

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Effet des flavonoïdes sur les lysosomes de foie de rat

Decharneux, Thierry

*Award date:*  
1991

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## **Effet des flavonoïdes sur les lysosomes de foie de rat**

DECHARNEUX Thierry

### Résumé

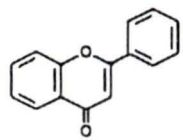
L'effet des flavonoïdes sur la stabilité des lysosomes a été étudié "in vitro". Des lysosomes de foie de rat sont soumis à deux types de traitements lésants: ils sont incubés soit en présence d'un système générateur de radicaux libres oxygénés, soit dans un milieu isoosmotique en glucose, une molécule perméante. L'activité libre de la N-acétylglucosaminidase et de la cathepsine C est mesurée pour vérifier l'intégrité de la membrane lysosomale. Les résultats montrent que dans les deux situations, certains flavonoïdes empêchent la rupture de la membrane lysosomale, d'autres sont sans effet.

Une relation structure-activité a été mise en évidence et d'éventuels mécanismes d'action ont été suggérés.

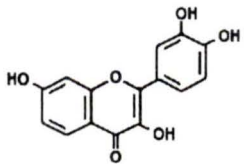
Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1991

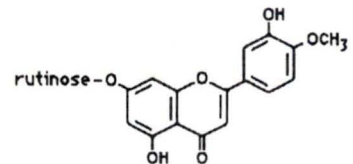
**Promoteur:** Professeur R. Wattiaux



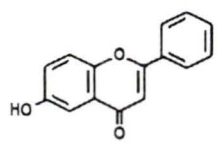
Flavone



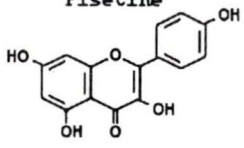
Fisétine



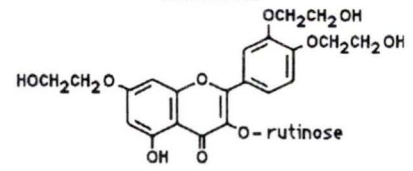
Diosmine



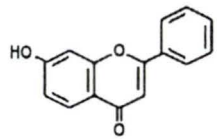
6-hydroxyflavone



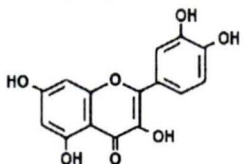
Kaempférol



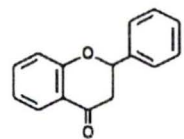
Troxérutine



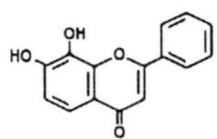
7-hydroxyflavone



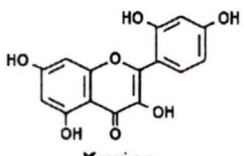
Quercétine



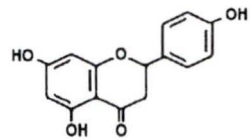
Flavanone



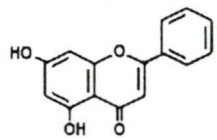
7,8-dihydroxyflavone



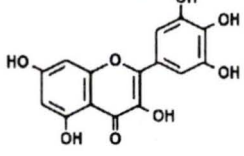
Morine



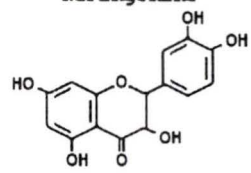
Naringénine



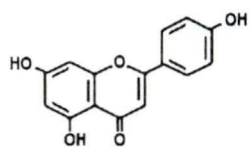
Chrysrine



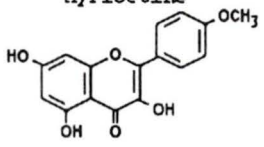
Myricétine



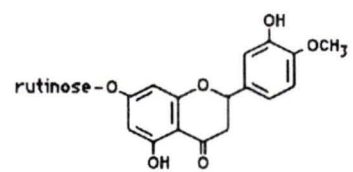
Taxifoline



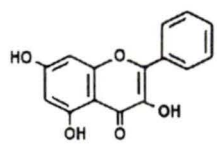
Apigénine



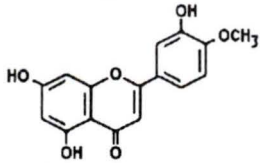
Kaempféride



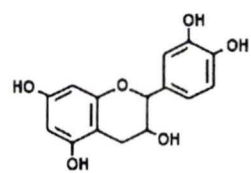
Hespéridine



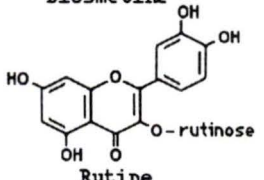
Galangine



Diosmétine



(d) Catéchine



Rutine

*Au terme de cette année académique, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur R. Wattiaux pour l'assurance avec laquelle il a su guider ce travail. Sa grande compétence et ses conseils judicieux en ont permis l'élaboration.*

*Mes remerciements s'adressent également au Professeur S. Wattiaux - De Coninck dont la vitalité débordante et la grande disponibilité sont des attraits non contestés de ce laboratoire.*

*Que les membres du laboratoire de chimie physiologique soient remerciés non seulement pour l'ambiance amicale qu'ils font régner au sein du département mais aussi pour leur coopération à la réalisation de ces recherches. Il m'est d'ailleurs difficile d'exprimer en quelques mots ma reconnaissance à I. Hamer pour les connaissances théoriques dont elle a pu me faire bénéficier.*

*J'exprime ma plus profonde reconnaissance à ma mère qui m'a permis par sa confiance d'arriver au terme de ce cycle universitaire.*

*Enfin, merci aussi à tous ceux que je n'ai pas cités et qui m'ont aidé de quelque manière que ce soit.*

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

<b>I.OBJECTIF</b> .....	1
<b>II.LES FLAVONOIDES ET DERIVES</b> .....	2
II.1.GENERALITES .....	2
II.2.STRUCTURE.....	3
<b>III.LES LYSOSOMES</b> .....	4
III.1.GENERALITES .....	4
III.2.LA MEMBRANE LYSOSOMALE.....	5
III.3.NOTION D'ACTIVITE LIBRE.....	5
<b>IV.LES RADICAUX LIBRES OXYGENES</b> .....	6
IV.1.GENERALITES .....	6
IV.2.TOXICITE DES RADICAUX LIBRES OXYGENES.....	6
<b>V.PERMEABILITE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE</b> .....	8
V.1.GENERALITES .....	8
V.2.MISE EN EVIDENCE DE LA PERMEABILITE.....	8

## MATERIEL ET METHODES

<b>I.FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE</b> .....	9
I.1.PREPARATION DE L'HOMOGENAT .....	9
I.2.CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE.....	9
<b>II.FLAVONOIDES ET DERIVES</b> .....	10
II.1.LES FLAVONOIDES .....	10
II.1.1.LA FLAVONE.....	10
II.1.2.LES DERIVES HYDROXYLES.....	10
II.1.3.LES SUBSTITUANTS "METHOXY".....	11
II.1.4.LES SUBSTITUANTS "RUTINOSIDE" .....	11
II.2.LES FLAVANOIDES .....	11
II.2.1.LA FLAVANONE .....	11
II.2.2.LES DERIVES HYDROXYLES .....	11
II.2.3.LE SUBSTITUANT "RUTINOSIDE" .....	11
II.3.LA PROANTHOCYANIDINE.....	11

<b>III.CONDITIONS EXPERIMENTALES</b> .....	12
III.0.PRELIMINAIRE .....	12
III.1.PRINCIPE EXPERIMENTAL .....	12
III.2.EMPLOI DE RADICAUX LIBRES.....	13
<u>III.2.1.PRODUCTION RADICALAIRE ENZYMATIQUE:</u>	
<u>X/XO Fe/ADP</u> .....	13
<u>III.2.2.PRODUCTION RADICALAIRE CHIMIQUE:</u>	
<u>ACIDE ASCORBIQUE/FeCl<sub>2</sub></u> .....	13
III.3.EMPLOI DE MOLECULE PERMEANTE: LE GLUCOSE.....	14
<b>IV.DOSAGES DE REFERENCE</b> .....	15
IV.1.DOSAGES ENZYMATIQUES .....	15
<u>IV.1.1.PRINCIPE THEORIQUE :</u>	
<u>ACTIVITE LIBRE-ACTIVITE TOTALE</u> .....	15
<u>IV.1.2.METHODES GENERALES</u> .....	15
IV.2.MESURE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE .....	15
<u>IV.2.1.PRINCIPE THEORIQUE</u> .....	15
<u>IV.2.2.METHODE GENERALE</u> .....	16
IV.3.DETAIL DU CALCUL DE L'ACTIVITE LIBRE.....	16
<u>IV.3.1.CAS DE L' ESTIMATION DE L' ETAT</u>	
<u>DES ORGANITES</u> .....	16
<u>IV.3.2.CAS DE L' ESTIMATION DE LA PEROXYDATION</u>	
<u>LIPIDIQUE</u> .....	16

<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>
---------------------------------

<b>I.INFLUENCE DES FLAVONOIDES SUR LA MEMBRANE</b>	
<b><u>LYSOSOMALE SOUMISE A L'ACTION DES RADICAUX LIBRES</u></b>	
<b><u>OXYGENES</u></b> .....	17
I.1.ESTIMATION DU POUVOIR LESANT.....	17
I.2.ETUDE DES FLAVONOIDES ET DERIVES .....	17
<u>I.2.0.PRELIMINAIRE</u> .....	18
<u>I.2.1.ANALYSE DES RESULTATS</u> .....	18
I.2.1.1.Recherche d'un effet potentiel .....	19
A.présentation des résultats.....	19
A.1.production radicalaire	
enzymatique (X/XO-Fe/ADP).....	19
A.2.production radicalaire chimique	
(Acide ascorbique/FeCl <sub>2</sub> ).....	24

B.constatations.....	28
I.2.1.2.Détermination du degré d'efficacité.....	28
A.présentation des résultats.....	28
B.constatations.....	31
<u>I.2.2.DISCUSSION</u> .....	31
I.2.2.1.Mécanisme(s) de protection.....	31
I.2.2.2.Relation structure-fonction.....	33
I.2.2.3.Récapitulatif.....	34
I.3.ETUDES COMPLEMENTAIRES.....	34
<u>I.3.0.PRELIMINAIRE</u> .....	35
<u>I.3.1.ANALYSE DES RESULTATS</u> .....	35
I.3.1.1.Comparaison des systèmes X/XO Fe/ADP et X/XO.....	35
A.présentation des résultats.....	35
A.1.comparaison après un temps fixé (24 min.).....	36
A.2. comparaison dans le temps.....	36
B.constatation.....	36
I.3.1.2.Relation perte de latence enzymatique-lipoperoxydation.....	37
A.présentation des résultats.....	37
B.constatation.....	39
<u>I.3.2.DISCUSSION</u> .....	39
I.3.2.1.Comparaison des systèmes X/XO Fe/ADP et X/XO.....	39
I.3.2.2.Relation perte de latence enzymatique - lipoperoxydation.....	40

<b><u>II.INFLUENCE DES FLAVONOIDES SUR LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE AU GLUCOSE</u></b> .....	41
II.1.ESTIMATION DU POUVOIR LESANT.....	41
II.2.ETUDE DES FLAVONOIDES ET DERIVES.....	41
<u>II.2.0.PRELIMINAIRE</u> .....	42
<u>II.2.1.ANALYSE DES RESULTATS</u> .....	42
II.2.1.1.Recherche d'un effet potentiel.....	43
A.présentation des résultats.....	43
B.constatations.....	47
II.2.1.2.Détermination du degré d'efficacité.....	47
A.présentation des résultats.....	47
B.constatation.....	48

<u>II.2.2. DISCUSSION</u> .....	48
II.2.2.1. Mécanisme(s) de protection.....	48
II.2.2.2. Relation structure-fonction.....	49
II.2.3.2. Récapitulatif.....	49

CONCLUSIONS
-------------

BIBLIOGRAPHIE
---------------

# INTRODUCTION

## I. OBJECTIF

Ces études s'inscrivent dans le cadre de travaux visant à étudier la contribution des flavonoïdes dans les traitements médicaux.

Comme nous le verrons ultérieurement, ces substances sont présentes dans des extraits de végétaux possédant des effets thérapeutiques. Le but de ce travail est de montrer que les flavonoïdes pourraient être "les agents actifs" de ces extraits.

Des études précédentes ont montré que l'extrait de *Ginkgo biloba* protège les lysosomes des radicaux libres et du choc osmotique produit par la pénétration du glucose. Dans le travail que nous présentons, nous avons recherché si des flavonoïdes purs étaient capables de protéger les lysosomes soumis à ces mêmes stress.

Nos études préliminaires montrant l'existence de dérivés actifs et de dérivés inactifs, nous avons tenté de mettre en évidence une relation structure-activité et de déceler le(s) mécanisme(s) d'action éventuel(s).

## II. LES FLAVONOÏDES ET DERIVES

### II.1. GENERALITES

Le règne végétal a toujours été une source majeure de substances utilisées pour leurs vertus médicinales, gustatives, odorantes, colorantes ... Ce sont, pour la plupart, des métabolites secondaires sans fonction clairement définie ou sans rôle dans les processus métaboliques primaires de la cellule végétale. Les flavonoïdes et leurs dérivés, substances sur lesquelles portent nos études, font partie de cette catégorie de composés.

Ils se retrouvent dans la plante aussi bien au niveau de la racine, que de la feuille, de l'écorce, du fruit, de la graine ou encore du pollen.

Leurs caractéristiques de distribution au sein du règne végétal peuvent se résumer comme suit:

- présence d'une manière générale chez la plante vasculaire
- présence variable d'une espèce à l'autre
- présence variable au sein de l'espèce
- caractéristique de certains tissus plutôt que d'autres
- présence variable au niveau cellulaire
- variabilité quantitative.

Les flavonoïdes montrent une multiplicité de fonctions dans la physiologie végétale, ils jouent notamment d'importants rôles dans la défense de l'organisme contre les infections et les blessures.

L'animal ne peut synthétiser ces composés benzoïques à partir de simples précurseurs aliphatiques, tous les flavonoïdes retrouvés chez ce dernier ont une origine végétale. La consommation journalière de ces composés naturels est d'ailleurs estimée pour l'homme à 1 g.

Les flavonoïdes et leurs dérivés sont doués de toute une série d'effets biologiques : inhibition de la croissance de cellules en culture (Bracke *et al.*, 1990), de la glycolyse (Suolinna *et al.*, 1975), de la synthèse de macromolécules (Hosokawa *et al.*, 1990), de l'ATPase (Kuriki and Racker, 1976)... De telles activités biologiques peuvent provenir d'une désorganisation majeure d'importants processus physiologiques.

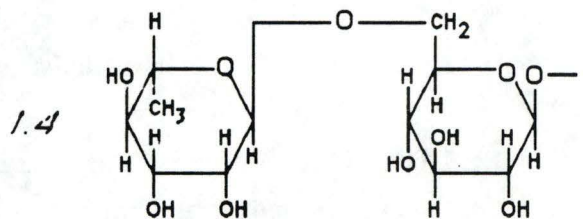
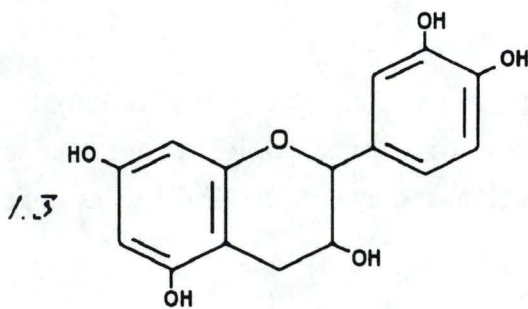
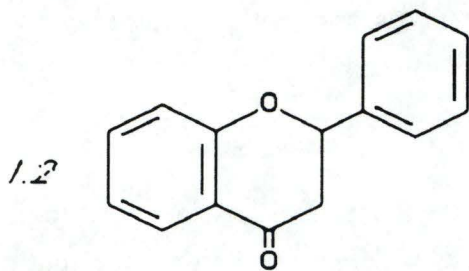
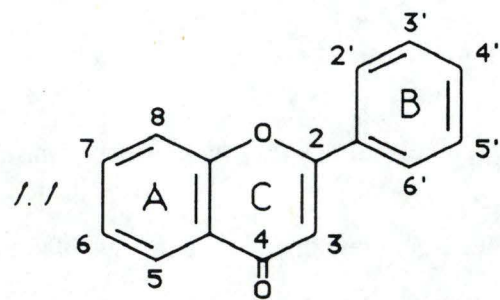


FIG 1. Flavonoïde, structures dérivées et groupe de substitution.

1.1 flavone

1.2 flavanone

1.3 (d) catéchine

1.4 rutinose

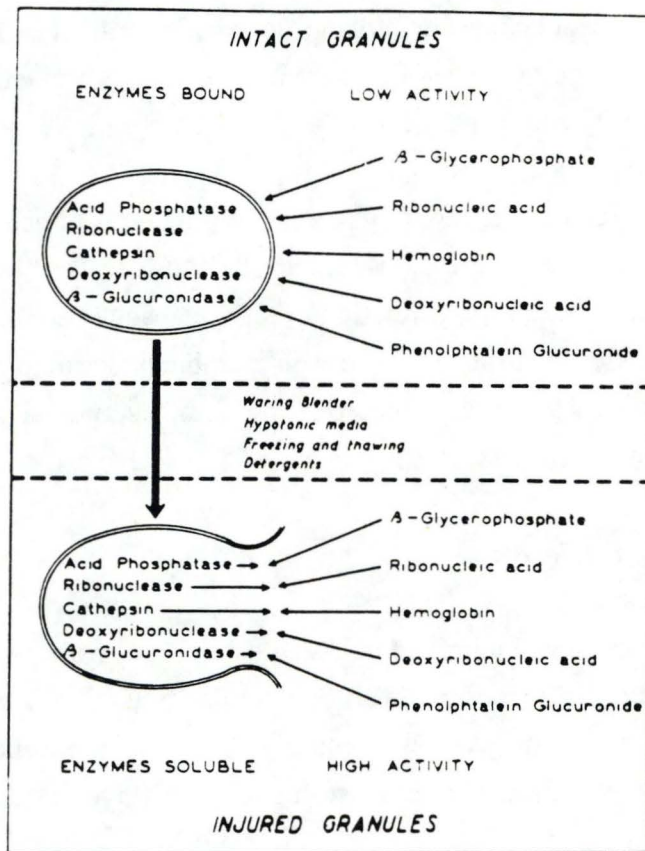
Ils sont présents en quantité significative dans des extraits végétaux et pourraient être responsables d'effets thérapeutiques que l'on attribue à ceux-ci. Ces substances constituent non seulement l'un des ingrédients de produits utilisés en médecine douce un peu partout dans le monde mais elles sont également utilisées en médecine traditionnelle; un exemple typique est celui de l'extrait de *Ginkgo biloba* utilisé dans le traitement de la maladie veineuse.

Des travaux récents ont montré que cet extrait était capable de protéger les lysosomes soumis à certaines agressions "in vitro" (Wattiaux-De Coninck *et al.*, 1990). Ce phénomène pourrait être mis en relation avec les capacités curatives de l'extrait de Ginkgo dont les activités pharmacologiques sont nombreuses : inhibition de l'agrégation plaquettaire (Clostre, 1986), augmentation de la résistance des membranes des érythrocytes (Etienne *et al.*, 1982)...

