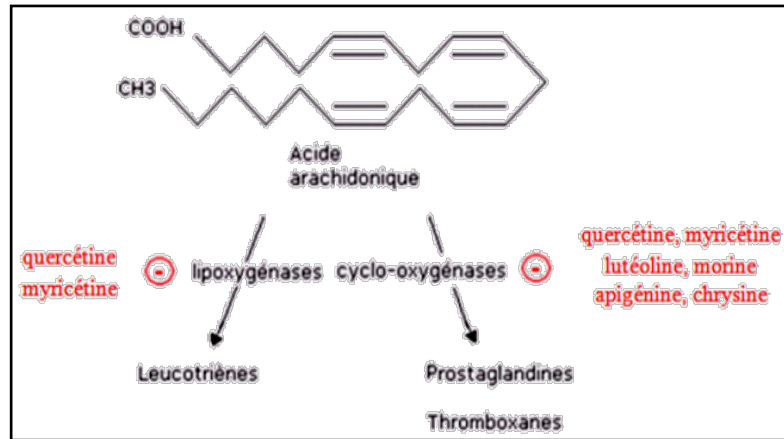
Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATP ase  $Ca^{2+}$ -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATP ase  $Ca^{2+}$ -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. (Zeghad N, 2009).

#### IV. 3. 4. Effet anti-inflammatoire et immunologique

Les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T. Leur effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase). **Figure 24.**

Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercétine a un effet anti inflammatoire en inhibant les enzymes de synthèse des principaux médiateurs de l'inflammation (la cyclooxygénase pour les prostaglandines et la li-oxygénase pour les leucotriènes). (Kebieche M, 2009)



**Figure 24 :** Inhibition de la lipoxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes. (Yakhlaf G, 2010)

#### IV. 3. 5. Effet anticancéreux

La catéchine (présente dans le thé vert), la catéchine a montré une activité anti-tumorale. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde à inactiver l'action de la P-glycoprotéine qui est impliquée dans la résistance phénotypique des cellules cancéreuses. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes et la réduction des radicaux libres. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase. (Dal-Ros S, 2009)

# *Partie expérimentale*

*Chapitre V :*  
*Matériel et méthodes*

Notre étude expérimentale a été effectuée au sein des laboratoires d'immunologie et de Biochimie à l'université de 08 Mai 1945, Guelma.

### **I. 1. Produits spécifiques à l'étude**

Afin d'étudier l'effet protecteur des polyphénols (pure ou contenus dans l'extrait de la propolis) dans la préservation hypothermique du cœur, nous avons utilisé les produits et les réactifs spécifiques suivants :

- l'extrait éthanolique de la propolis (extrait marron visqueux). Cet extrait éthanolique de la propolis nous a été gracieusement fourni par le Laboratoire de Toxicologie Moléculaire. Université Seddik Ben Yahia. Jijel.
- La quercétine : un flavonoïde pur (poudre jaune  $C_{15}H_{10}O_7$  ; M : 302,23 g/mole).
- La chrysin : un flavonoïde pur (poudre blanche,  $C_{15}H_{10}O_4$  ; M : 254,23 g/mole).
- La solution de Krebs Hensleit : une solution de conservation expérimentale des organes. Elle est constituée de glucose, NaCl,  $NaHCO_3$ , KCl,  $KH_2PO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$ ).

### **I. 2. Matériel animal et conditions d'hébergement**

L'étude a été réalisée sur des souris albinos femelles provenant de la faculté de pharmacie. Constantine. Pesant entre 18g et 28g. Dès leur réception, les souris sont réparties en 5 groupes dans des cages pour une période d'acclimatation (une semaine) avant d'être traités et sacrifiés.

Pendant cette période les animaux ont libre accès à l'eau et à la nourriture provenant de Dar El Falleh, Chelghoum Elaid. Les souris sont maintenues dans une animalerie à température ambiante.

## **II. Méthodes**

### **II. 1. Protocol expérimental**

L'étude de l'effet des différentes substances antioxydantes (Extrait éthanolique de la propolis, la chrysin et la quercétine) a été réalisé *in vitro*. En effet, le traitement du tissu cardiaque par ces substances se fait après l'avoir prélevé de la souris

## **II. 1. 1. Sacrifice des animaux et prélèvement du cœur**

Le sacrifice et le prélèvement du cœur sont effectués sur toutes les souris une à une. La souris est anesthésiée par inhalation du chloroforme, une fois endormi, elle est étalée sur la planche de dissection où ses quatre extrémités sont tirées et fixées par des épingles.

Vérifiant que la souris vie encore, sa cage thoracique est ouverte et le cœur battant est prélevé rapidement et plongé dans une solution froide (+4°C) de Krebs Hensleit. Le battement du cœur prélevé permet l'entrée de la solution de Krebs à l'intérieur du cœur et sa sortie à l'extérieur ce qui assure un bon rinçage du tissu.

Cette opération de rinçage est optimisée en perfusant le cœur à l'aide d'une seringue contenant la même solution de Krebs froide.

## **II. 1. 2. Traitement des cœurs prélevés : phase de l'ischémie froide**

Afin d'évaluer l'effet des différentes substances flavonoïques sur l'ischémie cardiaque hypothermique, le traitement des cœurs *in vitro* consiste à les mettre dans des solutions de préservation (solution de Krebs Hensleit), froide (+4°C) supplémentées ou non d'antioxydant. Pour cela, les 35 cœurs ont été partagés comme suit :

**Lot 1 : Témoin :** 07 cœurs rincés sont plongés dans une solution de Krebs Hensleit seule pendant 30 minutes à +4°C.

**Lot 2 : Ethanol :** 07 cœurs rincés sont plongés dans une solution de Krebs Hensleit supplémentée d'éthanol (1,9 %) pendant 30 minutes à +4°C.

Il faut noter que l'éthanol a été utilisé comme solvant pour dissoudre l'extrait éthanolique de la propolis, la chryisine et la quercétine à cause de leur insolubilité dans de l'eau distillée.

**Lot 3 : Propolis :** 07 cœurs rincés sont plongés dans une solution de Krebs Hensleit supplémentée d'extrait éthanolique de propolis diluée à 1/10000  $\mu\text{L}$  pendant 30 minutes à +4°C.

**Lot 4 : Quercétine :** 07 cœurs rincés sont plongés dans une solution de Krebs Hensleit supplémentée de quercétine (100  $\mu\text{M}$  dans 1,9 % d'éthanol) pendant 30 minutes à +4°C.

**Lot 5 : Chryisine :** 07 cœurs rincés sont plongés dans une solution de Krebs Hensleit supplémentée de chryisine (100  $\mu\text{M}$  dans 1,9 % d'éthanol) pendant 30 minutes à +4°C.

### **Remarque**

Chaque cœur est préservé séparément dans des petits pots couverts contenant chacun un volume total de 10 ml de la solution de préservation. Ces pots fermés sont gardés au froid dans un réfrigérateur (+4°C).

## **II. 2. Evaluation du statut oxydatif au niveau du tissu cardiaque**

### **II. 2. 1. Préparation des homogénats du cœur**

Une fois que les 30 minutes sont écoulées et que la phase de conservation des cœurs s'est achevée, Cinq cœurs de chaque lot sont pesés ensuite découpés en petits morceaux puis homogénéisés dans deux solutions tampons différentes :

- Pour le dosage du malondialdéhyde (MDA) le tampon utilisé est une solution de KCl 1,15% (**Ohkawa H et al., 1979**)
- Pour le dosage du glutathion réduit (GSH), une solution d'EDTA (0,02M) a été utilisée. (**Ellman G-L, 1959**)

L'homogénéisation a été effectuée à + 4°C avec un potter de Dounce (Kimble Chase)

Les homogénats sont enfin centrifugés à 3000 tours/min (tpm), à +4°C pendant 15 min. Les surnageants récupérés sont utilisés pour les différents dosages.

### **II. 2. 2. Dosage tissulaires**

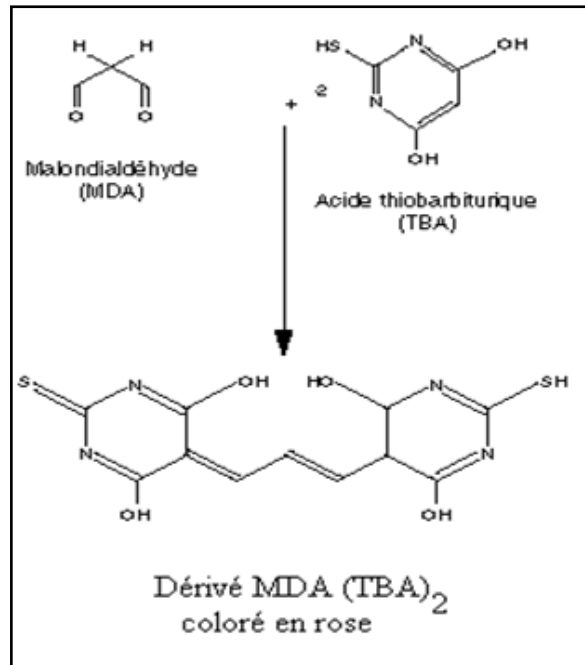
#### **a. Mesure du taux du Malondialdéhyde cytosolique (MDA)**

Le MDA est un des biomarqueurs fiable de l'oxydation des membranes cellulaire et mitochondriale car c'est un des produits terminaux de la lipoperoxydation.

Ce dosage met en évidence l'effet délétère des radicaux libres existant au sein de la cellule cardiaque au cours de l'ischémie produite lors de la préservation du cœur.

#### **➤ Principe de la méthode**

Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un complexe chromogène de couleur rose absorbant la lumière à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol. (**Ohkawa H et al., 1979**) (**Figure 25**).



**Figure 25:** Schéma de réaction entre le TBA et le MDA (Lefèvre M, 1998)

### ➤ *Mode opératoire*

À 0,5 ml de la fraction cytosolique du cœur, 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés

Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre (Jenway 6305) à 532 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée.

Le taux de MDA est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage réalisé à partir du 1,1,3,3-tétraéthoxypropane qui lors de son hydrolyse acide libère du MDA.

L'activité du MDA est exprimée en n mole/gramme de tissu cardiaque.

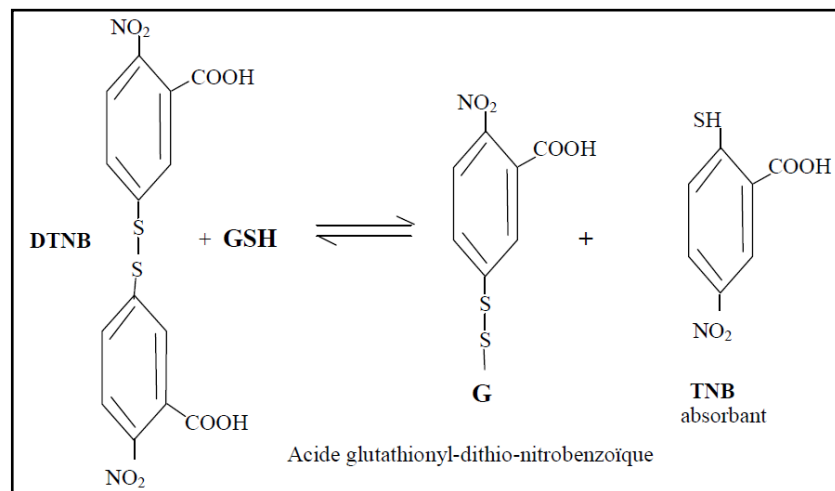
### **b. Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH)**

Le glutathion est un tripeptide composé de trois aminoacides doté d'un pouvoir antioxydant, puisque il se trouve sous deux formes : une forme oxydée « GSSG » et une forme réduite « GSH » représentant plus de 99 % de la quantité totale. Cette molécule est également utilisée par les peroxydases (la glutathion peroxydase) pour détoxifier la cellule des espèces réactives de l'oxygène.



### ➤ Principe

Pour l'évaluation de la concentration du glutathion réduit chez les souris, la méthode de **Sédlak et raymond 1967** a été utilisée. Il s'agit d'une réaction chimique évoluant en une seule étape suivie d'une détection colorimétrique. Le réactif d'*Ellman* (Acide 5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoïque) ou DTNB est réduit par les groupes thiol (SH) libérant ainsi l'acide 2-nitro 5-mercaptobenzoïque, qui à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante (**Figure 26**) :



**Figure 26:** Schéma de réaction entre le DTNB et le GSH (Gueye Papa M, 2007)

### b. Mode opératoire

1.5 ml du tampon Tris 0,2M (pH 8,2 dans de l'EDTA 0,02M) sont ajoutés à 0,5 ml de la fraction cytosolique. Ensuite 0,1 ml de DTNB (0,01M dans du méthanol) est ajouté puis le volume est complété à 10 ml par du méthanol absolu.

Après incubation de 15 minutes à température ambiante, le mélange réactionnel est centrifugé à 3000 tpm pendant 15 minutes.

Enfin, la densité optique du surnageant est lue par spectrophotomètre à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'EDTA 0,02M.

Le taux de GSH est calculé à partir d'une courbe d'étalonnage préparée par le GSH.

Les résultats sont exprimés par n mole/gramme de tissu cardiaque.

### **II. 3. Etude histologique des cœurs préservés à froid**

Afin d'étudier les modifications pouvant toucher le tissu cardiaque suite à la conservation hypothermique des cœurs dans des solutions supplémentées en antioxydants polyphénolique (brute ou pure), une analyse histologique des coupes faites sur le cœur à été réalisée.

Pour cela, deux cœurs, de chacun des lots cités ci-dessus, sont débarrassés de l'excès de la solution de préservation par un papier buvard. Ensuite ils ont été plongés dans une solution de fixation qui est le formaldéhyde 10%.

Pour une meilleure comparaison des structures du tissu cardiaque d'un lot à un autre, deux cœur sains non traités (n'ayant pas subi une conservation hypothermique) ont été rapidement prélevés de deux souris saines anesthésiées et rincés par une solution physiologique (NaCl 9‰), puis fixés directement dans du formaldéhyde 10%.

La suite des étapes de la préparation des coupes histologiques a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyse médicales NIHA, Annaba.

L'observation des coupes histologiques des cœurs des différents lots est réalisées par un microscope optique (Optika B-350) grossissement  $\times 40$ .

### **II. 4. Analyse statistique**

Les résultats quantitatifs des évaluations réalisées *in vivo* sont exprimés en moyenne  $\pm$  écartype. Ces résultats sont traités statistiquement par le test d'ANOVA suivi par test de simultanéité de Dunnett pour les comparaisons avec le niveau de contrôle (témoin) et par le test de simultanéité de Tukey pour toutes comparaisons deux à deux entre les différents niveaux.

Le seuil de signification est supérieur à 95% ( $p < 0.05$ ), tel que :

( $p > 0.05$ ) désigne un effet non significatif. ( $p \leq 0.05$ ) désigne un effet significatif. ( $p \leq 0.01$ ) désigne un effet très significatif. ( $p \leq 0.001$ ) désigne un effet hautement significatif.

L'ensemble des traitements statistiques est réalisé à l'aide du logiciel **Graph Pad Prisme** version 6.02.

*Chapitre VI :*

*Résultats*

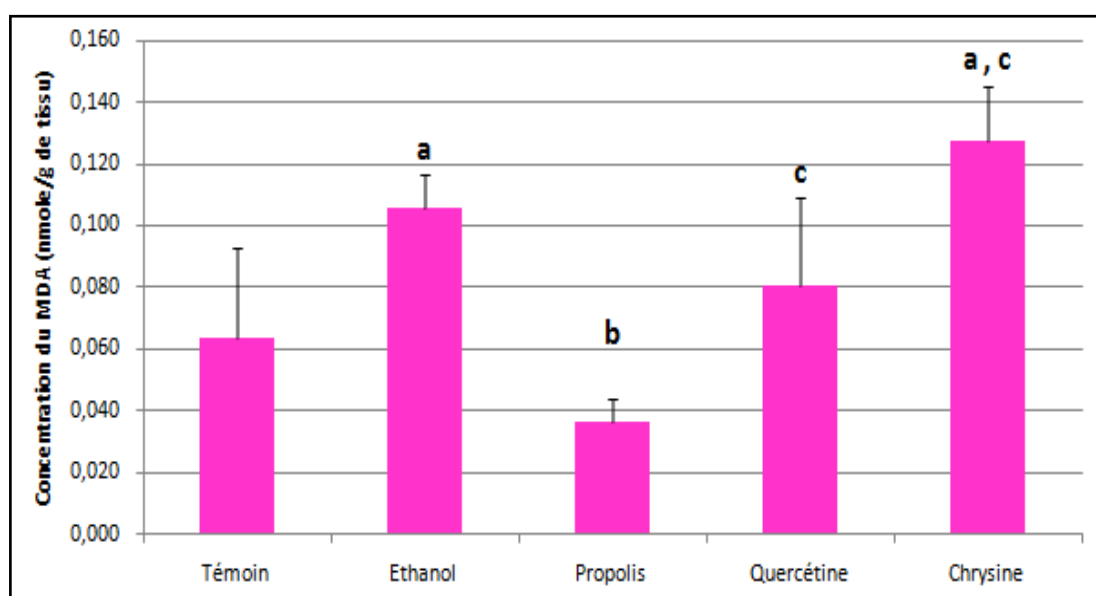
*et interprétations*

## I. Evaluation du statut oxydatif au niveau du tissu cardiaque

### I. 1. Mesure du taux du Malondialdéhyde cytosolique (MDA)

La conservation des cœurs dans des solutions supplémentées de flavonoïdes pures (quercétine et chryisine), d'extrait de polyphénols (extrait éthanolique de la propolis) et d'éthanol (solvant des polyphénols) a provoqué des changements de la concentration du MDA illustrés par la **figure 27**.

Les concentrations du MDA ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage réalisée par le tétraéthoxypropane dont l'équation est  $y=0,0184x$



Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écartype, test ANOVA : (a) : Comparaison avec le lot témoin (test dunnet), désigne un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ) ; (b) : Comparaison avec le lot éthanol (test tukey), désigne un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ) ; (c) : Comparaison avec le lot propolis (test tukey), désigne un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 27:** Variations des taux du MDA cytosolique au niveau des cœurs préservés.

D'après ce graphe, en comparant les résultats des différents lots par rapport à celui du lot témoin ( $0,064 \pm 0,029$  nmole MDA/g de tissu), on observe que la concentration du taux du MDA augmente significativement ( $p \leq 0,05$ ) dans le lot traité par l'éthanol ( $0,106$  nmole/g de cœur), de même pour le lot chryisine qui montre une augmentation encore plus élevée et hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) du taux du MDA ( $0,127 \pm 0,018$  nmole/g de cœur). Une légère augmentation du taux du MDA a été également élevée dans le lot traité par la quercétine ( $0,080 \pm 0,029$  nmole MDA/g de tissu) mais qui reste non significative ( $p \geq 0,05$ ).

Par contre, on distingue une diminution considérable du taux du MDA dans le lot traité par la propolis ( $0,036 \pm 0,007$  nmole MDA/g de tissu) cette diminution est statistiquement non significative ( $p \geq 0,05$ ).

Par ailleurs, en comparant les résultats obtenus chez les trois lots traités par les polyphénols par rapport à celui du lot éthanol, on remarque une réduction hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) de la concentration du MDA chez le lot traité par la propolis et non significative dans le lot traité par la quercétine ( $p \geq 0,05$ ). Contrairement à ce qu'on peut constater chez le lot chryisine où on remarque une augmentation non significative ( $p \geq 0,05$ ) du taux du MDA.