## **II.2. STRUCTURE** (*fig 1*)

Les flavonoïdes comprennent un grand nombre de composés naturels d'origine végétale dérivés de la flavone. Ils constituent d'ailleurs un des plus grands groupes de dérivés phénols: on en a identifié jusqu'à présent plus de 4000. Il a été estimé qu'à peu près 2% du carbone produit par photosynthèse est converti en flavonoïdes ou en composés proches comme le tanin.

Les substances diffèrent les unes des autres par la présence d'un nombre plus ou moins grand de substituants -OH, -OCH<sub>3</sub> ... Certaines existent sous forme de glycosides, en particulier, de rutinose. Les variantes structurales de la flavone utilisées dans ce travail sont la flavanone et la (d) catéchine.



*FIG 2* Modèle biochimique représentant le lysosome de foie de rat. Les hydrolases figurant sur ce schéma sont celles qui ont été étudiées par de Duve au cours de premiers travaux (d'après de Duve et al., 1955).

## III. LES LYSOSOMES

### III.1. GENERALITES

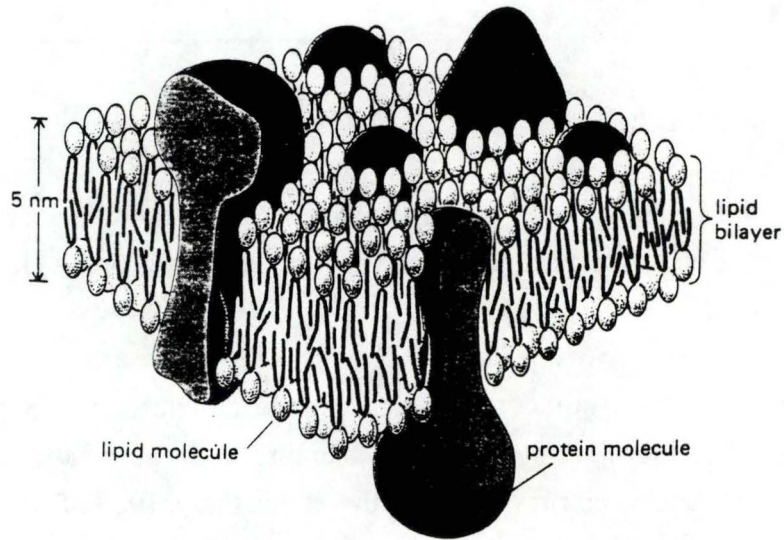
La découverte des lysosomes en 1951 par de Duve et ses collaborateurs résulte d'études biochimiques basées sur le phénomène de latence enzymatique (de Duve *et al.*, 1955) (fig 2).

Le lysosome se définit comme une vésicule comportant une grande variété d'enzymes hydrolytiques, limitée par une membrane de perméabilité telle qu'elle emprisonne littéralement ces enzymes (de Duve et Wattiaux, 1966). Plus de 50 enzymes lysosomales sont actuellement répertoriées. Il s'agit de protéases, de lipases, de nucléases, de glycosidases...qui, bien qu'agissant sur de nombreuses liaisons chimiques et substances différentes, possèdent une caractéristique commune : elles ont une activité optimale en milieu acide.

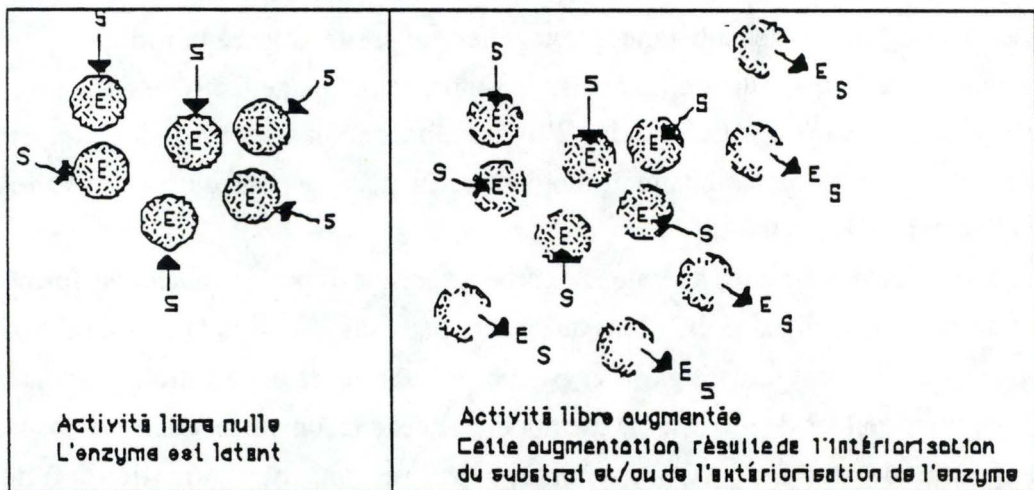
Diversité et polymorphisme sont les traits morphologiques caractéristiques de ces organites mais dès que l'on considère la fonction biochimique, le lien de parenté unissant ces structures devient évident : elles sont impliquées dans la digestion intracellulaire.

L'approvisionnement en matériaux peut se réaliser selon 2 voies se distinguant principalement l'une de l'autre par l'origine du matériel à dégrader : **l'hétérophagie** qui permet l'intégration de substances exogènes, possède une remarquable diversité fonctionnelle telle que nutrition, défense immunitaire, remodelage, activité de synthèse, ... **l'autophagie**, quant à elle, entraîne l'intégration de substances endogènes et bien qu'elle reste une réponse cellulaire primordiale au manque de nourriture, elle assure aussi rajeunissement et adaptabilité .

Alors que les acides aminés, hydrates de carbones, et autres petites molécules formées au cours du processus digestif diffusent ou sont transportés à travers la membrane vers le cytoplasme où ils sont utilisés par les systèmes métaboliques de la cellule, les matériaux indigestes, incapables de traverser la membrane de cette façon, restent dans les lysosomes sous forme de résidus . Ce phénomène est responsable, lors de déficiences enzymatiques, de nombreuses situations pathologiques graves suite à l'accumulation des produits de dégradation.



*FIG 3 Structure tridimensionnelle d'une membrane biologique (Alberts et al., 1989).*



*FIG 4 Notion d'activité libre. Alors que la présence d'une membrane intacte empêche le contact enzyme-substrat, une détérioration de celle-ci permet ce contact. L'activité libre de l'enzyme augmente.*

### **III.2. LA MEMBRANE LYSOSOMALE**

La membrane lysosomale, structure sur laquelle repose nos études, ne diffère pas fondamentalement des autres membranes biologiques (*fig 3*) ; elle est constituée d'une bicouche lipidique au sein de laquelle s'insèrent diverses protéines.

La composition lipidique n'est pas des plus remarquables puisque l'on y retrouve des phospholipides (sphingomyéline, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, phosphatidyléthanolamine), des glycolipides en quantité modérée, plus précisément des glycosphingolipides et du cholestérol.

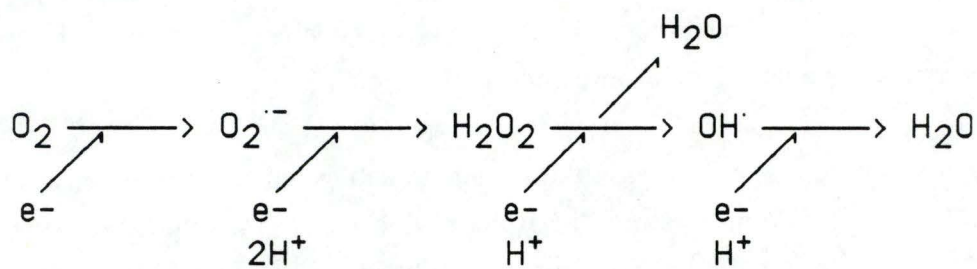
Les protéines, en général fortement glycosylées (Schneider *et al.*, 1978), sont pour la plupart des protéines intégrales dont la partie oligosaccharidique tapisse l'intérieur de l'organite, ceci est décelable en microscopie électronique sous forme d'un halo clair caractéristique formant un "coat" séparant membrane et contenu lysosomal (Daems *et al.*, 1969). L'abondance en acide sialique au niveau de la portion terminale de la chaîne oligosaccharidique assure au lysosome une charge de surface négative. Cette richesse en hydrates de carbone se justifierait par un hypothétique rôle de protection des liaisons chimiques de la membrane contre les hydrolases auxquelles elles sont sensibles.

Les protéines de cette membrane sont également impliquées dans le maintien du pH intralysosomal, dans le transfert de métabolites ou encore dans l'acquisition de caractères spécifiques de reconnaissance du compartiment lysosomal.

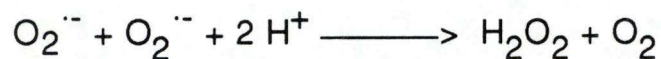
### **III.3. NOTION D'ACTIVITE LIBRE**

La proportion de lysosomes endommagés au sein d'une fraction s'estime par l'activité libre de cette fraction (*fig 4*). Cette notion d'activité libre s'explique par le phénomène de latence enzymatique : alors que la présence d'une membrane imperméable empêche le contact enzyme-substrat, la rupture de celle-ci se visualise via le démasquage de l'activité des enzymes lysosomiaux.

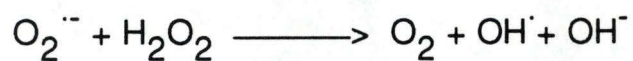
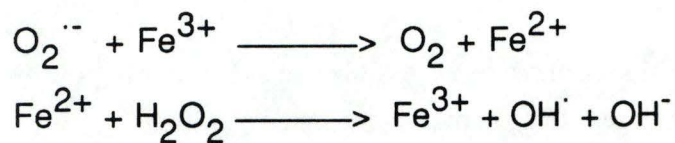
L'activité libre estime la proportion d'enzymes accessibles au substrat, elle fournit ainsi de précieux renseignements sur l'intégrité de la membrane de l'organite.



*FIG 5 Réduction monovalente de l'O<sub>2</sub> entraînant la formation de dérivés toxiques (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle).*



*FIG 6 Dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.*



*FIG 7 Réaction de Fenton catalysée par le fer engendrant des radicaux hydroxyles.*

## IV. LES RADICAUX LIBRES OXYGENES

### IV.1. GENERALITES

Un radical libre consiste, par définition, en une espèce chimique capable de mener une existence indépendante, contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) et étant dès lors très réactionnelle (Halliwell and Gutteridge, 1985).

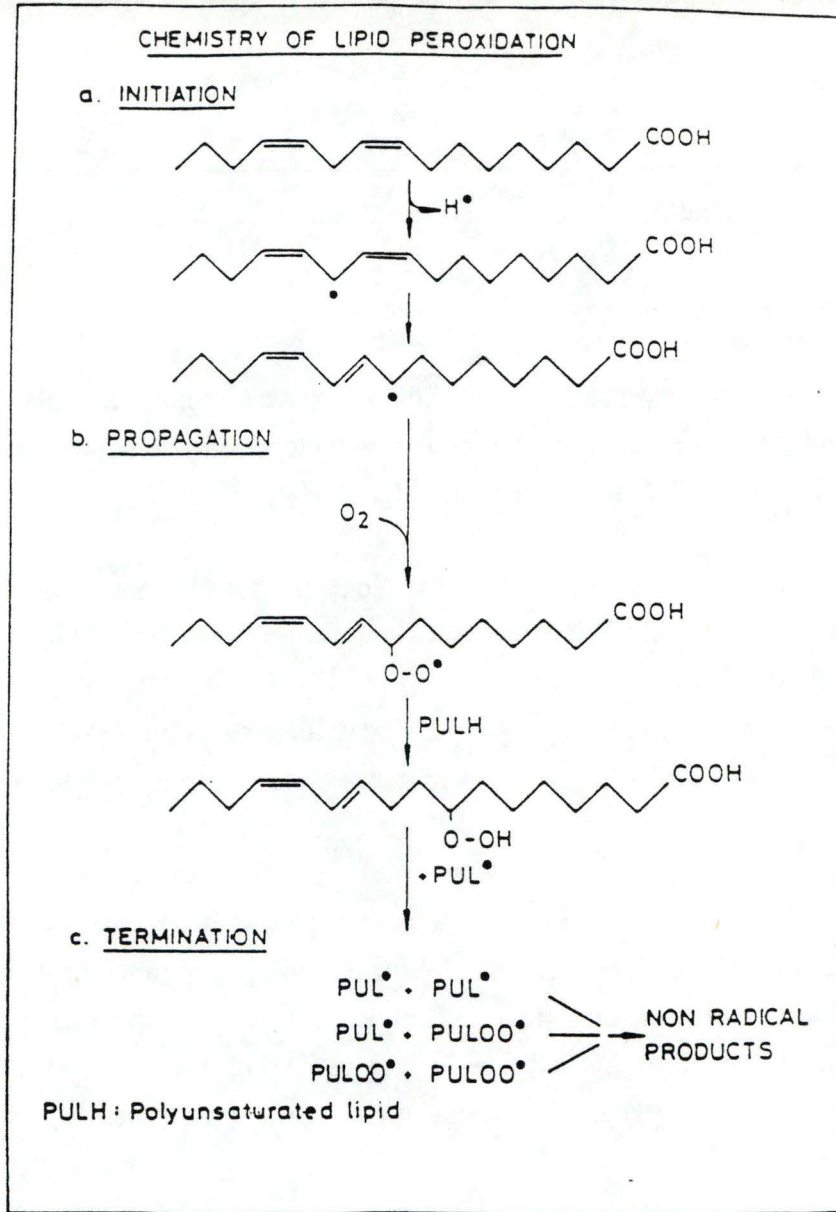
Les dérivés toxiques de l'oxygène sont produits à partir de la réduction monovalente de l' $O_2$  (*fig 5*). Ces molécules sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ). Ils sont impliqués dans un grand nombre de situations pathologiques, les maladies cardiovasculaires, la réaction inflammatoire ou les maladies de dégénérescence comme le cancer en sont les exemples typiques.

Ces radicaux libres (par extension de sens, le peroxyde d'hydrogène sera considéré comme une entité radicalaire) peuvent être formés en de nombreux sites subcellulaires. Ceux-ci comportent mitochondries (ubiquinone et flavoprotéines), réticulum endoplasmique (cytochrome P-450), peroxysomes (D-amino acide oxydase), membrane plasmique (NADPH oxydase) ainsi que cytoplasme (xanthine oxydase, aldéhyde oxydase) (Fisher, 1988).

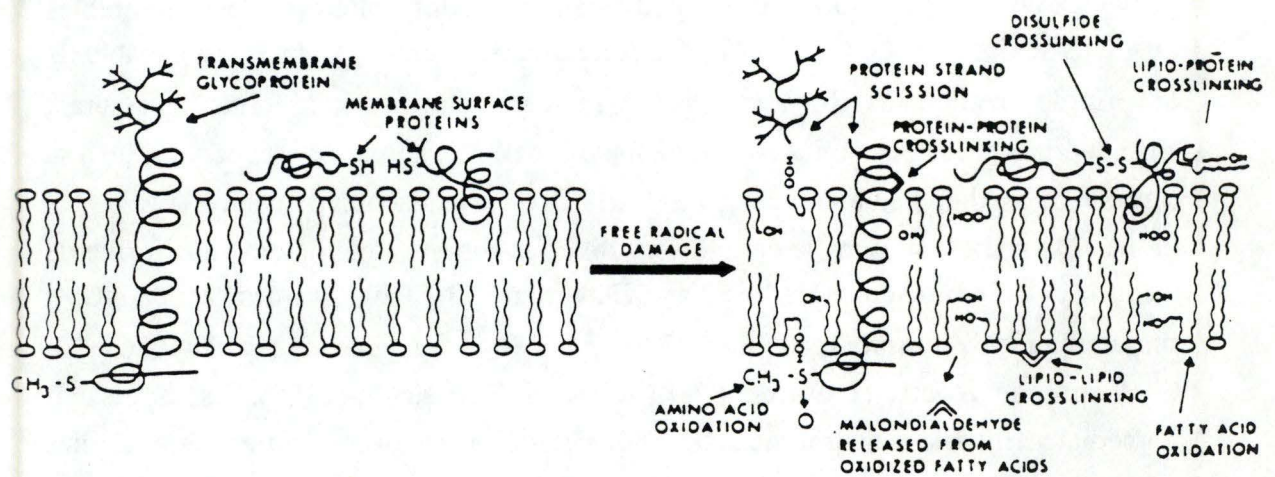
### IV.2. TOXICITE DES RADICAUX LIBRES OXYGENES

Les  $O_2^{\cdot-}$ , quoique peu réactionnels excepté dans les environnements hydrophobes, peuvent agir sur une molécule non radicalaire, ils sont toutefois plus redoutables lorsqu'ils se dismutent en  $H_2O_2$  (*fig 6*). Contrairement aux  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  est capable de traverser les membranes (Rubanyi, 1988) et d'agir bien loin du site de formation assurant ainsi la propagation des radicaux libres à toute la cellule, sa toxicité est accrue suite à sa capacité de produire, en présence de  $Fe^{2+}$ , des  $OH^{\cdot}$  via la réaction de Fenton (*fig 7*).

Le  $Fe^{3+}$  est présent dans la cellule sous diverses formes, notamment sous forme de ferritine dans le lysosome (Halliwell and Gutteridge, 1986), dans ce cas l'action d' $O_2^{\cdot-}$  sur la protéine de transport peut libérer le fer qui y est inclus (Biernacki *et al.*, 1986). Les  $OH^{\cdot}$  sont de réactivité élevée (Halliwell and Gutteridge, 1984), ils réagissent immédiatement à leur endroit de production cellulaire avec toutes sortes de molécules organiques (Pryor, 1976).



*FIG. 8 Réaction de peroxydation lipidique comprenant les étapes d'initiation, de propagation et de terminaison.*



*FIG. 9 Conséquences des attaques radicalaires sur les divers constituants des membranes biologiques (Freeman and Crapo, 1982).*

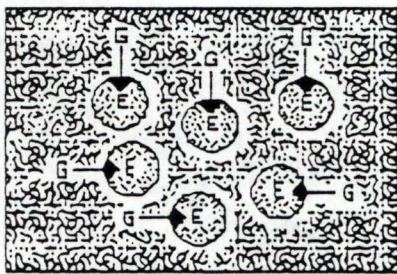
Dans des conditions normales d'oxygénation, les différents dérivés actifs de l'O<sub>2</sub> formés intracellulairement sont neutralisés par les mécanismes de protection cellulaire. Alors que les moyens de protection primaire empêchent la propagation des radicaux libres via des systèmes enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) ou via l'action de molécules de faible poids moléculaire (PM) ( $\alpha$ -tocophérol, acide ascorbique), les moyens de protection secondaire réparent les dégâts causés qu'il s'agisse de protéases, de lipases, d'endonucléases ou encore de polymérases.

Les atteintes au bon déroulement du processus biologique ne s'observeront qu'en cas de déséquilibre entre la génération de radicaux libres et les mécanismes de protection et, dans ce cas, tenter de cerner l'ensemble des réactions d'attaques radicalaires est, en raison de la diversité des entités radicalaires produites et de la multitude des molécules biologiques potentiellement atteintes, une opération difficile (Freeman and Crapo, 1982). Nos études portant sur la protection éventuelle qu'exerceraient les flavonoïdes et leurs dérivés sur la membrane lysosomale, nous nous contenterons de signaler que de par leur composition, les membranes biologiques, riches en acides gras polyinsaturés et en protéines, constituent une cible de choix pour les radicaux libres oxygénés.