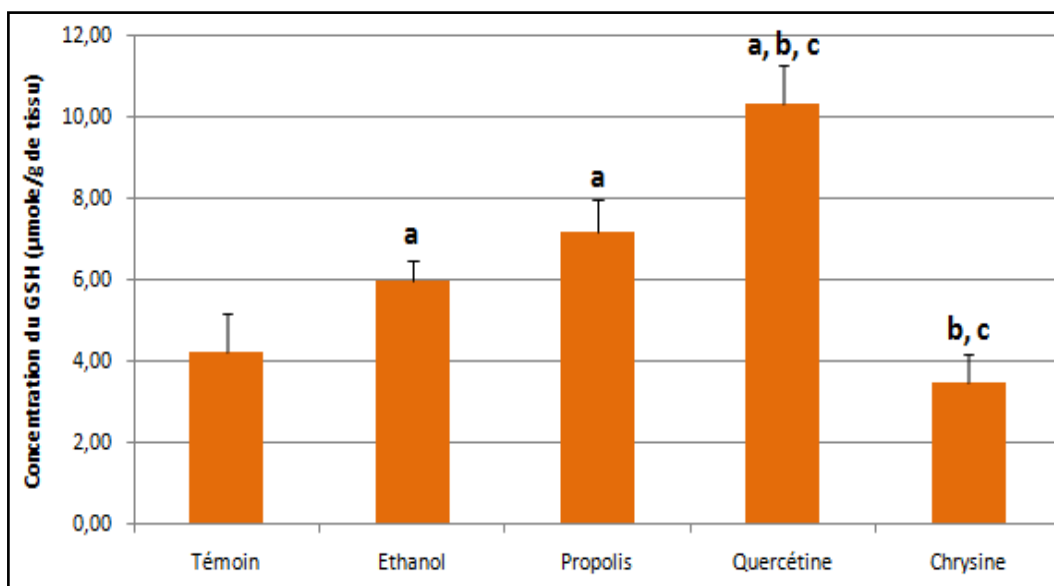
En faisant une troisième comparaison des deux derniers lots avec le lot propolis, on observe une augmentation significative du taux de MDA chez le lot traité par la quercétine ( $p \leq 0,05$ ), cette augmentation est considérable et hautement significative dans le lot traité par la chryisine ( $p \leq 0,001$ ).

Enfin, on peut dire que la différence des taux du MDA entre les lots quercétine et chryisine est significative ( $p \leq 0,05$ ).

## **I. 2. Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH)**

Pour interpréter la valeur de l'absorbance des échantillons affiché par photomètre en des valeurs de concentration du GSH, une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant différentes dilutions d'une concentration mère de GSH (2mM). Le résultat de cet étalonnage est représenté dans **l'annexe 1**.

A partir de l'équation d'étalonnage  $y=0,670x$ , on pu tracer l'histogramme représenté par la **figure 28**.



Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écartype, test ANOVA : (a) : Comparaison avec le lot témoin (test dunnet), désigne un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) ; (b) : Comparaison avec le lot éthanol (test tukey), désigne un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) ; (c) : Comparaison avec le lot propolis (test tukey), désigne un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ).

**Figure 28:** Variations des taux du GSH cytosolique au niveau des cœurs préservés.

Au regard des résultats obtenus qui montrent les variations des taux du glutathion réduit au niveau des cœurs préservés on peut déduire trois comparaisons différentes.

La première est avec le lot témoin ( $4,23 \pm 0,95$  nmole de GSH/g de tissu), on constate qu'il y a une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) du taux du GSH dans les trois lots qui sont traités par l'éthanol, la propolis et la quercétine avec des valeurs respectives ( $5,99 \pm 0,52$  ;  $7,21 \pm 0,78$  et  $10,34 \pm 0,95$  µmole GSH/g de cœur), par contre on distingue une diminution non significative ( $p \leq 0,05$ ) de la concentration du GSH dans le lot qui est traité par la chrysine ( $3,49 \pm 0,71$  µmole GSH/g de tissu).

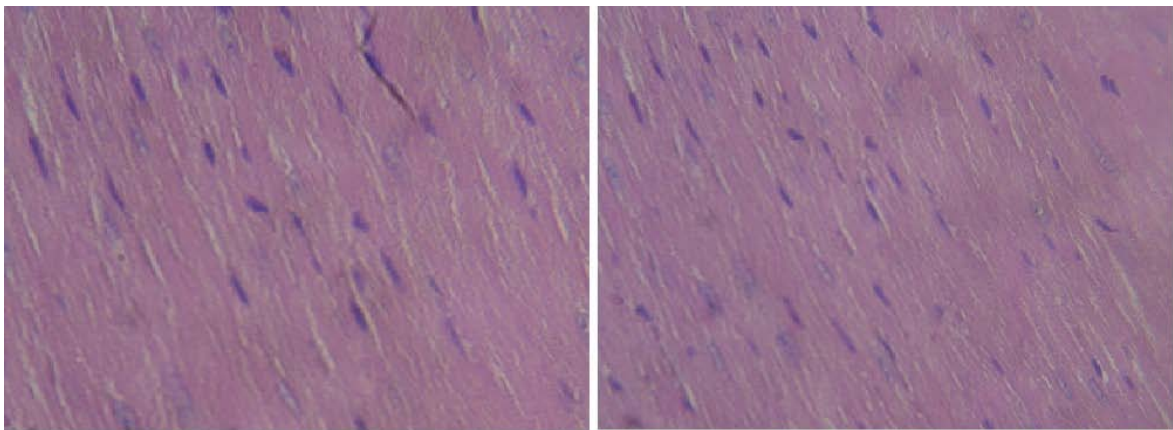
La deuxième comparaison faite par rapport au lot éthanol montre une augmentation non significative ( $p \geq 0,05$ ) dans le lot traité par la propolis et hautement significative dans le lot traité par la quercétine ( $p \leq 0,001$ ). Par contre, il y a une réduction hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) dans le lot traité par la chrysine.

La troisième comparaison effectuée par rapport au lot propolis prouve qu'il y a une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) dans le lot traité par la quercétine, par

ailleurs, on remarque aussi une diminution hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) dans lot qui a été traité par la chrysine.

### **II. 3. Etude histologique des cœurs préservés à froid**

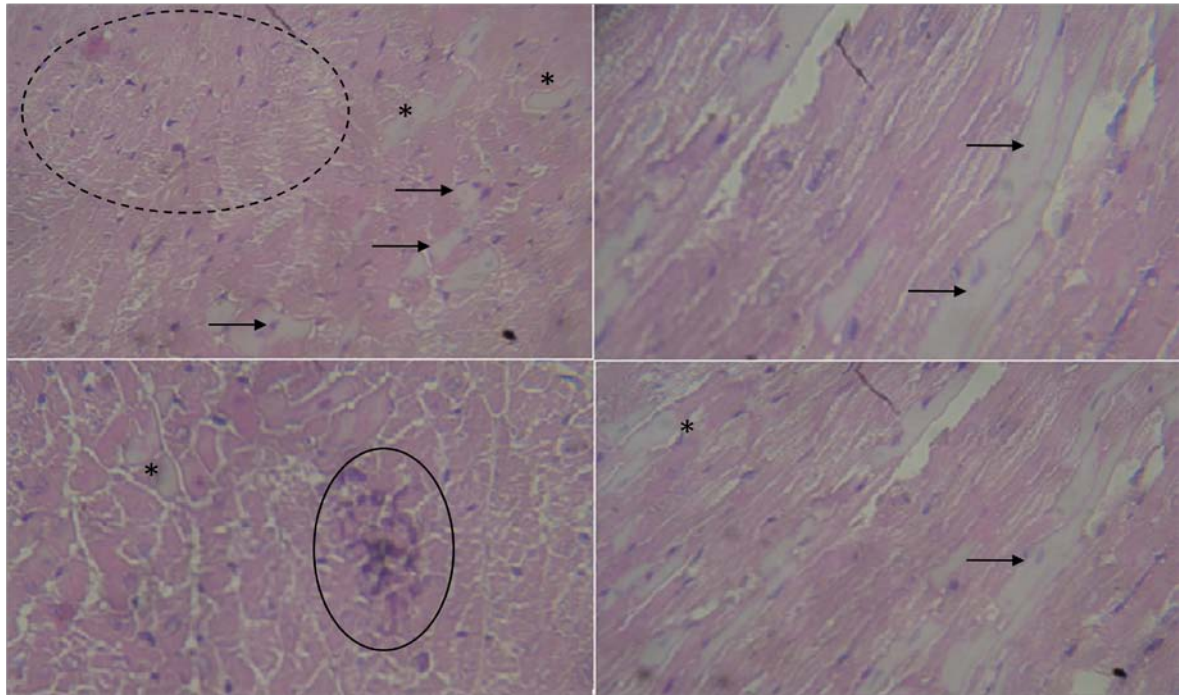
Les images des coupes histologiques réalisées sur des cœurs sains non traités (prélevés et fixés directement) montrent un aspect normal du tissu cardiaque. En effet le tissu cardiaque sain est constitué de cellules musculaires de forme allongée. Les cardiomyocytes sont ajustés les uns aux autres ayant des noyaux ovoïdes en position centrale (couleur bleue) et un cytoplasme (coloration rose).



**Figure 29** : Coupes longitudinales du cœur sain non traité ( $G \times 40$ ).

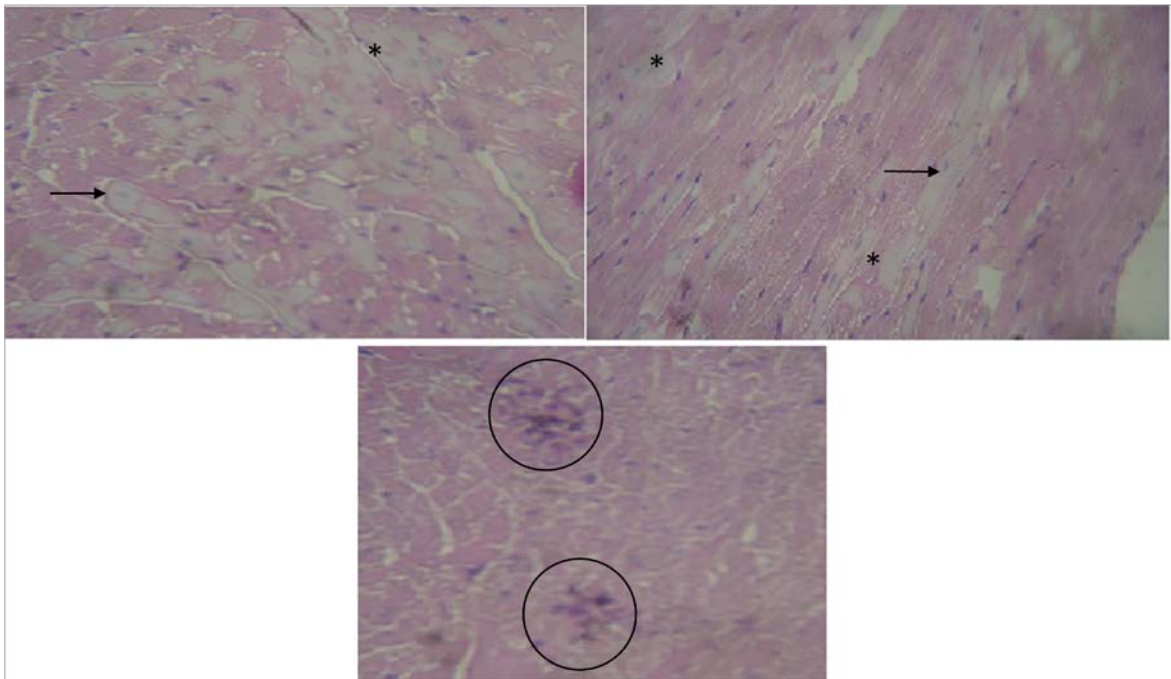
D'après les photos des coupes faites sur les cœurs préservées dans la solution de Krebs seule (lot : témoin), plusieurs types de lésions ont été observés au niveau des cardiomyocytes. En effet, on remarque que beaucoup de cardiomyocytes ont perdu leur aspect fusiforme d'origine et deviennent des cellules de forme anarchique (**flèche**). Ces cellules là ont perdu la coloration de leur cytoplasme (coloration devenue grise) avec perte du noyau dans la majorité des cellules (\*).