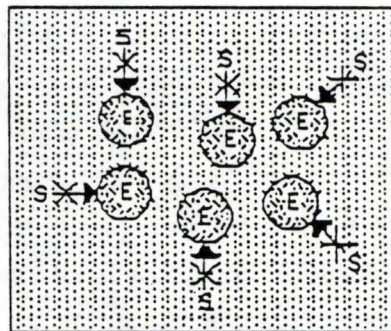
En effet, une cascade de réactions oxydatives en chaîne, connue sous le nom de peroxydation lipidique, conduit à la désorganisation de la membrane (*fig 9*). Cette réaction se déroulant en 3 étapes comprend l'initiation où un radical OH<sup>·</sup> arrache un H<sup>·</sup> à un acide gras insaturé et provoque son réarrangement en diène conjugué, la propagation, processus autocatalytique (Freeman and Crapo, 1982), aboutissant à la formation de radicaux peroxydes, capables à leur tour d'arracher un H<sup>·</sup> à un acide gras voisin, suite à l'action de l'oxygène moléculaire sur le radical organique formé, et la terminaison, étape finale de la réaction, assurée par les systèmes primaires de défense cellulaire ou encore par la réaction de 2 radicaux quelconques entre eux (*fig 8*).

Outre les acides gras polyinsaturés, les protéines membranaires peuvent également subir de profondes modifications suite à l'attaque radicalaire (*fig 9*).

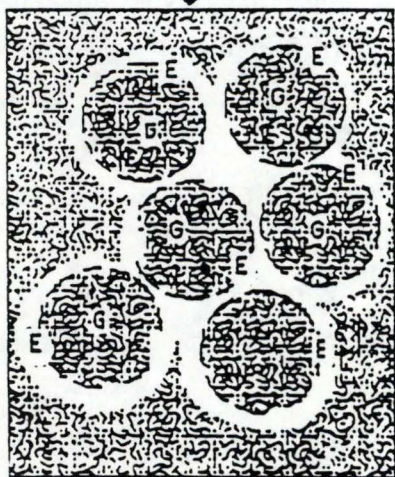
L'importance de ces modifications dépend de la composition en acides aminés de la protéine (les acides aminés comportant des résidus insaturés et des groupements SH sont sensibles aux radicaux libres), du rôle des acides aminés dans la conformation et l'activité de la protéine, de la possibilité de réparation des protéines endommagées mais aussi de l'intensité de l'attaque radicalaire (Freeman and Crapo, 1982).



L'hypertonicité due au glucose perméant provoque le gonflement des lysosomes et la rupture de leur membrane



La membrane lysosomale est imperméable au saccharose, qui se comporte comme protecteur osmotique



*FIG 10* Détection de la perméabilité ou de l'imperméabilité d'un soluté par perte ou conservation de latence enzymatique.

## V. PERMEABILITE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE

### V.1. GENERALITES

Un grand nombre de molécules de faible PM formées suite à la digestion intralysosomale gagnent le cytoplasme de la cellule, elles doivent pour cela traverser la membrane de ces organites. Les monosaccharides neutres issus de polysaccharides dégradés dont le glucose, soluté employé dans nos expériences, font partie de ces molécules (Cohn and Ehrenreich, 1969 cité par Reijngoud and Tager, 1977, Loyd, 1969 cité par Reijngoud and Tager, 1977).

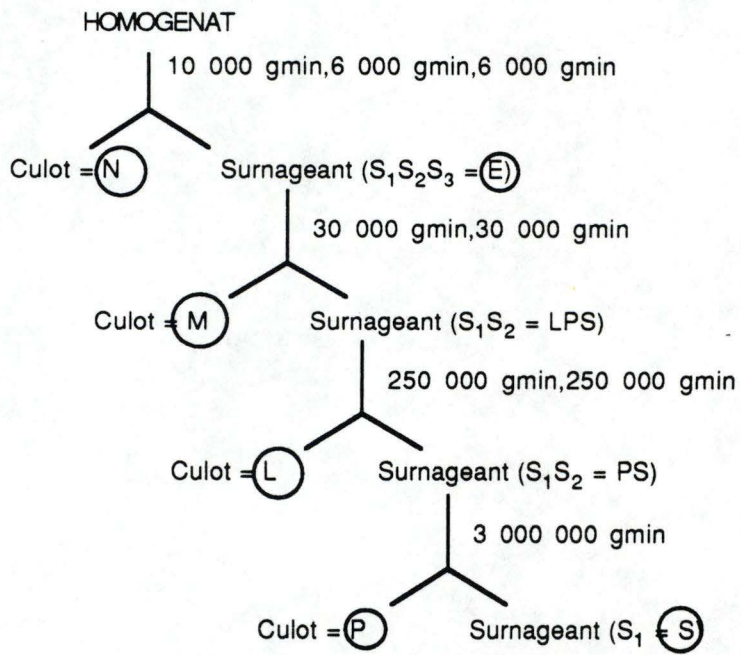
Il est admis que le glucose est une molécule perméante, par contre, il existe toujours une importante controverse en ce qui concerne son mécanisme de passage : de nombreux arguments tendent à montrer que ce transfert s'effectue par diffusion facilitée (Docherty *et al.*, 1979, Maguire *et al.*, 1988, Jadot *et al.*, 1989) mais cette hypothèse est loin de faire l'unanimité. Le mécanisme de diffusion simple est également proposé (Bird *et al.*, 1987). D'autres conclusions concilient les 2 hypothèses en proposant que l'entrée du glucose s'opèrerait selon une composante de diffusion facilitée et une composante de diffusion simple (Hales *et al.*, 1984, Forster and Lloyd, 1988). La spécificité du transporteur, du moins si ce dernier existe, est aussi source de discussions, le glucose et le ribose partagent le même transporteur selon certains, d'autres pensent qu'il existe des transporteurs différents.

### V.2. MISE EN EVIDENCE DE LA PERMEABILITE

La perte de latence enzymatique est une méthode indirecte de choix pour détecter la perméabilité de la membrane lysosomale envers une substance donnée (*fig 10*).

L'incubation d'une préparation lysosomale s'effectue dans une solution isotonique en substance à tester. La tonicité de la molécule non perméante permet de contrebalancer la tonicité du contenu lysosomal. Les organites restent intacts : aucune diminution de la latence enzymatique n'est décelée. La molécule perméante, par contre, va, en traversant la membrane, amener un supplément d'équivalents osmotiques à l'intérieur des lysosomes. Le déséquilibre osmotique en résultant crée un appel d'eau vers les organites, ceux-ci gonflent de plus en plus et finissent par éclater : une perte de la latence enzymatique est dès lors observée. La vitesse de cette perte de latence, quant à elle, fournit des indications sur la vitesse de pénétration du soluté.

# MATERIEL ET METHODES



*FIG. 11* Schéma de fractionnement subcellulaire du foie en centrifugation différentielle d'après de Duve et. al. (1955).

# I. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE

## I.1. PREPARATION DE L'HOMOGENAT

Le rat mâle Wistar de 200 à 300 g constitue le matériel biologique employé dans nos études, celui-ci est mis à jeun la veille de l'expérience.

Après le sacrifice de l'animal, le foie est prélevé, découpé en morceaux et broyé à l'aide d'un homogénéiseur coaxial de Potter.

Le milieu d'homogénéisation est le saccharose 0,25 M isotonique glacé. L'homogénat résultant contient tous les constituants subcellulaires de l'ensemble des cellules du foie.

## I.2. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE

Le milieu de centrifugation est le saccharose 0,25 M isotonique glacé.

Cette technique permet de séparer les différents organites principalement d'après la taille.

L'homogénat obtenu est soumis successivement à des champs centrifuges croissants dont le schéma de fractionnement, décrit par de Duve *et al.* (1955), est représenté ci-contre (*fig 11*). Celui-ci permet l'obtention de 5 fractions qui, bien qu'hétérogènes, sont fortement enrichies en organites spécifiques.

**La fraction N** contient essentiellement des noyaux, des débris cellulaires, des cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation et une quantité non négligeable de vésicules dérivées de la membrane plasmique.

**La fraction M**, appelée fraction mitochondriale lourde, est enrichie en mitochondries mais elle contient également une certaine quantité de lysosomes et de peroxysomes.

**La fraction L**, appelée fraction mitochondriale légère, est plus particulièrement riche en lysosomes et peroxysomes.

**La fraction P**, appelée fraction microsomiale, renferme essentiellement des fragments du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi.

**La fraction S:** ou fraction "soluble", contient tous les éléments non sédimentés lors des étapes précédentes.

Nos études portant sur les lysosomes, la totalité de nos expériences fut réalisée sur des fractions L.

## **II. FLAVONOIDES ET DERIVES**

Les produits testés dans nos études sont énumérés ci-dessous. Etant conservés sous forme de poudre, ils sont dissous dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO) où ils constituent alors une solution stock. Une série d'expériences a également été réalisée avec des dilutions fraîches du jour et ce, pour tester une éventuelle dégradation de la solution stock.

L'efficacité du flavonoïde se teste par ajout de celui-ci dans un milieu contenant des lysosomes et un réactif toxique (radicaux libres ou molécules perméantes). Les concentrations en flavonoïde auxquelles nous avons travaillé sont comprises entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  molaire (M)

### **II.1. LES FLAVONOIDES**

#### **II.1.1. LA FLAVONE**

#### **II.1.2. LES DERIVES HYDROXYLES**

##### **II.1.2.1. LES MONOHYDROXYLES**

- \* 6-monohydroxyflavone
- \* 7-monohydroxyflavone

##### **II.1.2.2. LES DIHYDROXYLES**

- \* 7,8-dihydroxyflavone
- \* 5,7-dihydroxyflavone ou Chrysin

##### **II.1.2.3. LES TRIHYDROXYLES**

- \* 5,7,4'-trihydroxyflavone ou Apigénine
- \* 3,5,7-trihydroxyflavone ou Galangine

##### **II.1.2.4. LES TETRAHYDROXYLES**

- \* 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavone ou Fisétine
- \* 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone ou Kaempférol

##### **II.1.2.5. LES PENTAHYDROXYLES**

- \* 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou Quercétine
- \* 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone ou Morine

##### **II.1.2.6. LES HEXAHYDROXYLES**

- \* 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone ou Myricétine

### II.1.3. LES SUBSTITUANTS "METHOXY"

- \* 3,5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Kaempféride
- \* 5,7,3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Diosmétine

### II.1.4. LES SUBSTITUANTS "RUTINOSIDE"

- \* 3-rutinoside de quercétine ou Rutine
- \* 7-rutinoside de diosmétine ou Diosmine
- \* 5-hydroxy-7,3',4'-éthoxyflavone-3-rutinoside ou Troxérutine

## **II.2. LES FLAVANOIDES**

### II.2.1. LA FLAVANONE

### II.2.2. LES DERIVES HYDROXYLES

#### II.2.2.1. LE TRIHYDROXYLE

- \* 5,7,4'-trihydroxyflavanone ou Naringénine

#### II.2.2.2. LE PENTAHYDROXYLE

- \* 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavanone ou Taxifoline

### II.2.3. LE SUBSTITUANT "RUTINOSIDE"

- \* 5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone-7-rutinoside ou Hespéridine

## **II.3. LA PROANTHOCYANIDINE**

- \* 3,5,7,3',4'-flavanpentol ou (d) Catéchine

	Flavonoïde ou dérivé	Système lésant (radicaux libres ou glucose)
test	+	+
contrôle	o	+
témoin	o	o

*Tableau 1. Caractéristiques des conditions expérimentales employées. (+ présence o absence)*

### III. CONDITIONS EXPERIMENTALES

#### III.0. PRELIMINAIRE

Les termes "**test, témoin et contrôle**" employés ci-dessous se définissent comme suit:

- **test**: condition expérimentale permettant de mettre en évidence l'influence d'une substance. L'activité libre estimée sera faible ou élevée selon que la substance étudiée sera efficace ou non.

- **témoin**: condition expérimentale permettant de vérifier que le système lésant étudié est seul responsable de la rupture de la membrane lysosomale. L'activité libre mesurée est faible.

- **contrôle**: condition expérimentale indiquant la "toxicité" du système lésant. L'activité libre calculée est élevée.

Les conditions expérimentales correspondant à ces définitions sont résumées dans le *tableau 1*.

#### III.1. PRINCIPE EXPERIMENTAL

Des lysosomes (fraction L) sont incubés pendant des temps déterminés, soit en présence d'un système générateur de radicaux libres, soit dans un milieu isoosmotique en glucose (molécule perméante). Ces conditions expérimentales sont lésantes pour les lysosomes.

Outre le système lésant, les tests renferment le flavonoïde, préalablement dissous dans du DMSO. Les contrôles et témoins sont réalisés par ajout de DMSO de même concentration.

L'état des organites est estimé en mesurant l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase ou de la cathepsine C. Cette activité est exprimée en % de l'activité totale de l'enzyme obtenue par lyse des lysosomes sous l'effet d'un détergent (Triton X-100). Le "% corrigé" signifie que l'on a tenu compte des valeurs de l'activité obtenue dans le contrôle et le témoin (cf IV.3.1.).

Le degré de peroxydation lipidique est décelé par le dosage de TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) parmi lesquelles on retrouve la MDA (malondialdéhyde). Il est exprimé en "% corrigé", en tenant compte des valeurs obtenues pour le contrôle et le témoin (cf IV.3.2.).

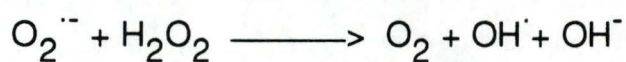
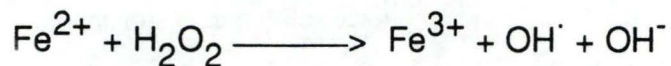
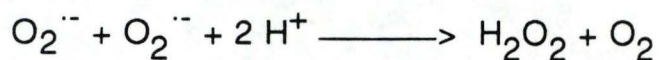
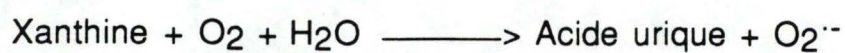


FIG 12 Production de  $\text{OH}^{\cdot}$  à partir du système X/XO Fe/ADP.

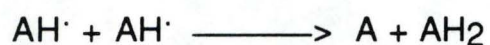
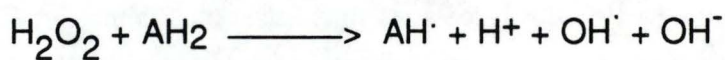
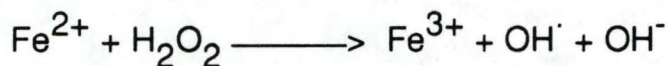
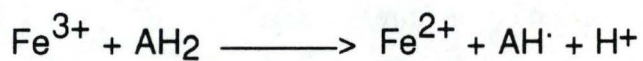
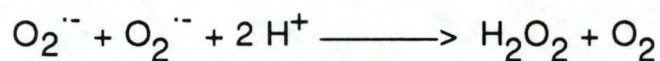
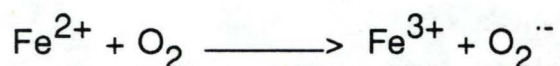


FIG 13 Production de  $\text{OH}^{\cdot}$  à partir du système acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub>.

## III.2. EMPLOI DE RADICAUX LIBRES

### III.2.1. PRODUCTION RADICALAIRE ENZYMATIQUE: X/XO FE/ADP

#### III.2.1.1. PRINCIPE THEORIQUE

La xanthine oxydase est responsable de la formation d'  $O_2^{\cdot-}$  par transformation de la xanthine en acide urique en présence d' $O_2$  et d' $H_2O$ . Les  $H_2O_2$  (formés suite à la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$ ) en présence de  $O_2^{\cdot-}$  et de  $Fe^{+++}$  (complexé à l'ADP pour éviter la formation de  $Fe(OH)_3$  précipitable sur les composants membranaires) permettent la formation de  $OH^{\cdot}$  suite à la réaction de Fenton (*fig 12*).

#### III.2.1.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une fraction L (dilution 20) est incubée à 37°C pendant 24 minutes dans une solution de

- tampon Tris HCl 10 mM pH 8
- saccharose 0,25 M
- substance testée adéquatement diluée (test) ou DMSO (témoin ou contrôle)
- xanthine 500  $\mu$ M
- $FeCl_3$  0,2 mM / ADP 2 mM
- xanthine oxydase 18 mU/ml

### III.2.2. PRODUCTION RADICALAIRE CHIMIQUE: ACIDE ASCORBIQUE/ $FeCl_2$

#### III.2.2.1. PRINCIPE THEORIQUE

L'acide ascorbique ( $AH_2$ ) peut, dans certaines circonstances, produire des radicaux libres. L'oxydation de l'acide ascorbique favorise la formation de  $OH^{\cdot}$  en recyclant le  $Fe^{+++}$  en  $Fe^{++}$ . Le système de production de radicaux hydroxyls comprend 3 réactions :

- production de  $O_2^{\cdot-}$  lors de l'oxydation du  $Fe^{++}$  en  $Fe^{+++}$
- dismutation de  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$
- production de  $OH^{\cdot}$  par la réaction de Fenton

L'acide ascorbique ne fait que réduire le  $Fe^{+++}$  en  $Fe^{++}$  (*fig 13*).

### III.2.2.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une fraction L (dilution 20) est incubée à 37°C pendant 30 minutes dans une solution de

- tampon Tris 10 mM HCl pH 8
- saccharose 0,25 M
- substance testée adéquatement diluée (test) ou DMSO (témoin ou contrôle)
- FeCl<sub>2</sub> 10 µM
- acide ascorbique 0,2 mM

## **III.3. EMPLOI DE MOLECULE PERMEANTE: LE GLUCOSE**

### III.3.1. PRINCIPE THEORIQUE

Le saccharose agit comme protecteur osmotique : il ne peut pas traverser la membrane. Le glucose, par contre, traverse la membrane lysosomale, il agit comme activateur osmotique et cela se traduit expérimentalement par la perte de la latence enzymatique.

### III.3.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une fraction L (dilution 20) est incubée à 25°C dans une solution de

- glucose 0,25 M Tris HCl 1mM pH 7,4
- substance testée adéquatement diluée (test) ou DMSO (contrôle)

Les temps d'incubation sont de 0, 15 et 25 minutes. Le temps 0 est utilisé comme témoin.

Enzyme	Substrat	Conc.	pH	Mesure	Références
N-acétyl-glucosaminidase	p-nitrophényl-N-acétyl-β D glucosaminide	4 mM	5	colorimétrie du p-nitrophénol	Vaes (1966)
Cathepsine C	glycyl-L-arginine-β-naphtylamide	0,25 mM	6	colorimétrie de la naphtylamine	Jadot <i>et al.</i> (1984)

*Tableau 2. Conditions expérimentales et références bibliographiques des dosages enzymatiques employés.*

## **IV. DOSAGES DE REFERENCE**

### **IV.1. DOSAGES ENZYMATIQUES**

#### **IV.1.1. PRINCIPE THEORIQUE : ACTIVITE LIBRE-ACTIVITE TOTALE**

La proportion de lysosomes endommagés au sein d'une fraction s'estime par l'activité libre de cette fraction.

L'activité libre (exprimée en pourcentage de l'activité totale) reflète la proportion d'enzymes accessibles au substrat. Une activité libre nulle indique un état de préservation totale des membranes lysosomales mais cette situation est utopique, il y a toujours une certaine destruction membranaire inévitable.

L'activité totale correspond à l'activité maximale de l'enzyme. Il s'agit de l'activité mesurée dans des conditions où il y a absence de barrière enzyme-substrat, les enzymes sont donc totalement accessibles à leur substrat. Cette situation se réalise expérimentalement par rupture de la membrane lysosomale après l'ajout d'un détergent de triton X-100 0,1%.

#### **IV.1.2. METHODES GENERALES**

Un résumé des conditions expérimentales utilisées pour le dosage de la N-acétylglucosaminidase et de la cathepsine C (enzymes marqueurs des lysosomes) ainsi que les références bibliographiques décrivant ces méthodes de façon détaillée se trouve ci-contre (*tableau 2*).

### **IV.2. MESURE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE**

#### **IV.2.1. PRINCIPE THEORIQUE**

La peroxydation lipidique provoque la désorganisation des membranes, riches en acides gras polyinsaturés, avec libération de radicaux lipidiques ( $L\cdot$ ), de radicaux alkoxy ( $LO\cdot$ ), de radicaux peroxy ( $LOO\cdot$ ), d'hydroperoxydes ( $LOOH$ ) ...

La décomposition de ces molécules lipidiques aboutit à la formation de nombreux aldéhydes, parmi ces produits de dégradation, la malondialdéhyde peut servir à estimer la peroxydation lipidique.

#### IV.2.2. METHODE GENERALE

Les solutions stocks utilisées sont le TBA (acide thiobarbiturique 0,375 %)-TCA (acide trichloracétique 15 %), le BHT (hydroxytoluène butylé 2 %) (Buege et Aust, 1978).

Les étalons MDA sont réalisés avec le malonaldéhyde bis-(diméthyl acétal).

Le mode opératoire consiste à mélanger 0,5 ml d'échantillon, 20 µl de BHT stock et 1 ml de TBA-TCA, de porter cette mixture à 80°C pendant 15 min. et la centrifuger à haute vitesse pendant 10 min.. Le complexe MDA-TBA ainsi formé est décelable après refroidissement en spectrophotométrie puisqu'il absorbe à 531 nm.

#### IV.3. DETAIL DU CALCUL DE L'ACTIVITE LIBRE

##### IV.3.1. CAS DE L'ESTIMATION DE L'ETAT DES ORGANITES

$$\text{Activité libre en \%} = \frac{\text{Absorbance (test ou témoin ou contrôle libre)}}{\text{Absorbance (test ou témoin ou contrôle total)}}$$

$$\text{Activité libre en \% corrigé} = \frac{\text{Activité libre en \% (test)} - \text{Activité libre en \% (témoin)}}{\text{Activité libre en \% (contrôle)} - \text{Activité libre en \% (témoin)}}$$

##### IV.3.2. CAS DE L'ESTIMATION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

$$\text{Concentration en MDA en \% corrigé} = \frac{\text{Absorbance (test)} - \text{Absorbance (témoin)}}{\text{Absorbance (contrôle)} - \text{Absorbance (témoin)}}$$

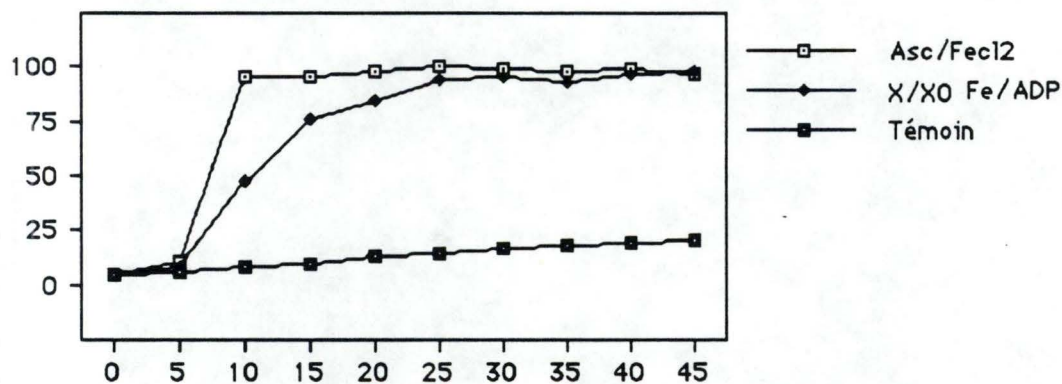
# RESULTATS ET DISCUSSIONS

# I. INFLUENCE DES FLAVONOÏDES SUR LA MEMBRANE LYSOSOMALE SOUMISE A L'ACTION DES RADICAUX LIBRES OXYGENES

## I.1. ESTIMATION DU POUVOIR LESANT

Les dérivés actifs de l'  $O_2$  ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ) utilisés dans ce travail sont générés par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase-Fe/ADP ou par un système chimique acide ascorbique/ $FeCl_2$ .

Les remaniements tant structurels que fonctionnels de la membrane se traduisent notamment par une perte de la latence enzymatique comme l'illustre la *fig 14* rendant compte de l'augmentation de l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase en fonction du temps d'une fraction lysosomale incubée en présence de systèmes générateurs de radicaux libres.



**FIG. 14** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée pendant des temps croissants en présence et en absence de système générateur de radicaux libres.*

*en abscisse: le temps d'incubation en minutes*

*en ordonnée: l'activité libre en %*

## I.2. ETUDE DES FLAVONOÏDES ET DERIVES

Cette partie est consacrée à la manière dont les flavonoïdes peuvent affecter la membrane lysosomale soumise à l'action de radicaux libres oxygénés.

### I.2.0. PRELIMINAIRE

1. Les valeurs supérieures à 100% et inférieures à 0%, ont été respectivement ramenées à ces valeurs maximales et minimales.

2. Alors que dans la partie "recherche d'un effet potentiel", les activités libres et totales s'évaluent par le dosage de la N-acétylglucosaminidase lors de la production radicalaire enzymatique et par le dosage de la cathepsine C lors de la production radicalaire chimique, dans la partie "détermination du degré d'efficacité", la production radicalaire est chimique et les activités libres et totales se mesurent par le dosage de la N-acétylglucosaminidase.

3. Ce chapitre comprend quelques expressions définies subjectivement, celles-ci permettent les comparaisons nécessaires à l'élaboration de conclusions. Nous parlons **d'une protection totale** lorsque l'activité libre, exprimée en % corrigé, est proche de 0% et **d'une protection partielle** lorsque celle-ci ne dépasse pas 25%.

**La notion de produit le plus efficace** est définie comme le produit assurant une protection pratiquement totale à la concentration la plus faible possible.

### I.2.1. ANALYSE DES RESULTATS

Les produits étudiés se répartissent en 3 groupes comprenant flavonoïdes, flavanoïdes et proanthocyanidine.

Ce chapitre est composé de 2 parties, la première, intitulée "recherche d'un effet potentiel", nous permettra de sélectionner les substances efficaces, la deuxième, intitulée "détermination du degré d'efficacité", cernera le degré d'efficacité des substances actives.

L'examen des graphiques nous révèle que certaines substances contrecarrent l'effet lésant qu'exercent les radicaux libres sur la membrane lysosomale, d'autres par contre, ne possèdent pas cette propriété. On remarque également que parmi les substances actives le degré d'efficacité est différent.

Flavonoides	Flavone			Inactive	
	Dérivés hydroxylés	6-monohydroxyflavone		Inactive	
		7-monohydroxyflavone		Inactive	
		7,8-dihydroxyflavone		Active	
		5,7-dihydroxyflavone ou Chryisine		Inactive	
		5,7,4'-trihydroxyflavone ou Apigénine		Inactive	
		3,5,7-trihydroxyflavone ou Galangine		Active	
		3,7,3',4'-tétrahydroxyflavone ou Fisétine		Active	
		3,5,7,4'-tétrahydroxyflavone ou Kaempférol		Active	
		3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou Quercétine		Active	
		3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone ou Morine		Active	
		3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone ou Myricétine		Inactive	
		Substituants méthoxy	3,5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Kaempféride		Active
			5,7,3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Diosmétine		Inactive
		Substituants rutinoside	3-rutinoside de quercétine ou Rutine		Active
7-rutinoside de diosmétine ou Diosmine			Inactive		
5-hydroxy-7,3',4'-éthoxy-3-rutinoside ou Troxérutine			Inactive		
Flavanoides	Flavanone			Inactive	
	Dérivés hydroxylés	5,7,4'-trihydroxyflavanone ou Naringénine		Inactive	
		3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou Taxifoline		Active	
Substituants rutinoside	5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone -7-rutinoside ou Hespéridine		Inactive		
Proanthocyanidine		3,5,7,3',4'-flavanpentol ou (d) Catéchine		Active	

*Tableau 3. Récapitulatif de l'(in)activité des flavonoïdes testés dans la protection des lysosomes contre l'action lésante des radicaux libres produits par le système XIXO Fe/ADP.*

## I.2.1 1. RECHERCHE D'UN EFFET POTENTIEL

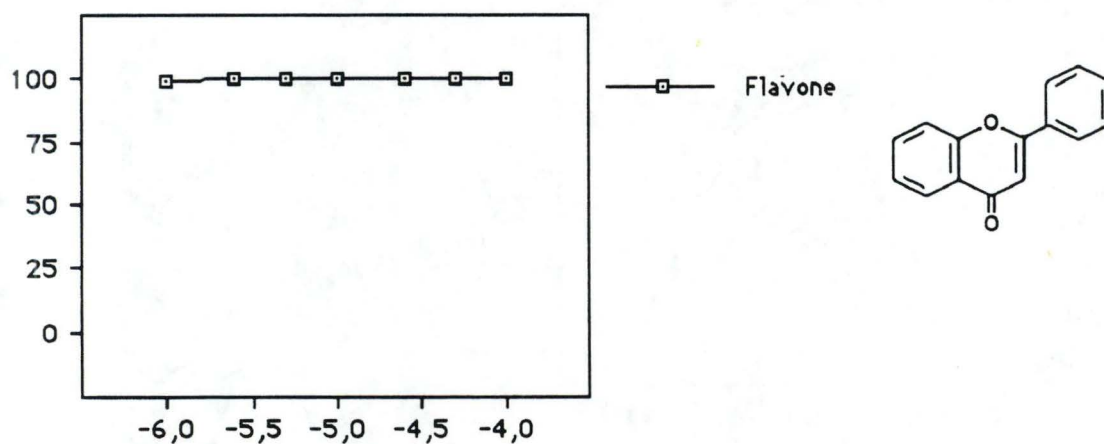
### A. Présentation des résultats

Les substances actives se retrouvent dans les 3 groupes étudiés.

#### A.1. Production radicalaire enzymatique (X/XO-Fe/ADP)

La 7,8-dihydroxyflavone ( flavonoïde dihydroxylé), la galangine (flavonoïde trihydroxylé), la fisétine et le kaempférol (flavonoïdes tétrahydroxylés), la quercétine et la morine (flavonoïdes pentahydroxylés), le kaempféride (flavonoïde méthoxy-substitué), la rutine (flavonoïde rutinoglycosylé), la taxifoline (flavonoïde pentahydroxylé) et la (d) catéchine (proanthocyanidine) se sont révélés efficaces (fig 16, fig 16', fig 17, fig 18, fig 20, fig 22).

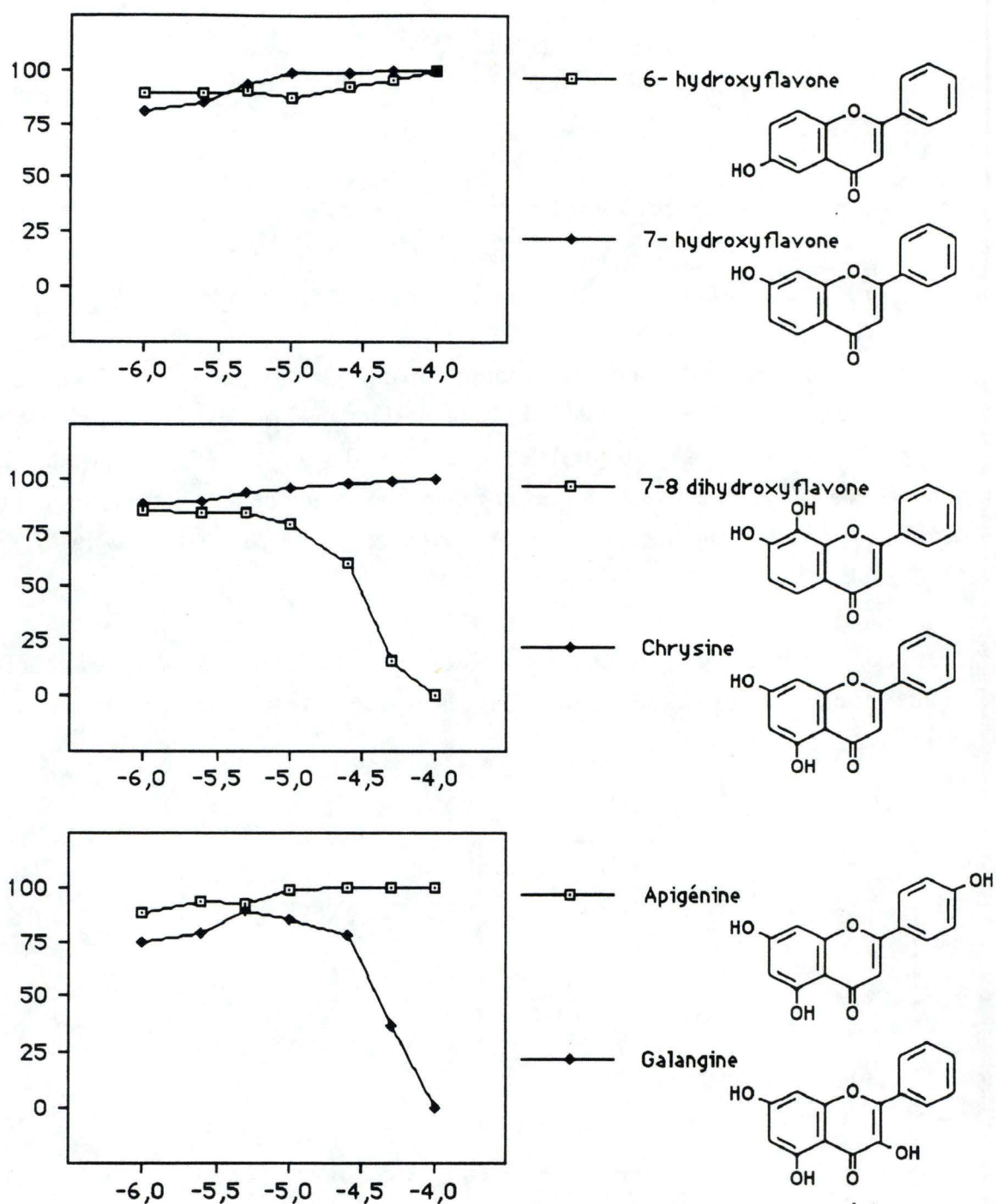
Alors que le *tableau 3* ci-contre permet de visualiser les résultats obtenus pour la totalité des expériences réalisées, le détail de ces expériences est représenté ci-après sous forme de graphiques.



**FIG. 15** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO- FE/ADP et du flavonoïde flavone.*

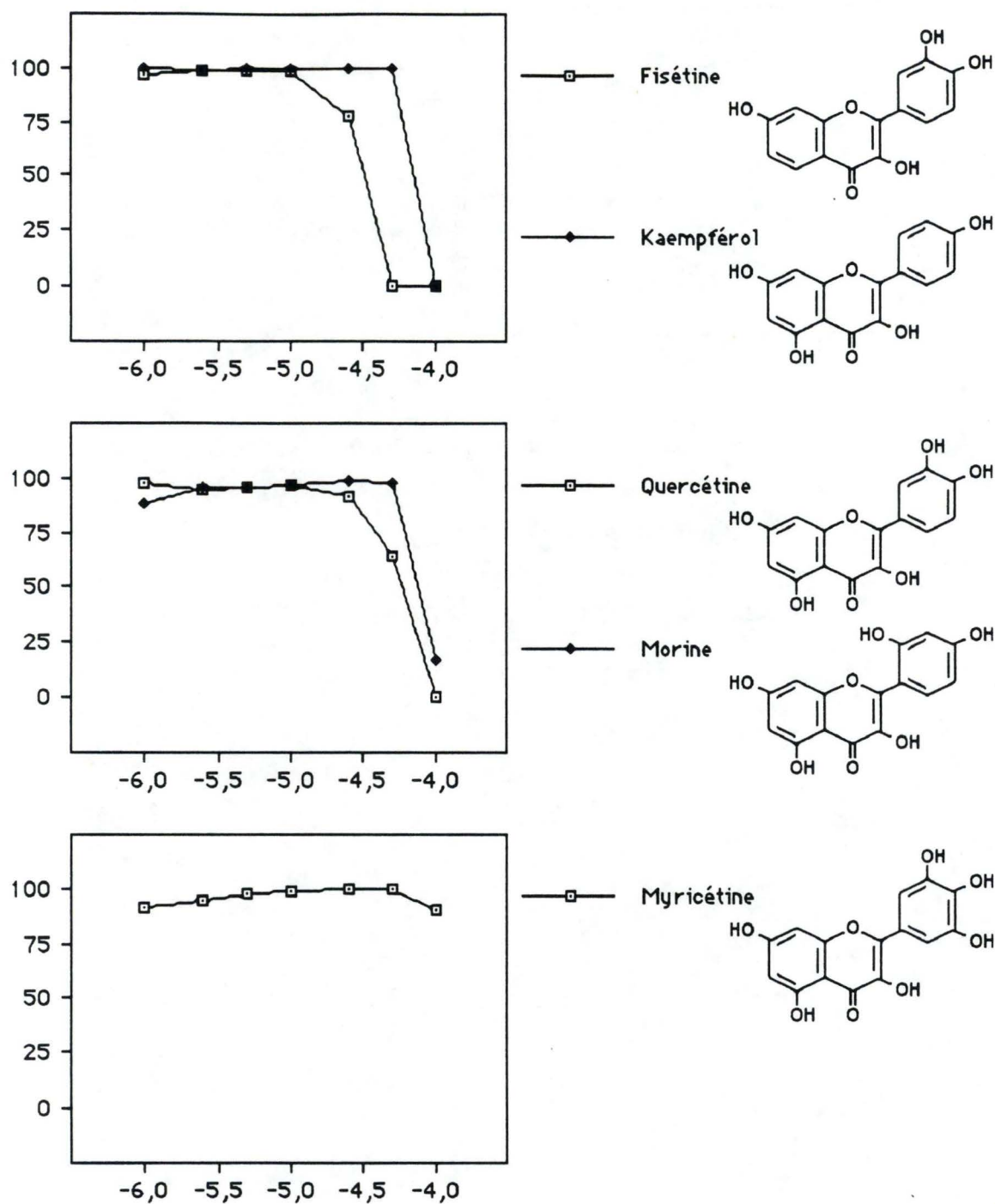
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 16** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO-FE/ADP et de flavonoïdes hydroxylés.*