Par ailleurs, il y a certaines régions de la coupe où les cellules sont complètement déformées et ne sont plus délimitées par une membrane (**cercle discontinu**). Il est à noter aussi qu'on a remarqué au niveau de certaines zones des amas de particules (cellules mortes ou débris cellulaires) de coloration rose foncées ou violet (**cercle continu**).



**Figure 30:** Coupes longitudinales du cœur témoin préservé non traité ( $G \times 40$ ).

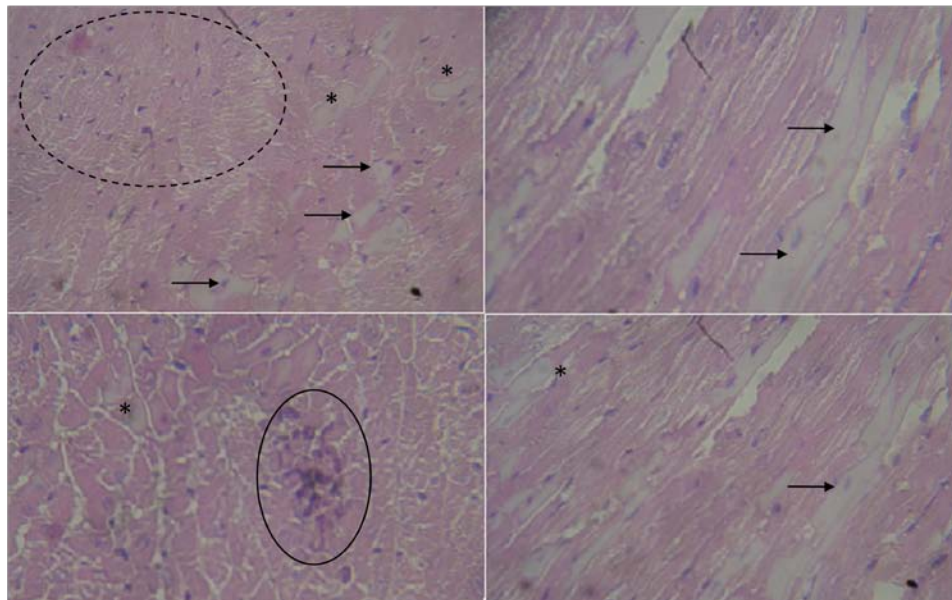
Concernant les cœurs préservés dans une solution de Krebs supplémentée d'éthanol (1,9%), leur tissu a les mêmes lésions cellulaires remarquées chez le tissu témoin avec un degré moindre de sévérité.



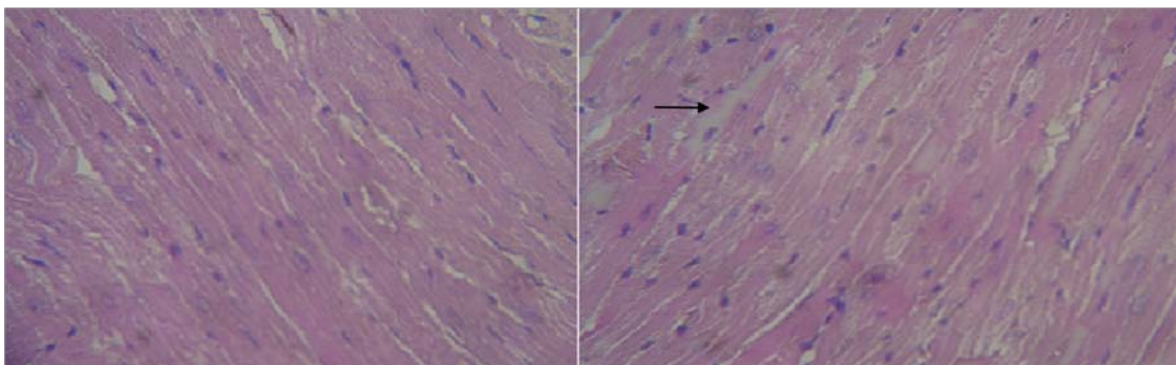
**Figure 31:** Coupes longitudinales du cœur préservé traité par l'éthanol ( $G \times 40$ ).



D'une autre part, la préservation des cœurs dans une solution contenant la propolis n'a pas provoqué des lésions considérables à l'échelle histologique. Les cellules ont un aspect général normal presque similaire à celui du tissu sain non préservé, en effet les cardiomyocytes ont une forme allongée normale avec une coloration normale et un noyau bleu centré. Néanmoins on a remarqué la présence rare des cellules décolorées (cellules grises) n'ayant pas perdu leur aspect allongé normal (**flèche**).



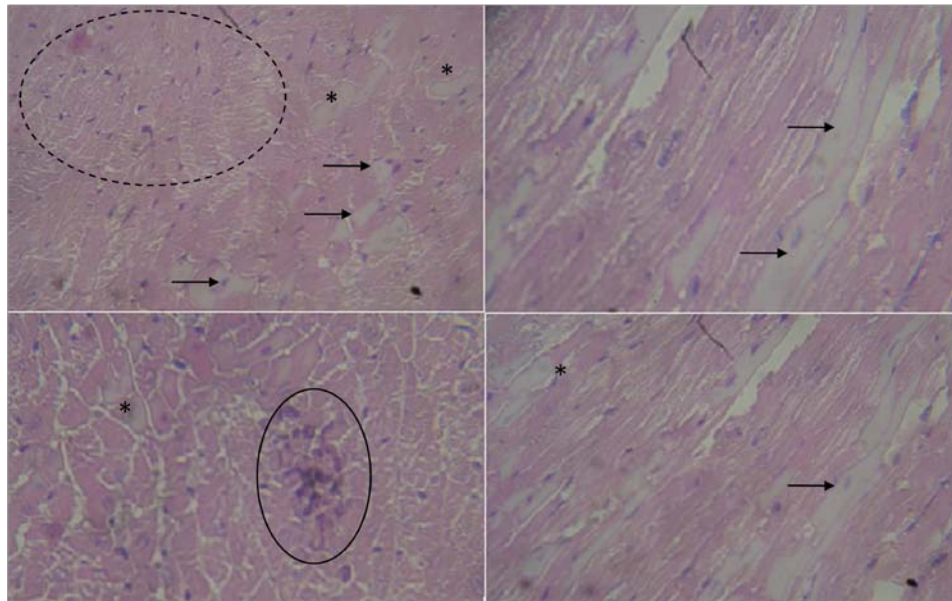
Coupes longitudinales du cœur témoin préservé non traité



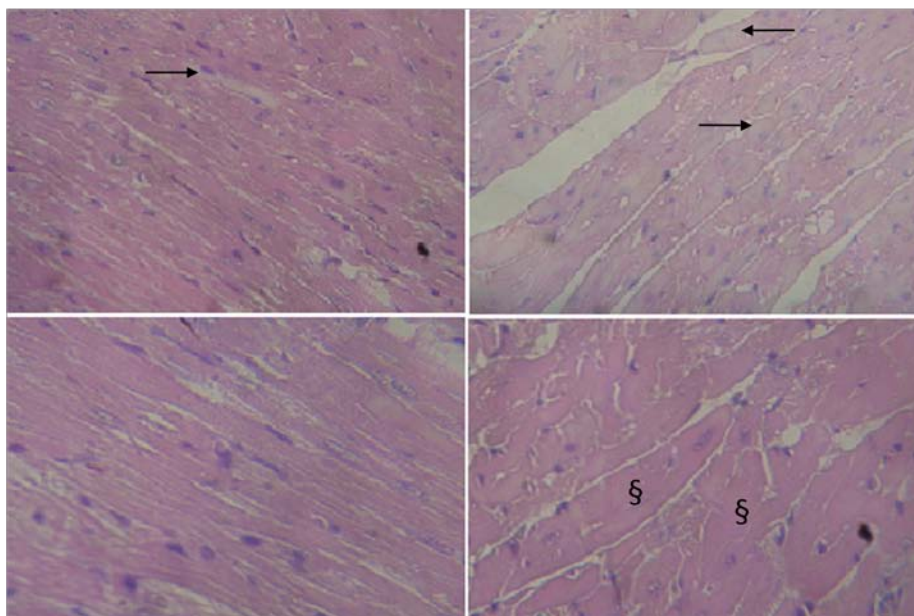
**Figure 32:** Coupes longitudinales du cœur préservé traité par la propolis (G  $\times$  40).

Par ailleurs, la supplémentation de la solution de Krebs par la quercétine dissoute dans de l'éthanol a provoqué quelques dommages déjà vus dans les cœurs du lot témoin et du lot éthanol mais qui restent moins importants. On y retrouve les cellules décolorées (moins

nombreuses) (**flèche**), d'autres déformées (§). Cependant on peut noter qu'il existe plusieurs cellules normales colorés en rose et nucléées.