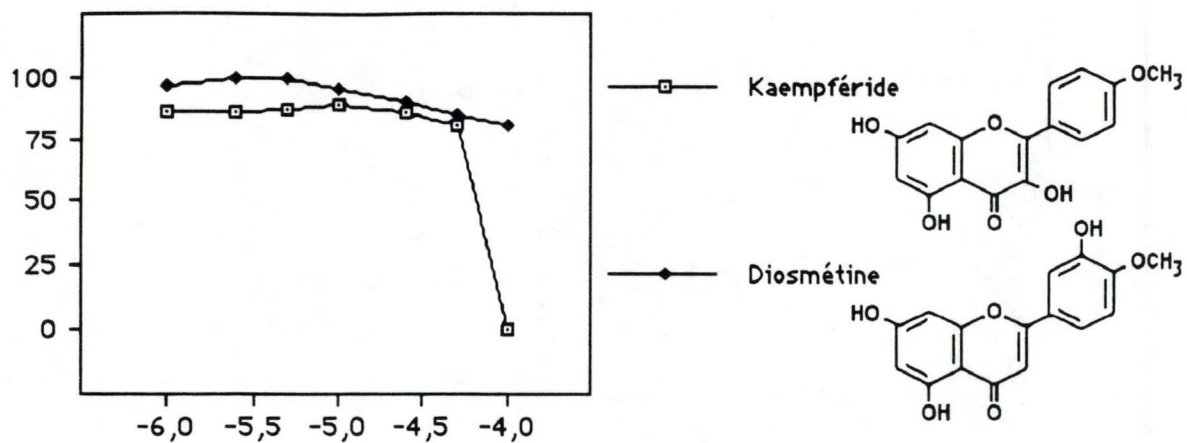
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 16'** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO- FE/ADP et de flavonoïdes hydroxylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

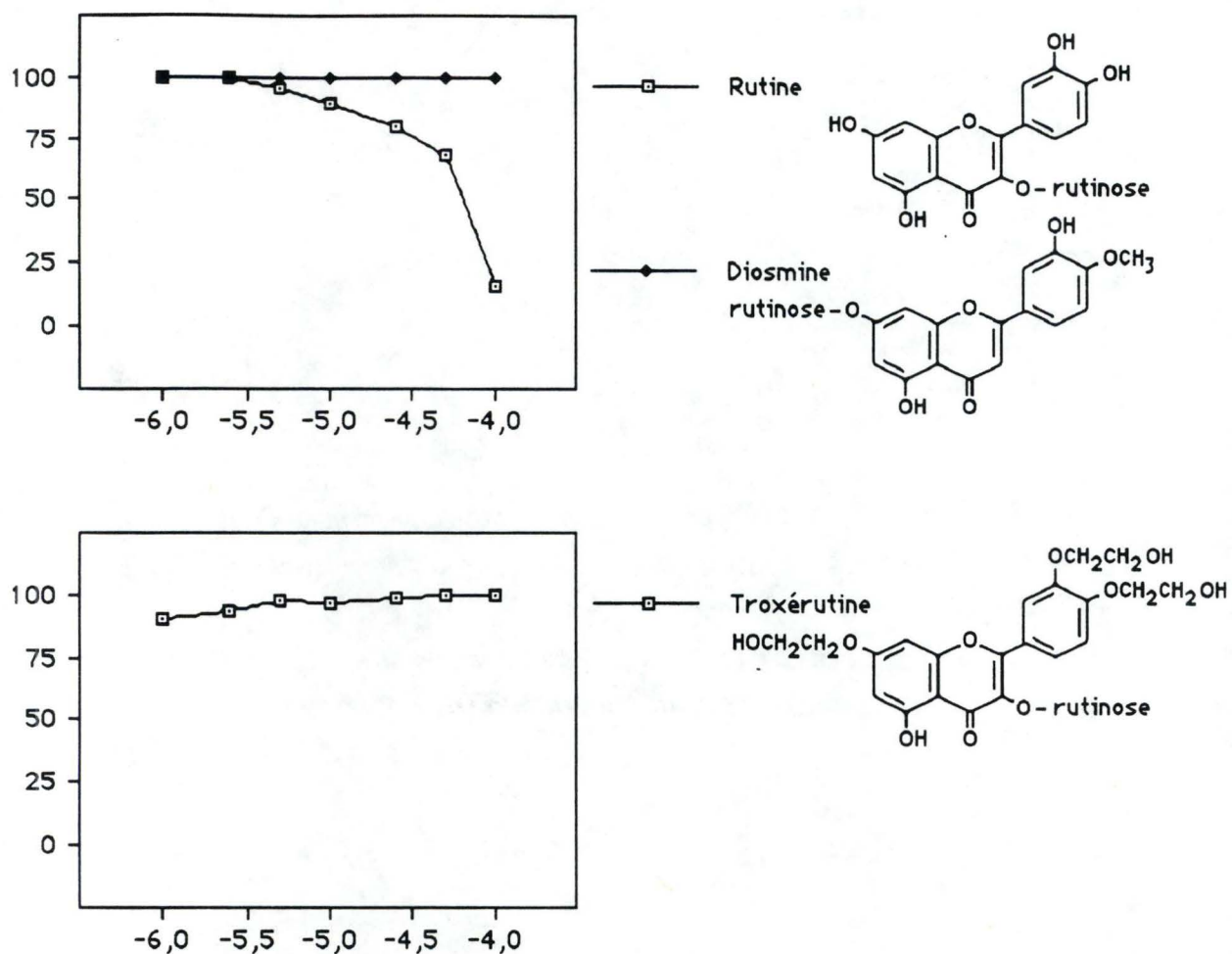
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 17** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO-FE/ADP et de flavonoïdes méthoxy substitués.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

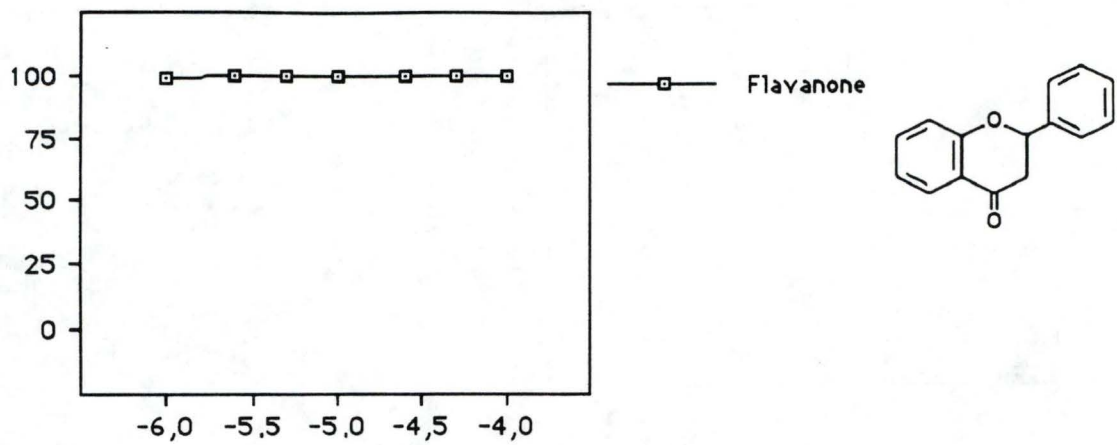
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 18** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique XIXO- FE/ADP et de flavonoïdes rutinoglycosylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

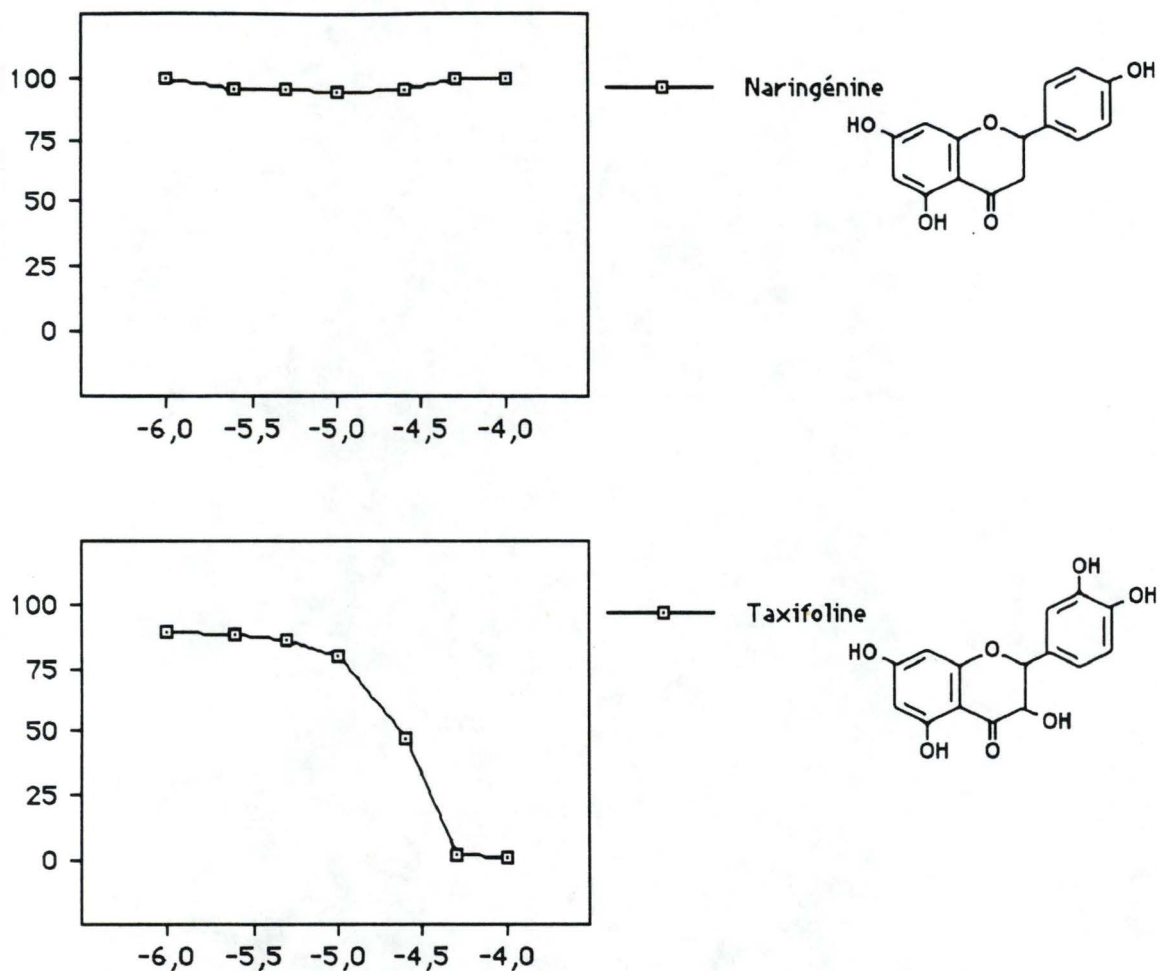
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



*FIG. 19* Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO-FE/ADP et du flavanoïde flavanone.

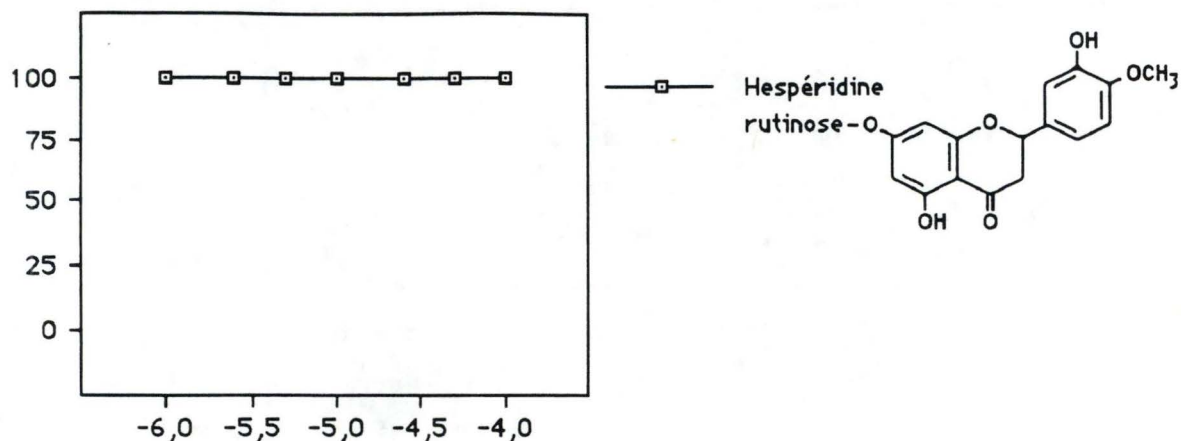
en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé

en ordonnée: l'activité libre en % corrigé



**FIG 20** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO- FE/ADP et de flavanoïdes hydroxylés.*

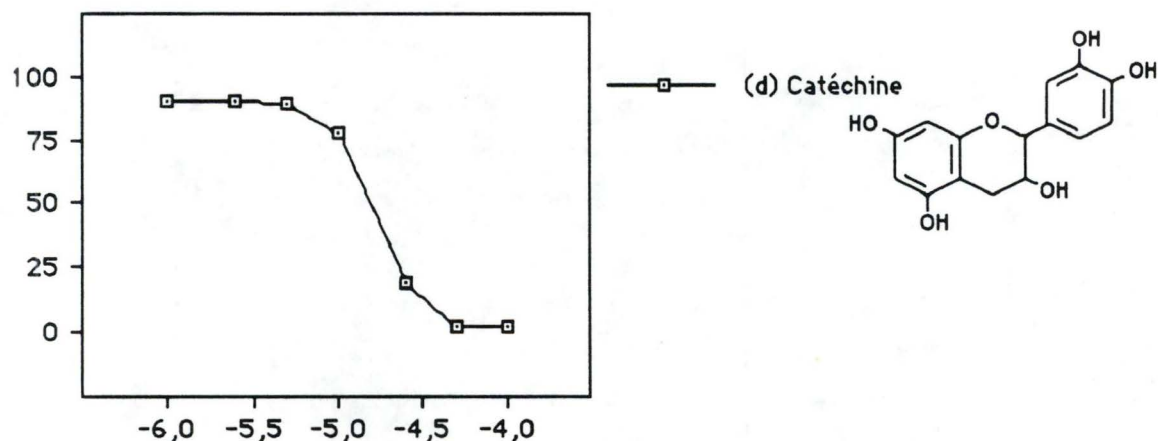
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 21** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO- FE/ADP et de flavanoïde rutinoglycosylé.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 22** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO- FE/ADP et de la proanthocyanidine (d) catéchine.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*

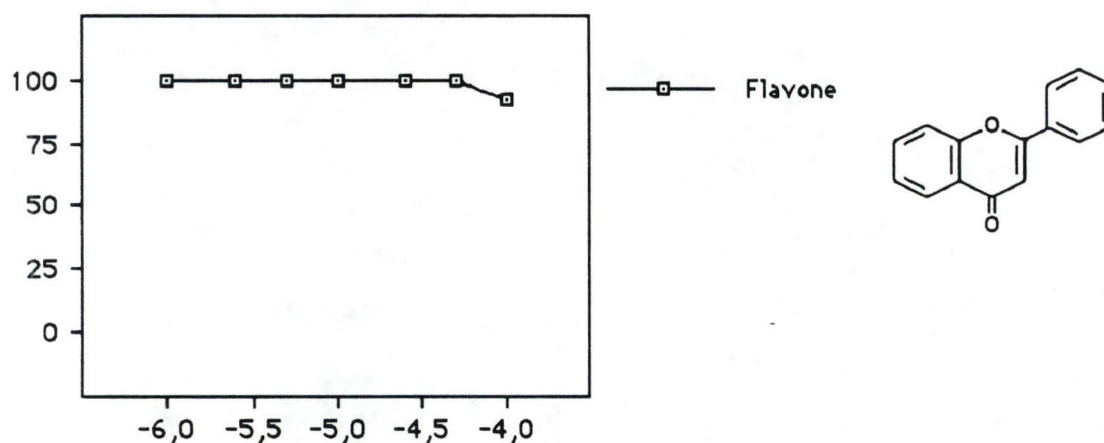
Flavonoïdes	Flavone			Inactive
	Dérivés hydroxylés	6-monohydroxyflavone		Inactive
		7-monohydroxyflavone		Inactive
		7,8-dihydroxyflavone		Active
		5,7-dihydroxyflavone ou Chrysin		Active
		5,7,4'-trihydroxyflavone ou Apigénine		Inactive
		3,5,7-trihydroxyflavone ou Galangine		Active
		3,7,3',4'-tétrahydroxyflavone ou Fisétine		Active
		3,5,7,4'-tétrahydroxyflavone ou Kaempférol		Active
		3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou Quercétine		Active
		3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone ou Morine		Active
	3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone ou Myricétine		Active	
	Substituants méthoxy	3,5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Kaempféride		Active
		5,7,3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Diosmétine		Inactive
		Substituants rutinoside	3-rutinoside de quercétine ou Rutine	
7-rutinoside de diosmétine ou Diosmine			Active	
5-hydroxy-7,3',4'-éthoxy-3-rutinoside ou Troxérutine			Active	
Flavanoides	Flavanone			Inactive
	Dérivés hydroxylés	5,7,4'-trihydroxyflavanone ou Naringénine		Inactive
		3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou Taxifoline		Active
	Substituants rutinoside	5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone -7-rutinoside ou Hespéridine		Inactive
Proanthocyanidine		3,5,7,3',4'-flavanpentol ou (d) Catéchine		Active

*Tableau 4. Récapitulatif de l'(in)activité des flavonoïdes testés dans la protection des lysosomes contre l'action lésante des radicaux libres produits par le système acide ascorbique / FeCl<sub>2</sub>.*

### A.2. Production radicalaire chimique (Acide ascorbique/ $\text{FeCl}_2$ )

La 7,8-dihydroxyflavone et la chrysin (flavonoïdes dihydroxylés), la galangine (flavonoïde trihydroxylé), la fisétine et le kaempférol (flavonoïdes tétrahydroxylés), la quercétine et la morine (flavonoïdes pentahydroxylés), la myricétine (flavonoïde hexahydroxylé), le kaempféride (flavonoïde méthoxy-substitué), la rutine, la diosmine et la troxérutine (flavonoïdes rutinoglycosylés), la taxifoline (flavonoïde pentahydroxylé) et la (d) catéchine (proanthocyanidine) se sont révélés efficaces (fig 24, fig 24', fig 25, fig 26, fig 28, fig 30).

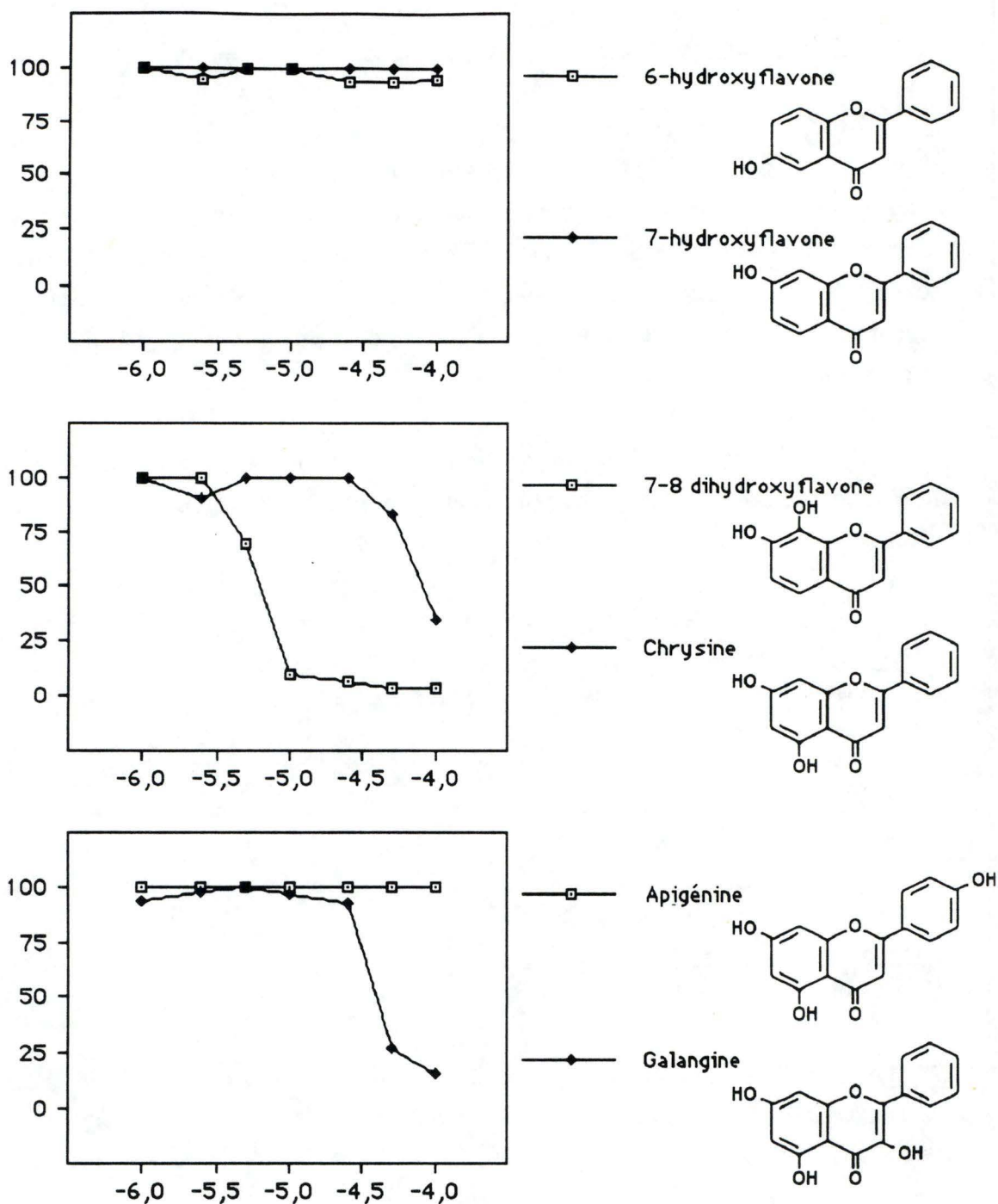
Alors que le tableau 4 ci-contre permet de visualiser les résultats obtenus pour la totalité des expériences réalisées, les détails de ces expériences sont représentés ci-après sous forme de graphiques.



**FIG 23.** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/ $\text{FeCl}_2$  et du flavonoïde flavone.*

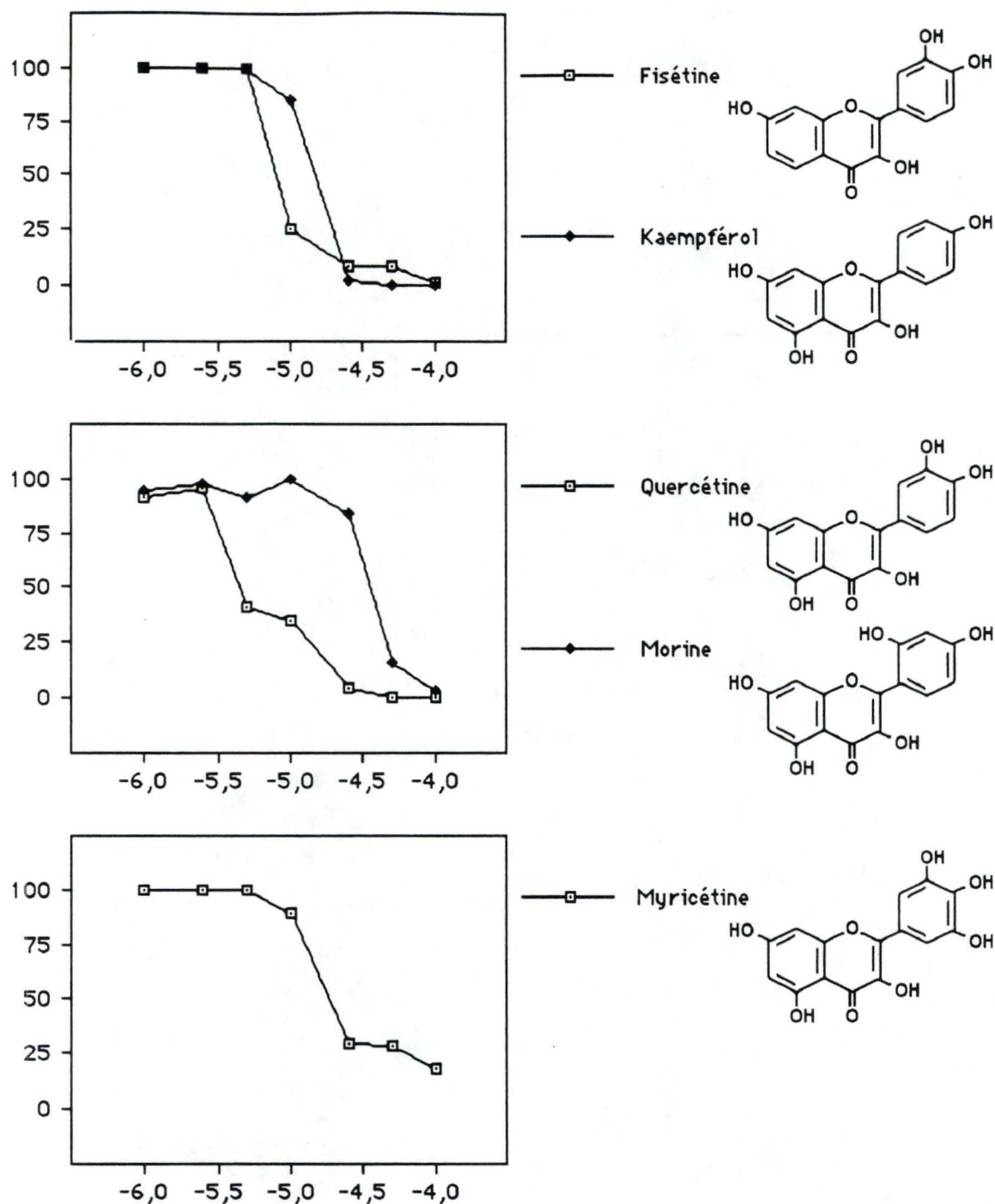
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 24** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïdes hydroxylés.*

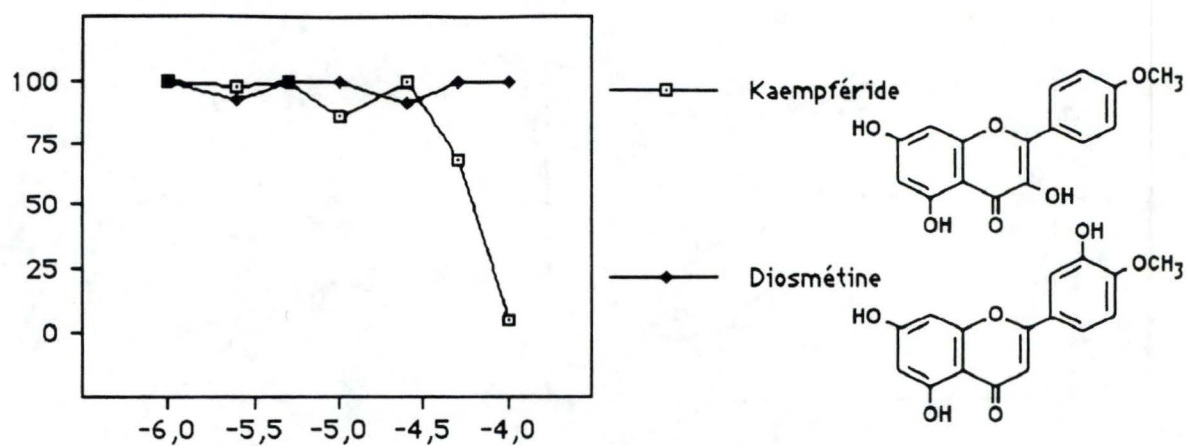
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 24'** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïdes hydroxylés.*

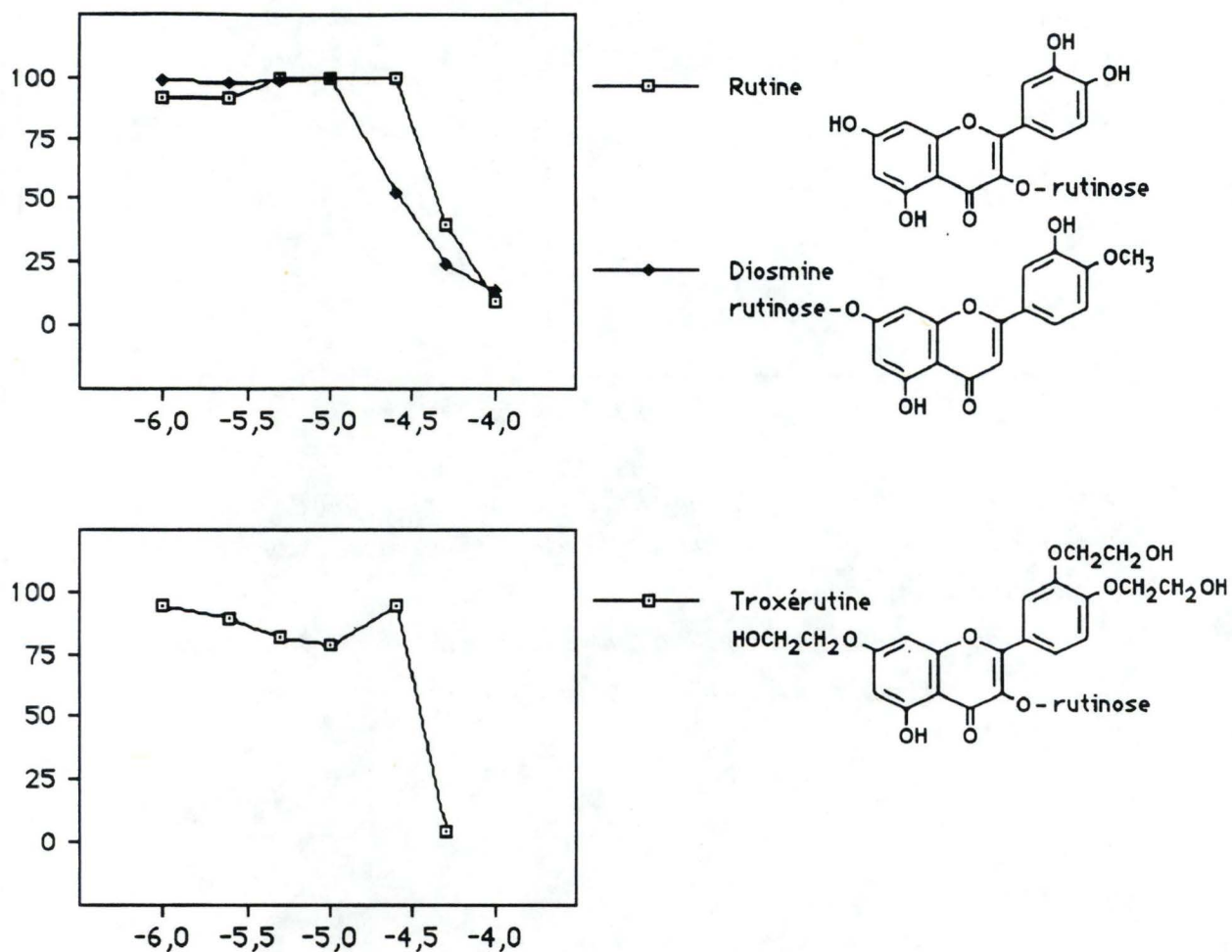
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



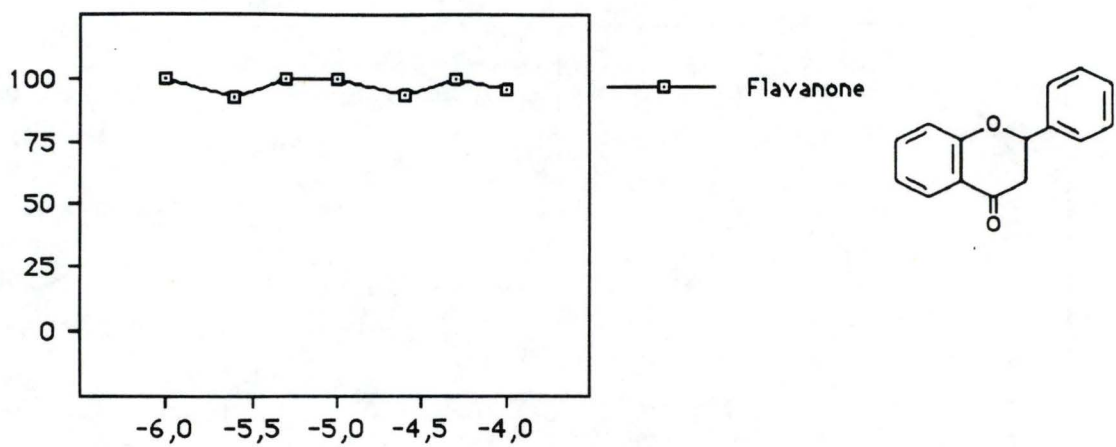
**FIG 25** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïdes méthoxy substitués.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



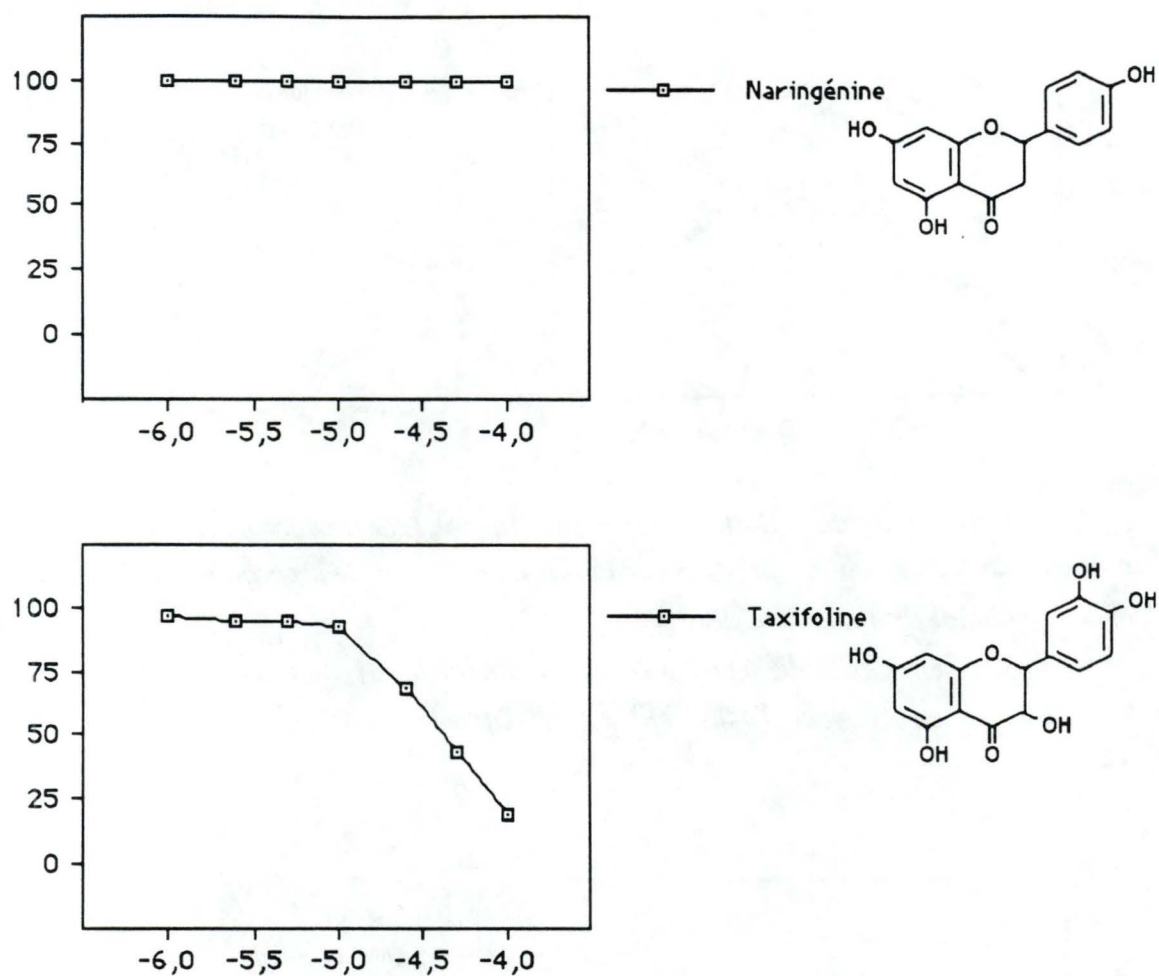
**FIG 26** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïdes rutinoglycosylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



*FIG. 27. Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et du flavanoïde flavanone.*

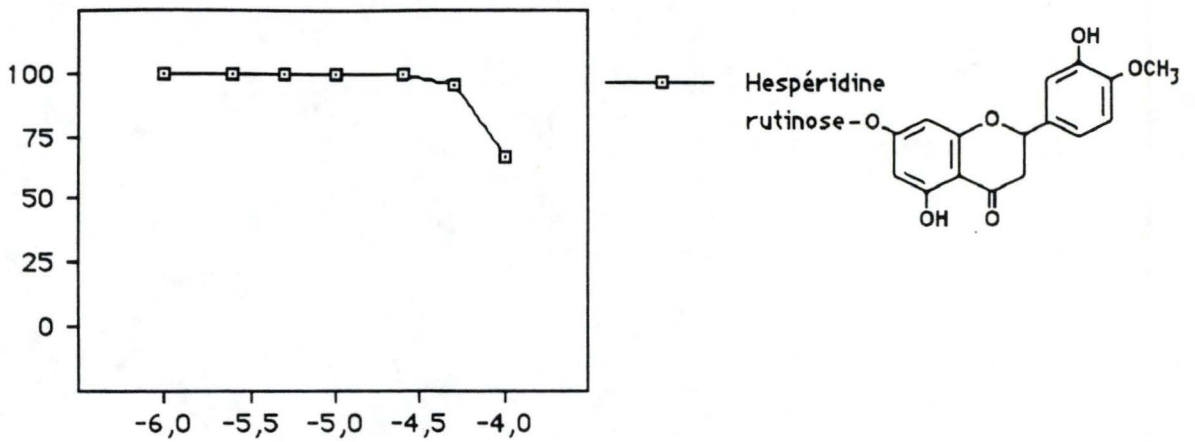
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 28** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavanoïdes hydroxylés.*

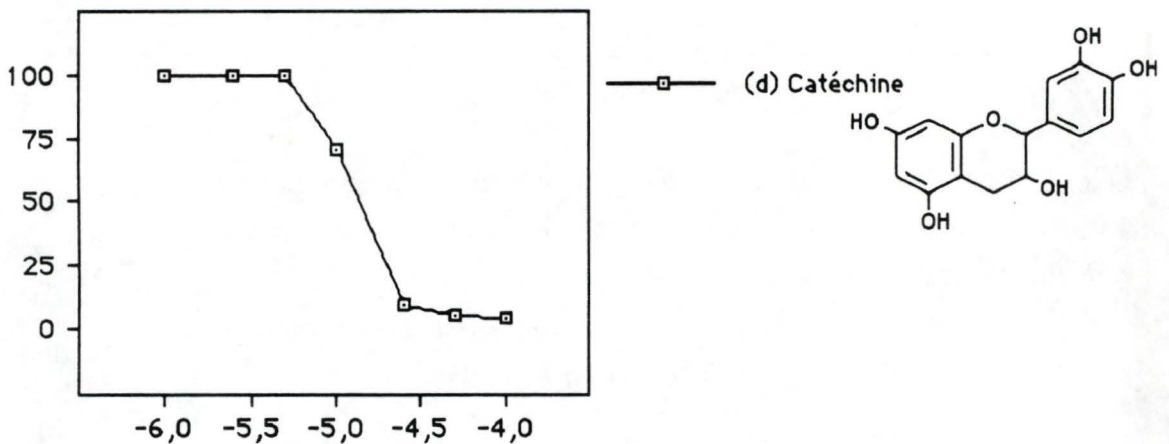
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 29** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavanoïdes rutinoglycosylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 30** *Activité libre de la Cathepsine C d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de la proanthocyanidine (d) catéchine.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*

## B. Constatations

Quel que soit le système de production radicalaire utilisé, les résultats sont concordants à quelques exceptions près.