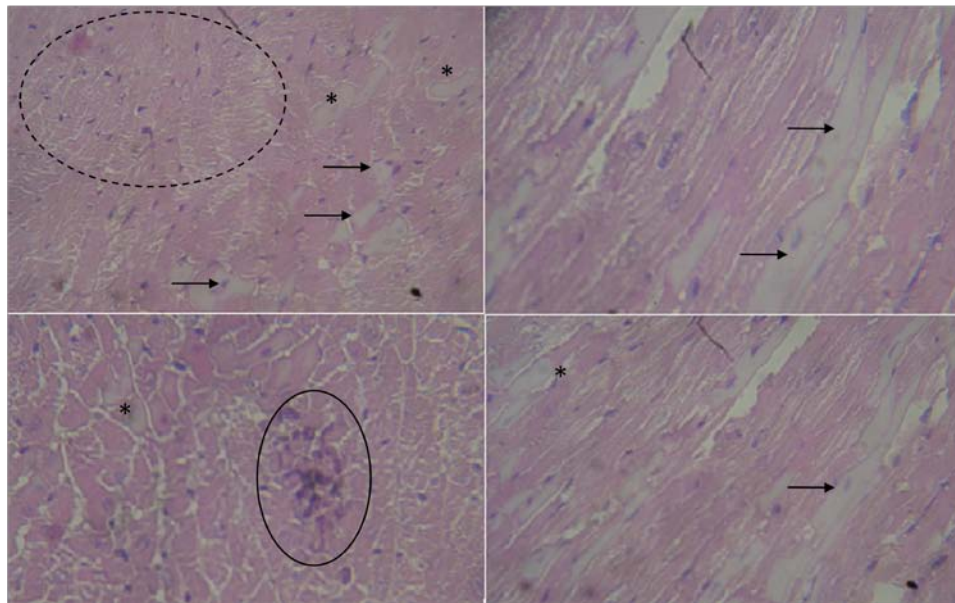


Coupes longitudinales du cœur témoin préservé non traité

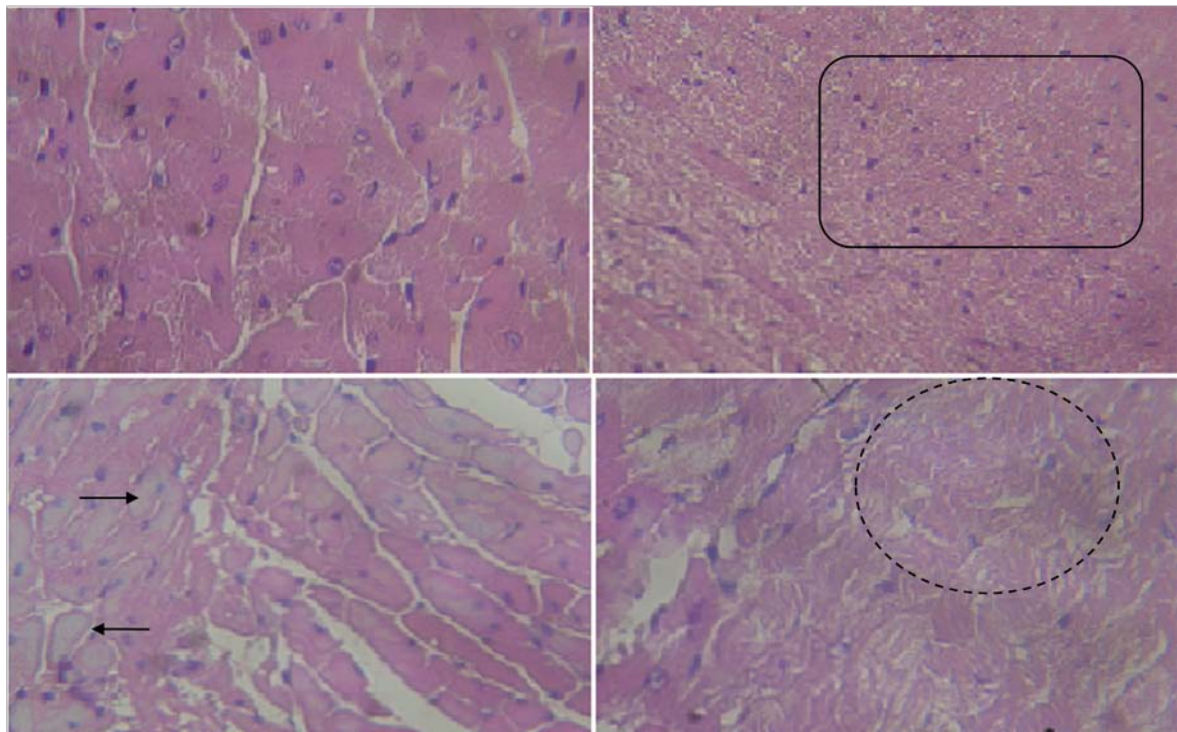


**Figure 33:** Coupes longitudinales du cœur préservé traité par la quercétine (G  $\times$  40).

Enfin, les cœurs traités préservés en présence du flavonoïde chrysin (dissous dans de l'éthanol) montrent des cellules décolorés (**flèche**), la majorité des cellules ont perdu leur forme allongées, elles ne sont plus délimitées (**cercle discontinu**) et sont devenues anastomosées (**cadre**).



Coupes longitudinales du cœur témoin préservé non traité



**Figure 34:** Coupes longitudinales du cœur préservé traité par la chrysin (G × 40).

# *Discussion*

C'est au cours des dix dernières années que se sont accumulées les études expérimentales sur le stress oxydatif dont les résultats démontrent que ce dernier joue un rôle majeur et initial dans le développement des principales manifestations du syndrome d'ischémie reperfusion **(Hyardin A, 2008)**. Le stress oxydant survient lorsque la balance entre les systèmes oxydants et antioxydants bascule en faveur des premiers, entraînant la génération de radicaux libres oxygénés.

Cependant, les flavonoïdes, polyphénols produits par les végétaux, peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ERO. Sous certaines conditions, ces flavonoïdes sont cependant susceptibles de se comporter comme agent prooxydant et engendrer une altération des protéines, de l'ADN ou encore des lipides membranaires et des glucides.

Ayant comme objectif d'évaluer l'effet protecteur des flavonoïdes lors d'une ischémie hypothermique produite lors de la préservation du cœur dans une solution de Krebs à 4°C, nos résultats obtenus montrent des variations des taux du malondialdéhyde et du glutathion réduit cytosoliques au niveau des cœurs préservés qui changent d'un lot à un autre.

Concernant le premier paramètre, révélateur du degré d'oxydation des lipides membranaires de la cellule cardiaque, on a remarqué qu'au niveau du lot témoin ainsi que tous les lots traités, il existe une concentration assez considérable de MDA, ceci peut être expliqué par la production des radicaux libres ayant comme cibles préférée les acides gras insaturés des membranes de la cellule (membrane cellulaire, mitochondriale,... etc.). Malgré que le lot témoin n'a pas été traité par une substance génératrice de radicaux libres, on peut dire que l'état de l'ischémie est source de production des radicaux libres. En effet l'état de surcharge calcique en phase d'ischémie peut moduler l'activité de plusieurs enzymes productrices de radicaux libres. Le calcium concentré dans la cellule active la xanthine oxydase source importante de l'anion superoxyde, ainsi que la NO synthase productrice du monoxyde d'azote qui en présence d'anion superoxyde donne le radical peroxynitrite très réactif et toxique. **(Bernard M et al., 2009)**

En plus, les résidus d'oxygène dans la cellule cardiaque ischémiée ainsi que la quantité limitée de l'oxygène présente dans la solution de Krebs sont suffisants pour induire une

production, par une chaîne respiratoire mitochondriale défaillante, des espèces radicalaires en phase d'ischémie (**Masoumeh A., Brian B., 2009**).

D'autre part, la préservation des cœurs dans la solution de Krebs supplémentées d'éthanol (solvant utilisé pour dissoudre les flavonoïdes) a provoqué une augmentation significative du taux du MDA, ceci est probablement causé par le métabolisme de l'éthanol qui est accompagné par la production de radicaux libres. Ces radicaux libres sont à l'origine de la lipoperoxydation des membranes donnant comme produit final le MDA.

La supplémentation de la solution de Krebs par deux flavonoïdes purs différents a donné deux résultats complètement différents. Le premier avec la quercétine a donné une augmentation du taux du MDA supérieure à celui du témoin et inférieure à celui du lot éthanol. Cette augmentation peut être expliquée par la présence d'éthanol dans la solution de préservation car il a été utilisé pour faire dissoudre la quercétine, donc plus de radicaux libres formés par le métabolisme de l'éthanol. Comparée au lot éthanol, la quercétine a diminuée le taux du MDA car c'est un flavonoïde à fort pouvoir antiradicalaire, cependant cet effet n'est pas suffisant à lui seul, les flavonoïdes travaillent en complémentarité avec les enzymes antioxydantes, ces dernières ont été inhibées par la température basse de la solution de préservation (4°C) (**Fornas D, 2010**), par conséquent, l'activité antiradicalaire de la quercétine seule est submergée par la quantité importante des radicaux libres dans la cellule ischémisée.

Le second résultat de supplémentation par la chryisine, un flavonoïde pur, a fortement augmenté le taux du MDA, cette augmentation est probablement expliquée par le fait que ce flavonoïde a provoqué un effet prooxydant, et a donc augmenté la production des radicaux libres et par conséquent le degré d'oxydation des lipides membranaires. En effet, une étude réalisée par **Guohua C. et ses collaborateurs (1997)** ont montré que les flavonoïdes ayant deux groupements hydroxyles en position 3' et 4' ont particulièrement une importante activité d'absorption du radical peroxyde impliqué fortement dans la cascade d'oxydation des lipides membranaires par les radicaux libres. On peut dire que cette raison explique la faible activité anti lipoperoxydative de la chryisine qui contrairement à la quercétine, ne possède pas deux groupements hydroxyles en position 3' et 4'.