En effet, les flavonoïdes (ou dérivés) exerçant un effet protecteur vis à vis de la membrane lysosomale dans le cas de l'activation par le système enzymatique X/XO Fe/ADP, exercent également cet effet de protection dans le cas de l'activation par le système chimique acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub>. Seules la chrysine (flavonoïde dihydroxylé), la myricétine (flavonoïde hexahydroxylé), la troxérutine et la diosmine (nous découvrirons plus loin une particularité propre à ce produit) (flavonoïdes rutinoglycosylés) n'assurent une protection que contre les radicaux libres produits par système chimique.

On constate également que l'effet bénéfique qu'exercent les produits se fait ressentir à des concentrations moins élevées lors de l'activation par la voie chimique acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub>.

### I.2.1.2. DETERMINATION DU DEGRE D'EFFICACITE

Les produits permettant de conserver intacts les lysosomes soumis à un stress radicalaire ont été alors étudiés de manière plus approfondie afin de préciser la concentration à laquelle débute cette protection. Pour ce faire, tandis que dans la série d'expériences précédente une même fraction de granules permettait de tester un flavonoïde (ou un dérivé) à différentes concentrations, ici elle est utilisée pour tester tous les flavonoïdes (ou dérivés) actifs à une même concentration. L'expérience est répétée 3 fois pour permettre d'établir des moyennes.

Les résultats obtenus par les 2 types d'activation étant suffisamment concordants et le système enzymatique générateur de radicaux libres oxygénés pouvant être inhibé (ce point sera débattu ultérieurement dans ce chapitre), l'activation radicalaire chimique acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> seule sera appliquée.

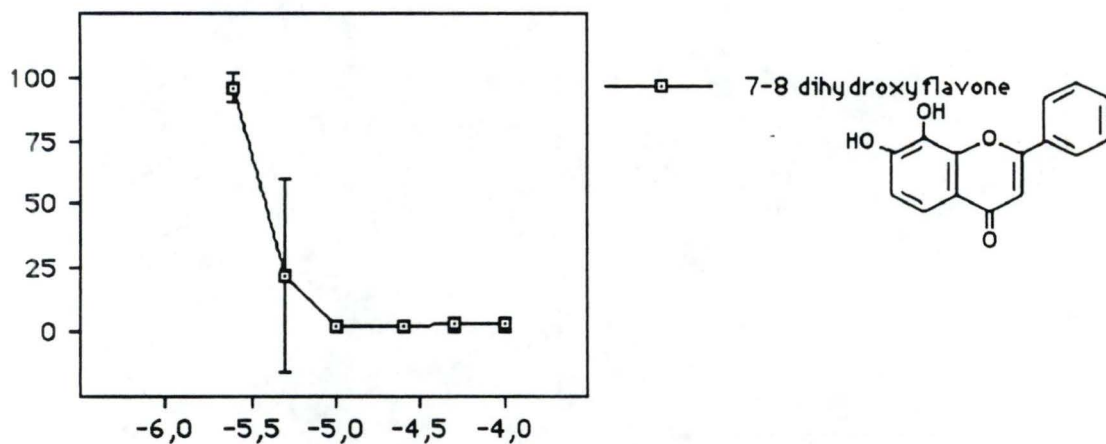
## A. Présentation des résultats

Au sein des produits testés, plus précisément des flavonoïdes rutinoglycosylés, notons que la diosmine non fraîchement dissoute dans le DMSO est inactive.

Une protection totale est offerte par les 7-8 dihydroxyflavone, fisétine, kaempférol, quercétine, morine, myricétine, diosmine fraîche, rutine, troxérutine et (d) catéchine. La 7-8 dihydroxyflavone (flavonoïde dihydroxylé) et la (d) catéchine (proanthocyanidine) sont les plus efficaces, ils agissent déjà à des concentrations de  $10^{-5}$  voire  $5 \cdot 10^{-6}$  molaire (fig 31, fig 34). La fisétine (flavonoïde tétrahydroxylé), la quercétine (flavonoïde pentahydroxylé), la myricétine (flavonoïde hexahydroxylé) et la diosmine fraîche (flavonoïde rutinoglycosylé) contrecarrent les effets néfastes des radicaux libres à partir de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  molaire (fig 31', fig 32). Le kaempférol (flavonoïde tétrahydroxylé) la morine (flavonoïde pentahydroxylé) et la troxérutine (flavonoïde rutinoglycosylé) sont actifs à une concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$  molaire (fig 31', fig 32). La rutine (flavonoïde rutinoglycosylé) n'agit pas avant des concentrations de  $10^{-4}$  molaire (fig 32).

La taxifoline (flavonoïde pentahydroxylé) à  $10^{-4}$  molaire n'offre qu'une protection partielle (fig 33).

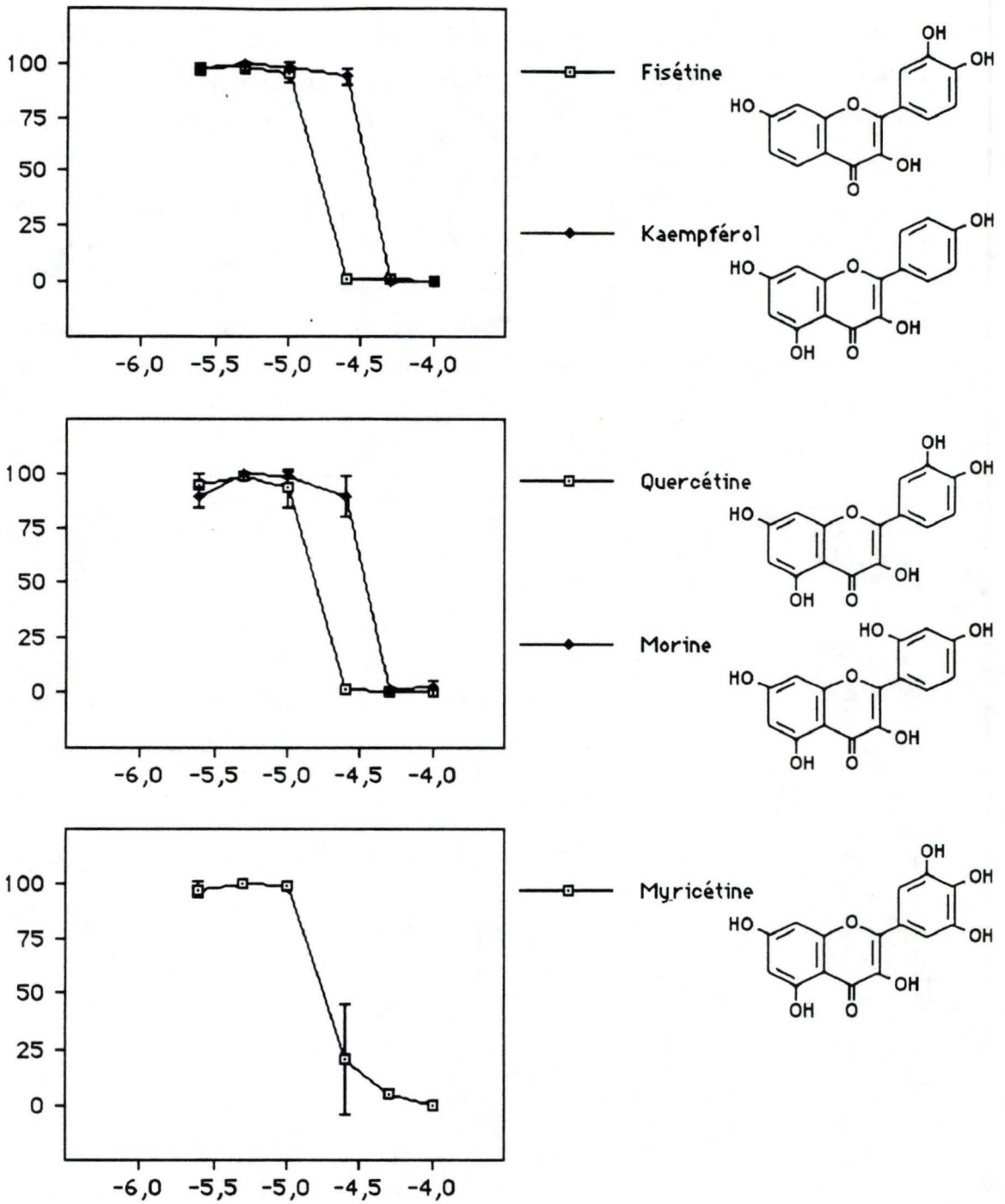
Les détails des expériences réalisées sont représentés ci-après sous forme de graphiques: les valeurs sont des moyennes accompagnées de leur déviation standard.



**FIG 31** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïde hydroxylé.*

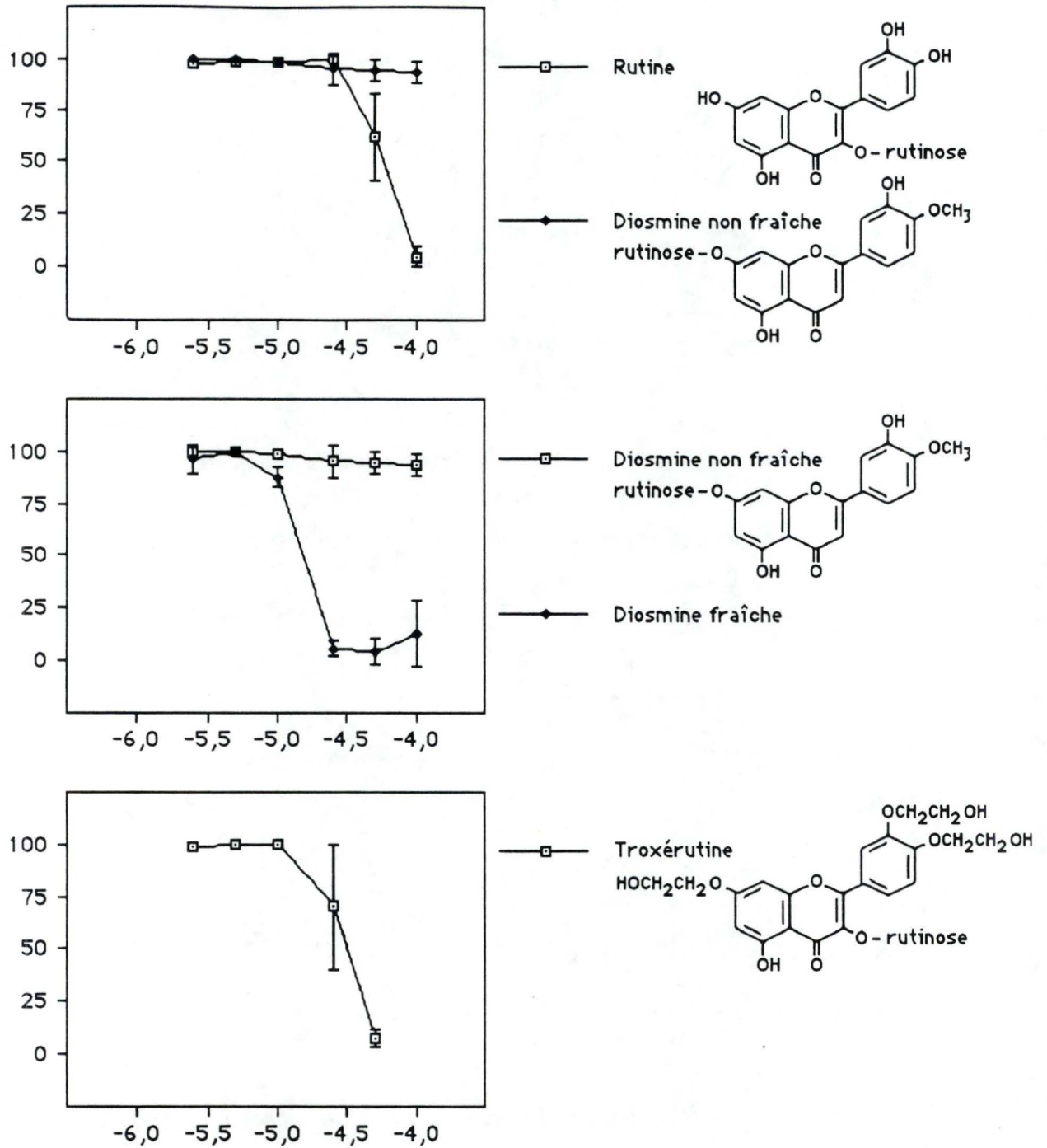
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



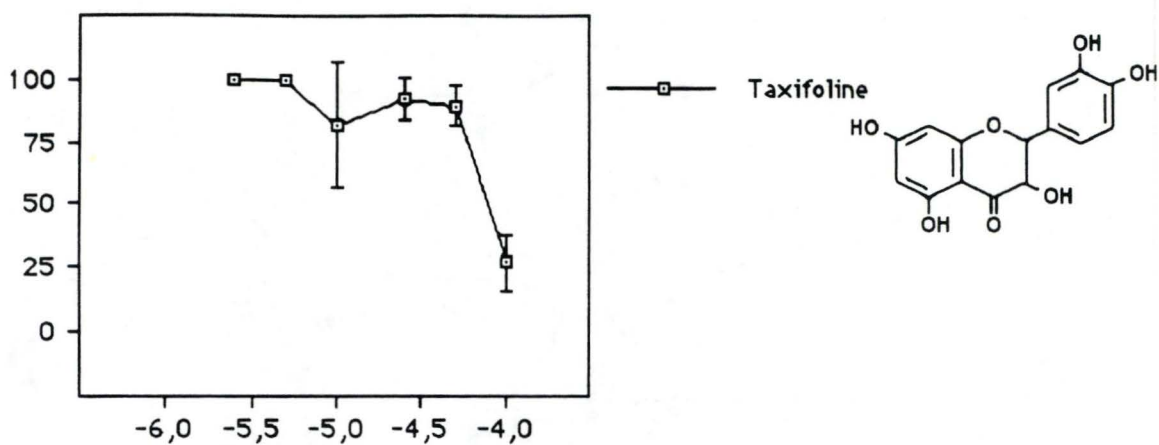
**FIG 31'** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïdes hydroxylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé  
 en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



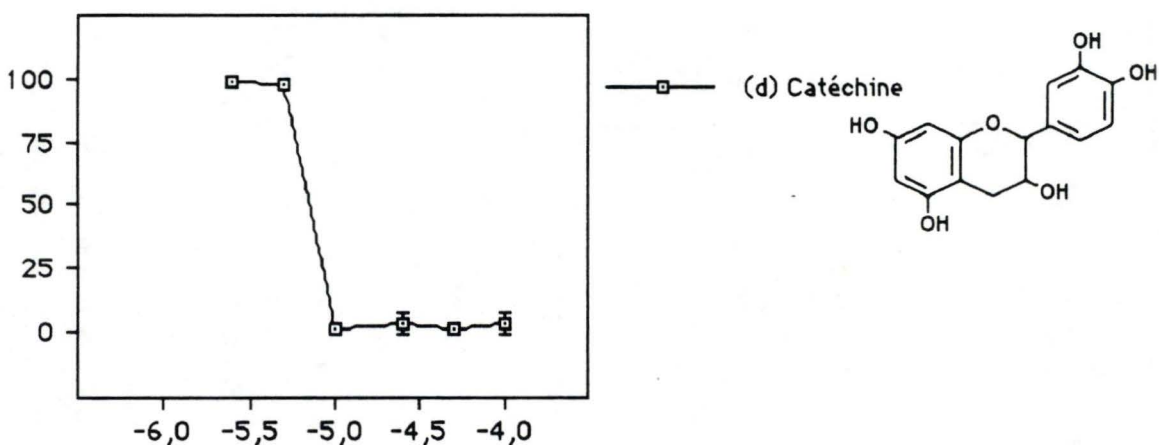
**FIG. 32** Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïdes rutinoglycosylés.

en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé  
en ordonnée: l'activité libre en % corrigé



**FIG.33** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavanoïde hydroxylé.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé  
en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG.34** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie chimique Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de la proanthocyanidine (d) catéchine*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé  
en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*

## B. constatations

Le degré d'efficacité des substances peut varier fortement, c'est notamment le cas pour la (d) catéchine, active à partir de  $10^{-5}$  M et de la rutine, active à partir de  $10^{-4}$  M.

### I.2.2 DISCUSSION

#### I.2.2.1. MECANISME(S) DE PROTECTION

Les résultats obtenus montrent que certains flavonoïdes ou dérivés protègent les lysosomes des radicaux libres auxquels ils sont sensibles. Ce phénomène est aussi bien du point de vue biochimique que pharmacologique des plus intéressants. En effet, les flavonoïdes, composés naturels, pourraient être d'un grand intérêt dans la recherche d'un traitement des maladies où sont impliqués les radicaux libres.