Par ailleurs, on a noté une diminution considérable du taux de MDA dans le lot traité par la propolis, Ceci prouve l'important effet préventif de cet extrait polyphénolique sur la peroxydation lipidique induite par les espèces radicalaires produites en phase d'ischémie. Cet effet protecteur peut être dû à la captation des molécules du MDA par les flavonoïdes

contenus dans l'extrait de propolis ou bien à l'inhibition des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique au niveau cytosolique grâce aux flavonoïdes de l'extrait connus pour leur propriété antiradicalaire. (**Alyane M., 2008**)

En plus, la propolis contient de nombreux flavonoïdes et acides phénoliques pouvant avoir un effet antioxydant synergique sur les radicaux libres et la peroxydation lipidique. En effet, la propolis utilisée dans cette étude contient la pinostrombine chalcone, la tectochrysin et la pinocembrine (**Boutabet K. et al., 2011**). Ce dernier flavonoïde est connu pour son effet protecteur contre l'oxydation et l'apoptose induites par l'ischémie/reperfusion cérébrale selon deux modèles expérimentaux chez le rat *in vivo* et *in vitro* (**Liu R et al., 2008**)

De nombreux travaux ont montré l'effet protecteur de la propolis contre ERO, Grâce à la présence d'une quarantaine de flavonoïdes et des acides phénoliques chez certains types de propolis, l'activité antioxydante est particulièrement élevée c'est ce dernier permet d'agir comme antioxydant (**Lakenbrink C et al., 2009**).

Concernant l'évaluation de l'état antioxydant de la cellule cardiaque ischémisée, le dosage du glutathion réduit (GSH), antioxydant non enzymatique constituant la première ligne de défense antiradicalaire, a montré une augmentation des taux de GSH suite à la supplémentation de la solution de Krebs par la propolis et la quercétine. Ces résultats montrent l'effet préventif des flavonoïdes, contre la déplétion du GSH cytosolique. Cette augmentation du taux du GSH, constatée fortement chez le lot traité par la propolis, est probablement due à l'induction de sa synthèse ou expliqué possiblement par le fait que les flavonoïdes testés ont neutralisé les métabolites toxiques de l'éthanol et donc empêché la consommation du GSH. Nos résultats sont en accord avec ceux décrits dans plusieurs travaux, cet effet démontre le pouvoir antiradicalaire des polyphénols en général et de la propolis plus spécialement. (**Boutabet K. et al., 2011**)

Le résultat (diminution du taux de MDA et augmentation du taux de GSH) du traitement des cœurs avec la propolis durant leur préservation est en accord avec l'étude de **Ligeret H. et ses collaborateurs (2008)** qui ont trouvé que la silibinine (100µM dans 1,9% éthanol), un flavonoïde extrait de la plante *Silybum marianum*. a un effet antioxydant dans la préservation hypothermique du foie suivie d'une reperfusion normothermique et ceci en diminuant la génération de l'anion superoxyde et le taux du MDA et en restaurant la concentration du GSH cytosolique.

Contrairement à ce qui est connu dans la littérature (**Viña J., et al. 1980**), l'éthanol a causé une augmentation du taux de GSH au lieu de provoquer sa déplétion. Ce résultat n'a pas été décrit dans les références bibliographiques auparavant.

Quand à la supplémentation par la chryisine, elle a provoqué une déplétion très significative du GSH. Ce résultat ne fait que confirmer l'effet prooxydant de ce flavonoïde supposé au départ et constaté par l'augmentation significative du taux du MDA. La forme prooxydante du flavonoïde et les radicaux libre générés par le métabolisme de l'éthanol et de l'état d'ischémie ont été neutralisés par la forme réduite du glutathion ce qui cause sa consommation à l'intérieur de la cellule et sa déplétion.

Une étude de **Sang-Won Park et Sun-Mee Lee (2008)** sur l'effet antioxydant et prooxydant de l'acide ascorbique au cours d'un épisode d'ischémie/reperfusion hypothermique hépatique, a montré que cette vitamine C, connue pour sa propriété antioxydante s'est montrée prooxydante à une concentration de 2mM et a joué le rôle d'antioxydant à des concentrations moindres.

Dans une deuxième partie de notre étude nous avons effectué des coupes histologiques longitudinales dans les cœurs préservés afin de voir les éventuelles lésions du tissu cardiaque suite au traitement par l'éthanol, la propolis, la quercétine ou la chryisine.

Le lot témoin où les cœurs étaient préservés et n'ayant subi aucun traitement par les flavonoïdes a manifesté de nombreuses lésions cellulaires ayant en commun une défaillance au niveau de la membrane cellulaire. Ceci a été remarqué aussi chez le lot, éthanol, chryisine. En effet la forme des cellules cardiaques, normalement allongée, est devenue anarchique à cause du dysfonctionnement de la membrane cytoplasmique. Ceci est probablement expliqué par l'attaque oxydative des radicaux libres (produit en phase d'ischémie, par le métabolisme de l'éthanol ou par la chryisine elle-même ayant acquis une activité prooxydante) sur la membrane cellulaire riche en acides gras polyinsaturés ce qui cause des altérations structurales de la membrane diminuant ainsi sa fluidité et augmentant sa perméabilité. Une autre explication de la perte de forme des cellules cardiaque est la surcharge calcique caractéristique de l'ischémie qui module l'activité de certaines protéines et enzymes  $Ca^{2+}$  dépendants, c'est le cas de la calpaïne activée par une augmentation cellulaire de calcium qui clive la spectrine, cette dernière est une protéine fibreuse du cytosquelette qui tapisse la zone latérale intracellulaire de la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Donc on peut dire que la spectrine clivée par la calpaïne activée par le niveau élevé du calcium suite à l'ischémie



ajoute une autre raison à la peroxydation lipidique pour expliquer la perte de l'intégrité membranaire des cellules cardiaque.

Un autre type de lésion histologique est celui de la perte de la coloration du cytoplasme de nombreuses cellules avec perte ou non du noyau de la cellule. Ceci est expliqué par l'entrée de ces cellules en nécrose. Selon **Fawcett Don W. (2002)**, l'aspect de la cellule en voie de nécrose subi des changements à savoir : un gonflement cellulaire lié à l'altération de l'homéostasie ionique en phase d'ischémie prolongée et à l'altération membranaire de la cellule (**Meyer G., 2010**) ; une diminution de la coloration du cytoplasme et enfin une lyse de cette cellule.

Par ailleurs, l'amas de cellules ou débris cellulaires observés dans le lot témoin et celui de l'éthanol aussi est probablement des cellules en phase d'apoptose ou des corps apoptotique qui n'ont pas été phagocytés par les macrophages (puisque l'expérimentation est réalisée *in vitro*). En effet, selon **Fawcett Don W. (2002)**, la cellule morte par apoptose ne gonfle pas mais diminue de volume et le cytoplasme se désagrège en petits globules limités par une membrane.

Par ailleurs, de nombreuses études ont associé un dysfonctionnement mitochondrial causés par les radicaux libres à la fois à la mort cellulaire nécrotique et apoptotique (**Eum et al., 2007**). Les mitochondries sont également la source principale de production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène, qui, lorsqu'ils sont surproduits, endommagent les membranes et les protéines mitochondriales par le biais de la peroxydation lipidique. Ces dommages de la peroxydation des lipides ainsi que la concentration du calcium à l'intérieur de la mitochondrie peuvent augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale conduisant à une perte de l'intégrité mitochondriale et à une libération des facteurs proapoptotique mitochondriaux tels que le cytochrome c, l'AIF. (**Coura M., Argauda L., 2010**)

D'autre part la conservation des cœurs dans une solution de krebs contenant la propolis a préservé l'intégrité tissulaire et n'a pas provoqué de lésions significatives. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'effet synergique des flavonoïdes de la propolis s'est opposé à l'action oxydative des radicaux libres sur les lipides de la membrane cytoplasmique et mitochondriale. (**Callejas Marlène, 2009**) et ils ont protégé l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale induite par les radicaux libres et donc a épargné la cellule cardiaque de la mort par nécrose et par apoptose.

*Conclusion*  
*et perspectives*

Ce travail s'est proposé d'étudier l'effet préventif des flavonoïdes purs (quercétine et chrysin) ou contenus dans l'extrait éthanolique de la propolis dans la préservation hypothermique du cœur.

Notre étude réalisée *in vitro* montre que l'extrait de la propolis possède une bonne capacité antioxydante (une diminution du taux du MDA et une augmentation du taux de glutathion réduit) et assure une protection de l'intégrité du tissu cardiaque, en raison de ses propriétés anti oxydantes liées à sa composition en polyphénols et flavonoïdes.

Les flavonoïdes purs quercétine et chrysin se sont comportés différemment à l'intérieur de la cellule cardiaque ; la quercétine a montré un caractère antioxydant mais qui a été submergé par la quantité des radicaux libres, par contre la chrysin un autre flavonoïde s'est comporté comme prooxydant.

Notons aussi que l'éthanol s'est avéré toxique pour les cellules cardiaques ischémiées tant à l'échelle biochimique qu'au niveau histologique.

Notre travail expérimental ne fait que le début d'une série de recherches pouvant être envisagées afin de déployer plusieurs points, à savoir :

- Dosage d'enzymes antioxydantes au niveau de la cellule cardiaque pour une meilleure compréhension de l'effet antioxydant des flavonoïdes lors de l'ischémie hypothermique.
- Evaluation de l'effet des flavonoïdes au niveau mitochondrial en période d'ischémie en mesurant la respiration mitochondriale et l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.
- Evaluation de l'effet protecteur des flavonoïdes, en utilisant une solution de préservation spécifique à la conservation hypothermique du cœur (Celsior).
- Comparaison des effets anti-ischémiques de plusieurs flavonoïdes.
- Tester l'effet protecteur des flavonoïdes et plus précisément de la propolis sur un modèle *in vivo* d'ischémie/ reperfusion.
- Mettre en évidence les facteurs pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF) au niveau cytosolique qui sont des indicateurs de l'incidence de l'apoptose lors de la préservation du cœur à froid.

*Les références  
bibliographiques*

## Références bibliographique

- Abd El Hady, F. K., Hegazi, A. G**, 2002. Egyptian propolis 2. Chemical composition, Antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Z Naturforsch* ; 57.4-28.
- Abdusalam, K. S., Mohamed, M., El-Nawawy, M. A**, 1989. Effect of propolis on some bacterial species. *Egyptian Journal of Phytopathology*; 21.61-68.
- Adjadj Moufida**, 2009. Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva (L.) Schreber*. Mémoire de Magister, toxicologie cellulaire et moléculaire, université Mentouri Constantine, 96.
- Alyane M., Benguedouar L., Kebsa W., Bousenane H. N., Rouibah H., Lahoual M**, 2008. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak. J. Pharm. Sci*; 21, 201-2
- Arjun H.Banskota, Yasuhiro Tezika, Jeevan. Prasian, Katsumichi Matsushige, Ikuo Saiki et Shigetoshi Kadota**, 2004. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal agric.food chem*; 52.56-78.
- Astrid Nathalie Karine Toullec**, 2008. Abeille Noire, apis mellifera mellifera, historique et sauvegarde. Thèse de doctorat, vétérinaire, université d'Alfort, 168.
- Athamena Souad**, 2009. Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cuminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mémoire de magistère, biochimie appliquée, université de Elhadj Lakhdar-Batna, 88.
- Auberval Nathalie**, 2010. Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat, physiologie et biologie des organismes-populations-interactions, université de Strasbourg, 258.
- Babior B.M**, 2000. Phagocytes and oxidative stress. *American journal médecine* ; 109. 33-44.
- Badet Lionel, Engène Michel, Hanet Thierry, Barrou Benoit**, 2006. L'utilisation des liquides de conservation en transplantation rénale. *Progrès en urologie* ; 16.25- 31.
- Badid Naima**, 2012. Stress oxydatif et profil nutritionnel chez une population de femmes atteintes de cancer du sein dans la région de Tlemcen. Thèse de doctorat, biologie cellulaire, université Abo Bekr Belkaid, 226.

- Bankova Vassya**, 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*; 100. 114-117.
- Beaudeau J.L, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J**, 2006. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immunol. Biol. Spec* ; 21.144-150.
- Belzer F.O., Southard J.H**, 1988. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*; 45(4): 673-676.
- Bernard Monique, Chatenoud Lucienne, Compagnon Philippe et al.**, 2009. Transplantation d'organe-quelles voies de recherche ? ; *Les éditions Inserm*, Paris, 471.
- Bonvehi, J. S., Ventura, F., Escala Jorda, R**, 1994. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietics. *Joacs*; 71.15-36.
- Borcic, I., Radonic, A., Grzunov, K**, 1998. Comparaison of the volatile constituents of propolis gathered in different regions of Croatia. *Flavor and Fragrance Journal*; 11.311-31.
- Bouguerne Benaissa**, 2012. Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat, chimie-biologie-santé, université de Toulouse III-Paul Sabatier, 198.
- Bouhadjra Kahina**, 2011. Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Mémoire de magister, chimie, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 94.
- Boutabet K., Kebsa W., Alyane M., Lahouel M**, 2011. Polyphénolique fraction of algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian Journal of Nephrology*; 21. Issue 2, 101-106.
- Chaaya Rana Youssef**, 2010. Rôle du stress oxydant induit par les monoamine oxydases dans la Fibrose rénale : Etude in vivo dans un modèle d'ischémie reperfusion chez le rat. Thèse de doctorat, innovation pharmacologique, université Toulouse III - Paul Sabatier, 200.
- Chambers D.E, Parks D.A, Patterson G, ROY R, Mccord J.M, Yoshida S et al**, 1985. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol*; 17.145-152.

- Chappaz Laure**, 2010. Prévention des infections fongiques transmises par le greffon aux receveurs d'organes. These de doctorat, pharmacie, université de pharmacie Grenoble, 104.
- Clémence Hoyet**, 2005. Le miel : de la source a la therapeutique. Thèse de doctorat, pharmacie, université Henri Poincaré – Nancy 1.106.
- Cour M, Argaud L**, 2010. Ischémie-reperfusion et protection cellulaire *.Réanimation* ; 19 :158-190.
- Dal-Ros Stéphanie**, 2009. Dysfonction endothéliale et pathologies cardiovasculaires : rôle du stress oxydant et effets protecteurs des polyphénols végétaux. These de doctorat, pharmacologie, UMRS CNRS 7213-faculté de pharmacie, 343.
- Djaballi Saliha**, 2012. Effet des polyphénols sur le résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot sec. Mémoire de magistere, biotechnologie alimentaire, université de Mentouri Constantine, 81.
- Don W. Fawcett et Jensch Ronald-P**, 2002. Histologie l'essentiel; *édition MALOINE*, Paris, 474.
- Donatien Kone**, 2009. Enquête ethnobotanique de six plantes, identification d'alcaloïdes-caractérisations, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. These de doctorat, chimie organique, université de Paul Verlaine de Metz-up-M(France), 157.
- Ellman G-L**, 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82: 70-7.
- Eun-Hee Park.Sun-Hee Kim et Soo-Sum Park**, 1996. Anti-inflammatory activity of propolis. *Arch.Pharm.Res*; 19.337-341.
- Favier A**, 1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique* ; 55.1, 9-16.
- Favier,A**, 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* ; 269,108-115.
- Ferhoum Fatiha**, 2010. Analyse physicochimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille (*Apis mellifica intermissa et Apis mellifica sahariensis*) .These de magister, technologie alimentaire, université d'Hamed Bougara Boumerdes, 174.

- Ferradji Ayoub**, 2011. Activités antioxydantes et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Mémoire de magistère, biochimie appliquée, université de Ferhat Abbas-Setif, 56.
- Fornas Delphine**, 2001. Solution de préservation d'organe : descriptif, statut réglementaire et enregistrement en Europe. Thèse de doctorat, pharmacie, université Claude Bernard-Lyon, 115.
- Gharbi Mehdi**, 2011. Les produits de la ruche : origines-fonctions naturelles-composition propriétés thérapeutiques apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse de doctorat, médecine vétérinaire, université Claude-Bernard-Lyon I, 234.
- Garait Blandine**, 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse de doctorat, biologie cellulaire, université Joseph Fourier - Grenoble 1, 196.
- Garedew A, Schmolz E, Schricker B**, 2002. Action varroacide de la propolis : test de laboratoire. *Apidologie* ; 33. 41-50.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R**, 1990. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*; 71.25-48.
- Gueye Papa Madièye**, 2007. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat, biochimie, université Louis Pasteur- Strasbourg I, 252.
- Guohua Cao, Emin Sofic, Ronald L. Prior**, 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*; 22, 5, 749-760.
- Haliwell B**, 1999. How to characterize a biological antioxidant. *Free.Radic Res Commun*; 9. 1-32.
- Hegazi, A. G, Abd El Hady, F. K**, 2002. Egyptian Propolis: 3-Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. *Z Naturforsch*; 57.3-16.
- Hyardin Aude**, 2008. Etude de la fonctionnalité alimentaire et de la plats industriels. Thèse de doctorat, nutrition, université Nancy, 236.



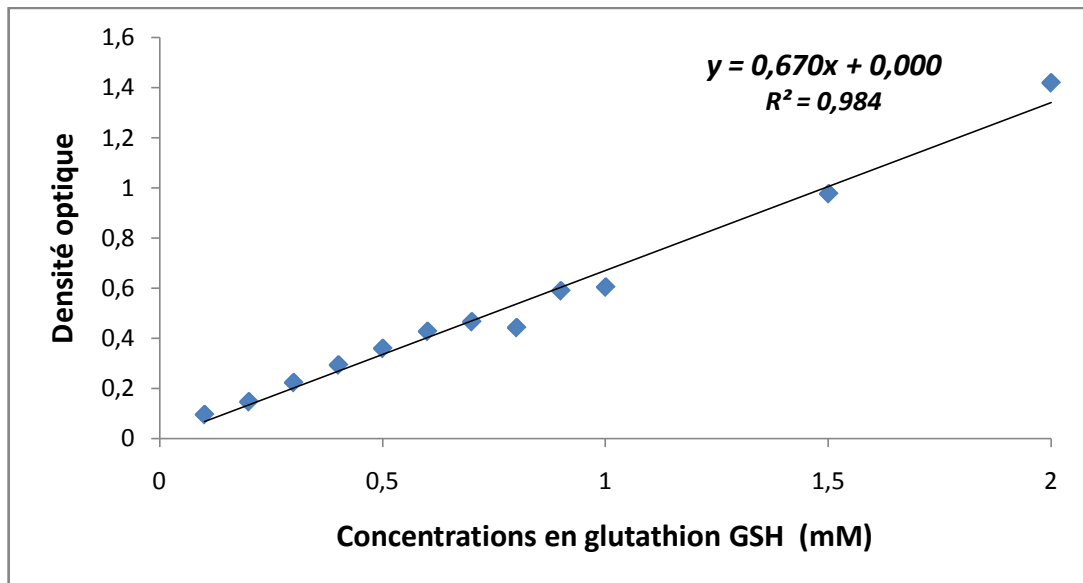
- Jarrahi, M., Safakhah, H. A., Vafaci, A,** 2004. Effect of propolis on wound healing in albino rats. *Iranian journal of pharmaceutical research*; 2:46-46.
- Josiane Cillard, Pierre Cillard,** 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*; 13. 9-24.
- Justine Pastre,** 2005. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat, chimie, université Toulouse, 116.
- Kabouche Samy,** 2010. Etude de la relation du thé vert : maladies cardiovasculaires et stress oxydant. Mémoire de magister, physiopathologie cellulaire, université Mentouri de Constantine, 96.
- Kadota, S,** 2002. Antiproliferative activity of Netherlands propolis and its principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*; 80. 67-73.
- Kebieche Mohamed,** 2009. Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L: effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de doctorat, biochimie, Université Mentouri Constantine, 124.
- Khodr Issa,** 2013. Effet protecteur du sulfure d'hydrogène de la protéine C active et de dexametasone dans la modulation hémodynamique et inflammatoire de l'ischémie-reperfusion. These de doctorat, sciences de la vie et de la santé, université de Lorraine Nancy, 167.
- Lamprecht I,** 2002. Micro calorimetric investigation of the action of propolis on *Varroa destructor* mites. *Thermochimica Acta*; 382:211-220.
- Lefèvre, M,** 1998. Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de biologie clinique* ; 56. 19-305.
- Lenzi F,** 2011. Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traîneau en course de sprint. Thèse de doctorat, biochimie, université Lyon, 170.
- Ligeret H, Brault A, Vallerand D, Haddada Y, Haddada P.S,** 2008. Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation–warm reperfusion liver injury. *Journal of Ethnopharmacology*; 115, 507–514.
- Liu R, Gao M, Yang ZH, Du GH,** 2008. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both in vivo and in vitro. *Brain Res*; 1216:104-115.

- Manallah Ahlem**, 2012. Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Memoire de magister, Biochimie Appliquée, Université Ferhat Abbas , 86.
- Masoumeh A., Brian** , 2009. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 46, 309-317.
- Meyer Grégory**, 2010. Pollution de type urbaine au Monoxyde de Carbone et sensibilité du myocarde au syndrome d'ischémie-reperfusion : rôle cardioprotecteur de l'exercice. These de doctorat, sciences du mouvement humain, universite d'avignon et des pays de vaucluse, 147.
- Meziti Asma**, 2009. Activité antioxydant des extraits des graines de *Nigella sativa* L étude in vitro et in vivo. Mémoire de magister, biochimie appliquée, université El-Hadj Lakhdar, Batna, 71.
- Miorin P.L., Levy Junior N.E. Custodio A.R. Bretz W.A. Marcucci M.C**, 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of applied microbiology*; 95. 913-920.
- Mongens Magali**, 2013. Origine et conséquences du stress oxydant. Thèse de doctorat, médecine vétérinaire, université d'Alfort, 121.
- Muanda Nsemi**, 2010. Identification de polyphénols evaluation de leur activité antioxydante et etude de leurs propriétés biologique. These de doctorat, chimie organique, univesité Paul Verlaine-Metz, 239.
- Nkhili Ez-zohra**, 2009. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat, Sciences des Aliments , université Cadi Ayyad, Semlalia-Marrakech, 378.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K**, 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by hiobarbituric reaction. *Anal Biochem*; 95:351-8.
- Raison J.K**, 1973. The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems. *Bioenergetics* ; 4: 285-309.
- Rezaire Aira**, 2012. Activité anti-oxydante et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). These de doctorat, phytochimie, université des Antilles et de la Guyane, 193.

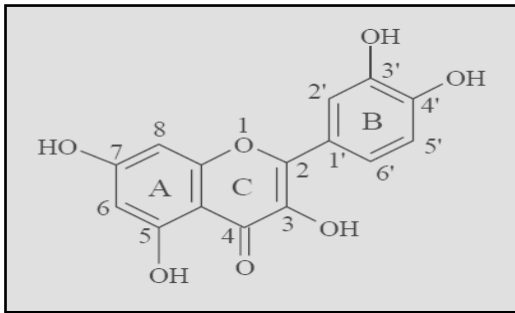
- Rhajaoui, M., Oumzil, H., Faid, M., Lyagoubi, M., Elyachioui, M**, 2001. Antibacterial activity of a Moroccan propolis extracts. *Sciences letters*; 3. 201-207.
- Sang-Won Park, Sun-Mee Lee**, 2008. Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid on hepatic dysfunction induced by cold ischemia/reperfusion. *European Journal of Pharmacology* ; 580, 401–406.
- Savard Sébastien**, 2005. Etude de la surexpression in vivo du monoxyde d'azote synthase endothéliale chez le rat urémique : effets sur la dysfonction endothéliale en insuffisance rénale. Thèse de doctorat, médecine expérimentale, université Laval, 159.
- Segueni Narimane**, 2011. Contribution à l'étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis. Thèse de doctorat, Chimie pharmaceutique, université Mentouri de Constantine, 321.
- Sibeli Silici, Semiramis Kutulka**, 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of ethnopharmacology* ; 99.69-73.
- Soncourt M.P**, 1984. Intérêt thérapeutique et diététique des produits de la ruche. Thèse de doctorat, pharmacie, université Henri Poincare – Nancy 1.187.
- Therond P**, 2006. Stress oxydant : dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Ann. Pharm. Fr*; 64.2-18.
- Van Antwerpen P et Nève J**, 2006. Contribution à l'étude du pouvoir Antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique:ciblage du système myéloperoxydase/peroxyde d'hydrogène/chlorure. Thèse de doctorat, sciences pharmaceutiques, Bruxelles. 178.
- Viña J., Estrela J.M., Guerri C. and Romero F. J**, 1980. Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J*; 188, 549–552.
- Vohora S.B, Sharma K, Shah S.A, Naqvi S.A, Dandiya P.C**, 1991. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products.*J.Ethnopharmacol*; 35:77-82.
- Yakhlaf Ghania**, 2010. Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L et *Laurus nobilis* L .Mémoire de magistère, biochimie appliquée, université de Elhadj Lakhdar-Batna, 69.

**-Zeghad Nadia**, 2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister, Biotechnologie végétale, Université Mentouri Constantine ,84.

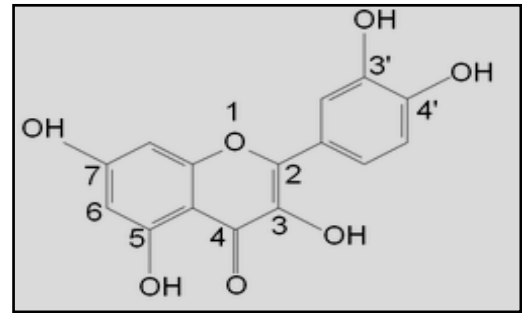
# *Annexes*

**Annexe 1 : Courbe d'étalonnage du glutathion réduit (GSH)**

**Annexe 2 : Structure des flavonoïdes Quercétine et Chryisine**



**Quercétine**



**Chryisine**

# *Résumés*



## ***Résumé***

L'intérêt porté pour la composition de la solution de préservation des greffons est grandissant. En effet, la présence des antioxydants dans sa formule, améliore la survie du tissu ischémié lors de sa reperfusion. Cet effet protecteur repose sur la prévention des cellules contre les conséquences délétères des radicaux libres produits lors de l'ischémie/reperfusion.

Dans ce contexte, cette étude vise à évaluer l'effet protecteur des flavonoïdes, antioxydants naturels, sur l'ischémie hypothermique au cours de la préservation à froid (+4°) du cœur. L'étude a été effectuée *in vitro* sur des cœurs de souris prélevés et conservés à froid dans des solutions de Krebs supplémentées ou non de flavonoïdes purs (quercétine et chryisine) ou bruts (extrait éthanolique de propolis).

L'évaluation du statut oxydatif au niveau du cœur conservé à froid a révélé que la supplémentation de la solution de Krebs par la propolis a provoqué une diminution du taux de malondialdéhyde cytosolique (MDA) de 44% et l'augmentation hautement significative de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH). Cependant la quercétine et la chryisine supplémentés ont augmenté le niveau du MDA dans la cellule cardiaque. La réduction hautement significative du taux du GSH n'a été remarquée que suite au traitement par la chryisine.

Par ailleurs, l'analyse histologique des cœurs ischémiés a été réalisée et a montré que le traitement par la propolis a préservé l'intégrité tissulaire et n'a pas changé l'aspect général du tissu cardiaque.

En conclusion, ce travail permet d'affirmer que les flavonoïdes et spécialement l'extrait de propolis possèdent une bonne propriété antioxydante durant l'ischémie froide, présentant ainsi un meilleur moyen d'améliorer la survie des greffons durant leur conservation avant qu'ils soient transplantés.

***Mots clés :*** Solution de préservation, ischémie cardiaque hypothermique, stress oxydatif, polyphénols, propolis.

## ***Abstract***

The interest for the composition of the transplant's preservation solution is growing. Indeed, the presence of antioxidants in its constitution improves ischemic tissue survival during its reperfusion. This protective effect is based on the prevention of cells against the deleterious effects of free radicals produced during ischemia / reperfusion.

In this context, this study aims to evaluate the protective effect of flavonoids, natural antioxidants, on hypothermic ischemia during cold preservation (+4°) of heart. The study was conducted *in vitro* on mouse hearts removed and stored in cold Krebs solution supplemented or not with pure flavonoids ( quercetin and chrysin ) or crude (ethanolic extract of propolis) .

The evaluation of the oxidative status in heart tissue showed that supplementation of the krebs solution with propolis caused a decrease in cytosolic malondialdehyde (MDA) (44%) and a highly significant increase of the cytosolic concentration of reduced glutathione (GSH). However supplemented quercetin and chrysin increased the level of MDA in the cardiac cell. However, highly significant reduction of GSH was noticed following the treatment with chrysin.

Furthermore, histological analysis of ischemic hearts was performed and showed that treatment with propolis preserved tissue integrity and did not change the general appearance of the heart tissue.

In conclusion, this work suggests that flavonoids, especially propolis extract have good antioxidant property during cold schémie, thus having a better way to improve transplant survival during conservation before its transplantation.

***Keywords:*** preservation solution, cardiac hypothermic ischemia, oxidative stress, polyphenols, propolis.

## الملخص

حاليا تزايد الاهتمام بمكونات محلول حفظ الأعضاء. في هذا السياق، يسمح وجود مضادات الأكسدة في مكونات هذا المحلول ببقاء النسيج المنقوص التروية حيا لمدة أطول عند إعادة ضخه. هذا التأثير الوقائي يستند على منع الخلية من الآثار الضارة للجذور الحرة التي تنتج أثناء نقص التروية /إعادة الضخ.

في هذا السياق تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثير الوقائي للفلافونويدات، مضادات أكسدة طبيعية على نقص تروية القلب خلال حفظه في درجة حرارة ( 4م°). وقد أجريت دراسة مخبرية على قلوب فئران منزوعة و محفوظة في محلول كريبس(4م°) مستكمل بالفلافونويدات النقية (كرستين أو كريسبين) أو الخامة (المستخلص الايثانولي للعكبر).

أظهر تقييم حالة الأكسدة على مستوى خلايا القلب المحفوظ أن مستخلص العكبر خفض معدل المالونديالدهيد(MDA) بنسبة 44% و زاد في تركيز الغلوتاثيون العصاري المرجع الخلوي .

بالمقابل العلاج بالكرستين والكر يسبين زاد من مستوى المالونديالدهيد في الخلية القلبية وقد لوحظ انخفاض كبير للغاية في معدل الغلوتاثيون بعد العلاج بالكر يسبين.

من جهة أخرى أظهرت الدراسة النسيجية للقلوب منقوصة التروية أن العلاج بمستخلص العكبر حافظ على النسيج القلبي ولم يغير من المظهر العام للخلايا القلبية.

في الختام يسمح هذا العمل بتأكيد أن الفلافونويدات و خصوصا مستخلص العكبر يملك خصائص جيدة مضادة للأكسدة

خلال نقص التروية (في درجة حرارة 4م°) وبالتالي تمثل أفضل وسيلة لتحسين بقاء القلب المنزوع حيا خلال خفضه قبل عملية الزرع.

**الكلمات المفتاحية:** محلول الحفظ، نقص تروية القلب منخفض الحرارة، الإجهاد ألتأكسدي، البوليفينولات، العكبر.