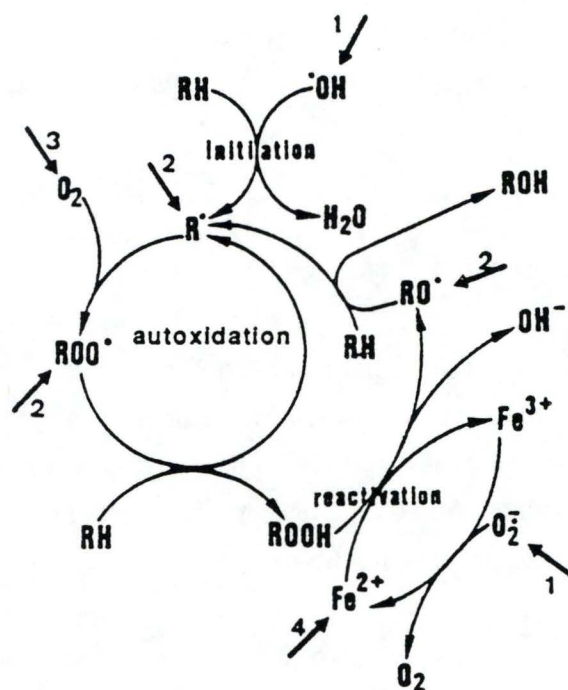
L'action de ces substances peut provenir d'une part d'une interaction avec le réactif lésant ou d'autre part, d'une interaction avec la membrane lysosomale.

Si la première hypothèse a bien été mise en évidence, aucune observation déterminante n'a permis de confirmer ou d'infirmer la seconde.

Le mécanisme d'action (*schéma 1*) de ces substances dans l'interaction avec le réactif lésant peut se situer:

-au niveau du système générateur de radicaux libres: une inhibition de la production enzymatique de radicaux libres (inhibition de la xanthine oxydase) peut être envisagée. Des travaux ont d'ailleurs mis en évidence que quercétine, myricétine, rutine et troxérutine possèdent cette propriété (Robak & Gryglewski, 1988). Les expériences réalisées au laboratoire (expériences non détaillées) confirment les observations trouvées dans la littérature en ce qui concerne la quercétine et la myricétine (*tableau 5*) mais, par ailleurs, elles montrent également qu'il n'y a pas de relation entre l'inhibition de l'enzyme et la protection des organites puisque la myricétine n'exerce pas de protection contre les radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP.

L'emploi du système acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub>, non directement inhibable, permet de découvrir une action à d'autres niveaux.



*Schéma 1* Autoxydation cyclique des acides gras polyinsaturés (RH). Effet protecteur des flavonoïdes . 1. : activité antiradicalaire ; 2. : activité antilipoperoxydante ; 3. : activité antioxydante ; 4. : activité chélatrice (Pincemail et al., 1990).

	Effet sur les lysosomes	Inhibition de la xanthine oxydase
Quercétine	+	+
Myricétine	0	+
Diosmine	0	+
(d) Catéchine	+	0

*Tableau 5* Inhibition de la xanthine oxydase par les flavonoïdes et efficacité de ceux-ci dans la protection des lysosomes contre des radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP.

-au niveau des différents radicaux libres (activité antiradicalaire): une réaction avec les radicaux libres produits ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ) est tout à fait possible. Alors que des mécanismes tenant compte de  $H_2O_2$  ne peuvent être exclus, les propriétés "scavenger" d'anions superoxydes et de radicaux hydroxyles ont été étudiées à de nombreuses reprises. Ainsi des substances dont l'action se situe à un niveau élevé dans la chaîne de réduction de l' $O_2$  en s'attaquant à  $O_2^{\cdot-}$  ont été mises en évidence, il s'agit de la (d) catéchine, la quercétine, la myricétine et la rutine (Robak and Gryglewski, 1988 ; Pincemail *et al.*, 1990). L'interaction entre  $OH^{\cdot}$  et les flavonoïdes a été décrite pour la quercétine, la myricétine, la rutine, la morine, la naringénine, la (d) catéchine et dans une moindre mesure le kaempférol et l'héspéridine (Pincemail *et al.*, 1990 ; Cillard *et al.*, 1990).

-au niveau des différents radicaux lipidiques (activité antilipoperoxydante): les flavonoïdes (ou dérivés) peuvent également exercer une influence par réaction avec des radicaux lipidiques ( $R^{\cdot}$ ,  $RO^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$ ). La quercétine et la rutine possèdent à des degrés d'efficacité différents (le premier, beaucoup plus efficace que le second) une activité antilipoperoxydante tandis que le kaempférol et plus particulièrement l'héspéridine sont des prolipoperoxydants (Pincemail *et al.*, 1990).

-au niveau de l' $O_2$  (activité antioxydante): une réaction directe avec  $O_2$  est également envisageable, protégeant ainsi le substrat contre les oxydations. La rutine et la quercétine ont été décrites comme substances antioxydantes, le kaempférol n'aurait pas d'effet et l'héspéridine serait une substance prooxydante (Pincemail *et al.*, 1990).

-au niveau des métaux de transition (activité de chélation) : une autre manière d'agir consisterait en la chélation des métaux de transition (Fe, Cu...) qui, fixés, ne permettraient plus l'initiation de la réaction radicalaire. Cette activité a été mise en évidence pour les quercétine, rutine, héspéridine et kaempférol, l'efficacité décroissant du premier cité au dernier (Pincemail *et al.*, 1990).

Comme nous venons de l'examiner, les flavonoïdes possèdent donc plusieurs niveaux d'action, ils peuvent cumuler les effets de protection à différents niveaux (ex. la quercétine), être actifs à un niveau et sans effet ou néfaste à d'autres niveaux (ex. le kaempférol). Les résultats de nos expériences sont généralement en accord avec les données de la littérature. Seules la myricétine et la troxérutine, substances décrites comme inhibitrices de la xanthine oxydase, se sont pourtant révélées totalement inefficaces dans la protection des

lysosomes contre les radicaux libres produits par le système xanthine/xanthine oxydase Fe/ADP(*cf tableau 3*).

L'inefficacité de l'hespéridine (*cf tableau 3 et 4*) s'expliquerait par le fait que, bien que possédant une action "scavenger de OH" et dans une moindre mesure une activité de chélation, cette substance est prolipoperoxydante et prooxydante.

L'efficacité du kaempférol (*cf tableau 3 et 4*) peut s'expliquer également de la sorte, ce dernier, bien que prolipoperoxydant, possède des activités antiradicalaires et de chélation.

#### I.2.2.2. RELATION STRUCTURE-FONCTION

Nous allons tenter de mettre en relation la fonction de protection présentée et la structure de la substance. Il ne faut pas perdre de vue qu'il existe plusieurs mécanismes d'action et qu'une substance peut avoir un effet bénéfique, néfaste ou nul selon le mécanisme considéré. De ce fait, il n'existe probablement pas une mais des structures responsables de la protection.

Les substances utilisées sont réparties en 3 groupes: flavonoïdes, flavanoïdes et proanthocyanidine. Les seules variations de structure qui s'opèrent lorsque l'on passe d'un groupe à l'autre se situent au niveau de la double liaison dans le noyau C et au niveau du groupe cétone en position 4. Nous découvrons des substances actives dans les 3 groupes et en déduisons que ni la double liaison dans le noyau C, ni le groupe cétone en position 4 ne jouent un rôle capital dans la fonction de protection.

L'inactivité des flavone, flavanone et des monohydroxylés nous montre l'importance de la présence d'au moins 2 groupements hydroxyles.

La comparaison 7,8-dihydroxyflavone-myricétine semble indiquer que le degré d'hydroxylation du noyau B n'a pas une influence fondamentale sur le degré d'efficacité.

La comparaison 7,8-dihydroxyflavone-chryisine et quercétine-morine permet de proposer que la disposition en ortho de groupes hydroxyles est plus efficace que la disposition en para.

La comparaison quercétine-taxifoline nous permet de découvrir que la double liaison dans le cycle C augmente l'efficacité.

La comparaison taxifoline-(d) catéchine montre que la perte du groupement cétone est favorable.

De la comparaison rutine-troxérutine, nous déduisons que le remplacement de groupes hydroxyles par des groupes éthoxy ne modifie pas l'efficacité de la substance.

Alors que la comparaison quercétine-rutine fait penser que la substitution d'un groupement hydroxyle par un groupement rutinoside influence défavorablement l'efficacité d'une substance, la comparaison rutine-diosmine fraîche nous permet d'affirmer que c'est la perte du OH en position 3 et non l'introduction du rutinoside qui est défavorable.

### I.2.2.3. RECAPITULATIF

Plusieurs arguments nous font penser que l'action des flavonoïdes (ou dérivés) s'exercerait plutôt par inhibition du réactif lésant que par action sur la membrane, quoiqu'il n'existe aucune observation qui permette d'infirmer cette seconde hypothèse.

L'inhibition du réactif lésant peut se produire à différents niveaux: ces substances seraient douées d'activité antiradicalaire, d'activité antilipoperoxydante, d'activité antioxydante et d'activité de chélation.

Les molécules efficaces présentent certaines caractéristiques structurales. Il s'agit de:

- la présence de 2 radicaux hydroxyles en position ortho
- la présence d'un radical hydroxyle en position 3
- la double liaison présente dans le cycle C
- l'absence de groupement cétone dans le cycle C

### **I.3. ETUDES COMPLEMENTAIRES**

Cette partie est consacrée à l'étude plus particulière de quelques substances. Le but de cette démarche est de tenter de cerner de manière plus précise les mécanismes d'action de ces composés.

### I.3.0. PRELIMINAIRE

1. Les valeurs supérieures à 100% et inférieures à 0%, ont été respectivement ramenées à ces valeurs maximales et minimales.

2. Dans la première partie d'expériences, les radicaux libres sont produits par les voies enzymatiques X/XO et X/XO Fe/ADP, l'activité libre s'évalue par dosage de la N-acétylglucosaminidase. Dans la seconde partie, les radicaux libres sont produits par la voie chimique acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub>, la perte de latence enzymatique et le degré de peroxydation lipidique s'évaluent respectivement par dosage de la N-acétylglucosaminidase et dosage de la malondialdéhyde.

### I.3.1. ANALYSE DES RESULTATS

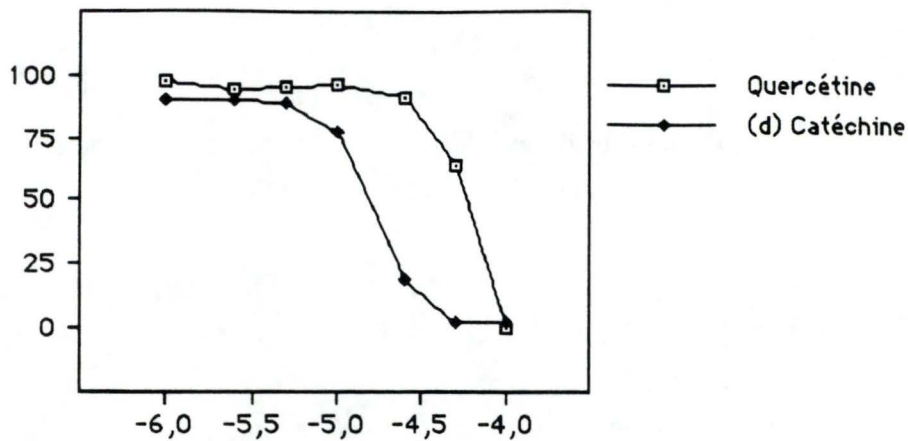
Ce chapitre est composé de 2 parties, la première intitulée "comparaison des systèmes X/XO et X/XO Fe/ADP" nous permettra de déterminer si les flavonoïdes étudiés sont aussi bien efficaces dans la protection des lysosomes en présence de l'un ou de l'autre système, la deuxième intitulée "relation perte de latence enzymatique - lipoperoxydation" permettra de distinguer si la perte de latence enzymatique est bien due à la peroxydation lipidique.

#### I.3.1.1. COMPARAISON DES SYSTEMES X/XO Fe/ADP ET X/XO

Les substances étudiées sont la quercétine (flavonoïde pentahydroxylé) et la (d) catéchine (proanthocyanidine).

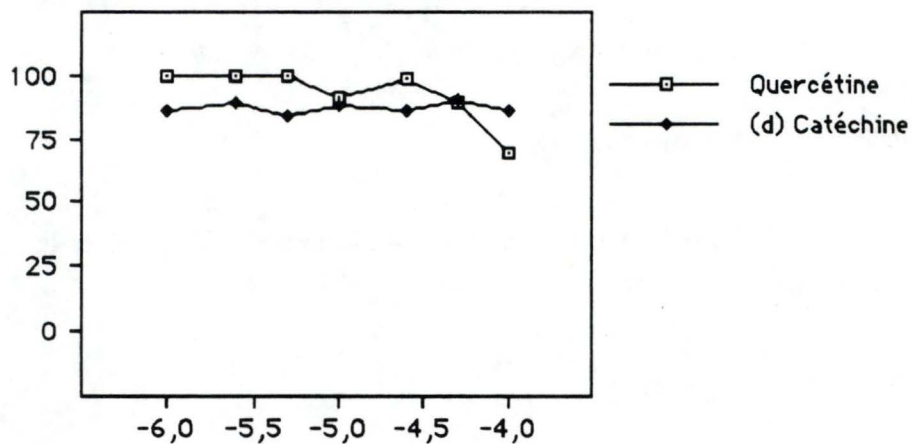
#### A. Présentation des résultats

L'examen des graphiques nous indique que les 2 substances sont actives dans un cas mais pas dans l'autre.



*FIG 35. Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO-FE/ADP et du flavonoïde hydroxylé quercétine ou de la proanthocyanidine (d) catéchine.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé  
en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



*FIG 36 Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par la voie enzymatique X/XO et du flavonoïde hydroxylé quercétine ou de la proanthocyanidine (d) catéchine.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé  
en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*

### A.1. Comparaison après un temps fixé (24 min.)

Les substances se sont révélées efficaces dans la protection des lysosomes contre les radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP (*fig 35*). Alors que la quercétine n'exerce son action de protection qu'à partir de  $10^{-4}$  M, la (d) catéchine agit déjà à une concentration de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M.

Toutes 2 se sont, par contre, montrées totalement inefficaces contre les radicaux libres produits par le système X/XO (*fig 36*).

### A.2. Comparaison dans le temps

Pour cette expérience, une concentration en substance de  $10^{-4}$  M est utilisée; celle-ci assure une protection totale contre les radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP aussi bien dans le cas de la quercétine que de la (d) catéchine.

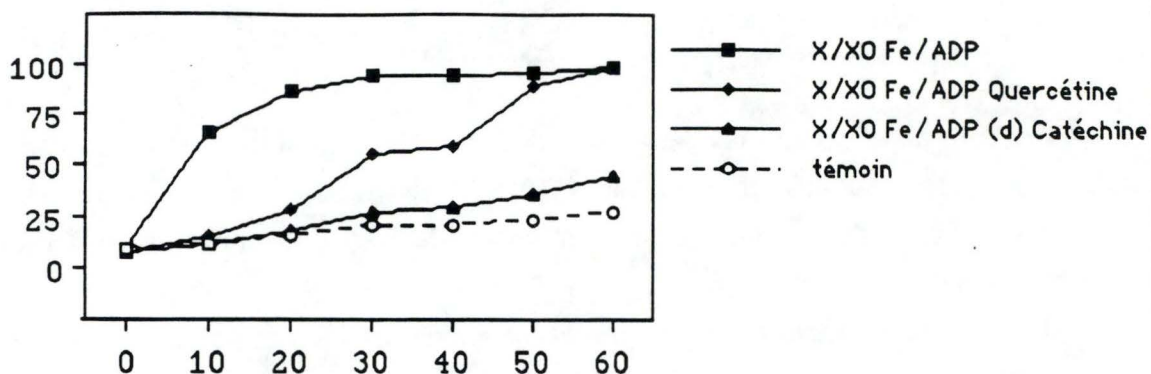
Les résultats concordent avec ceux obtenus dans l'expérience précédente, à savoir que si la quercétine et la (d) catéchine se sont révélés efficaces dans la protection des lysosomes contre les radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP (*fig 37*), ni l'un, ni l'autre ne sont d'une efficacité quelconque dans la protection des lysosomes contre les radicaux libres produits par le système X/XO (*fig 38*).

De manière plus détaillée, nous remarquons que l'activité libre du contrôle (X/XO Fe/ADP) augmente très rapidement (80% après 20 min.), nous constatons également que la (d) catéchine est d'une efficacité beaucoup plus grande que la quercétine ; après 60 min. d'incubation en présence de radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP, l'activité libre du test contenant la (d) catéchine est proche de l'activité libre du témoin, par contre l'activité libre du test contenant la quercétine se superpose à l'activité libre du contrôle (X/XO Fe/ADP).

Le système X/XO est beaucoup moins lésant que lorsque l'on y ajoute du Fe/ADP (l'activité libre du contrôle n'est que de 40% après 20 min.), par contre sa "toxicité" n'est nullement neutralisée ni par la quercétine, ni par la (d) catéchine.

### B. Constatation

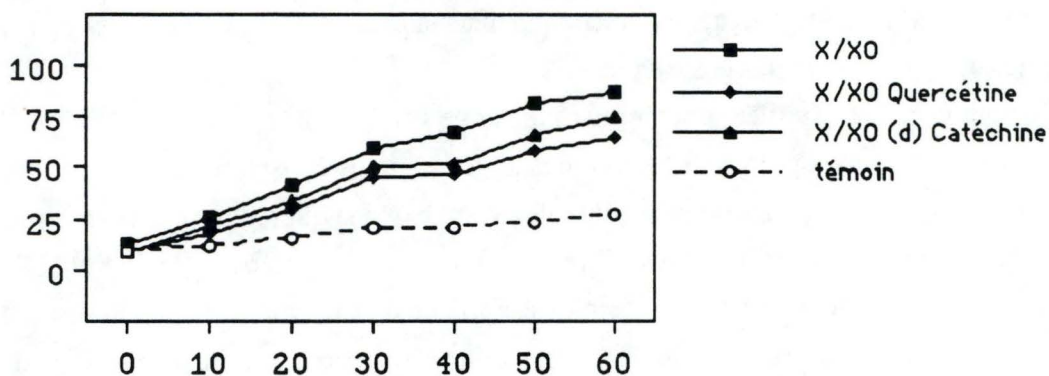
La (d) catéchine et la quercétine sont inactives dans la protection des lysosomes mis en présence du système X/XO.



**FIG 37** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée pendant des temps croissants en présence de X/XO Fe/ADP, de X/XO Fe/ADP + quercétine  $10^{-4}$  M, de X/XO Fe/ADP + (d) Catéchine  $10^{-4}$  M, et en absence de X/XO Fe/ADP.*

*en abscisse: le temps d'incubation en minutes*

*en ordonnée: l'activité libre en %*



**FIG 38** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée pendant des temps croissants en présence de X/XO, de X/XO + quercétine  $10^{-4}$  M, de X/XO + (d) Catéchine  $10^{-4}$  M, et en absence de X/XO.*

*en abscisse: le temps d'incubation en minutes*

*en ordonnée: l'activité libre en %*

### I.3.1.2. RELATION PERTE DE LATENCE ENZYMATIQUE-LIPOPEROXYDATION

Les substances comparées sont : la 7-8 dihydroxyflavone (flavonoïde dihydroxylé), le kaempférol (flavonoïde tetrahydroxylé), la quercétine (flavonoïde pentahydroxylé), la myricétine (flavonoïde hexahydroxylé), la diosmétine (flavonoïde méthoxy-substitué) et la (d) catéchine (proanthocyanidine).

L'examen des graphiques nous montre que toutes les substances qui se sont révélées efficaces dans la protection des lysosomes contre les radicaux libres inhibent la peroxydation lipidique, mais s'il existe une correspondance entre la perte de la latence enzymatique et la peroxydation lipidique, celle-ci n'est cependant pas toujours parfaite.

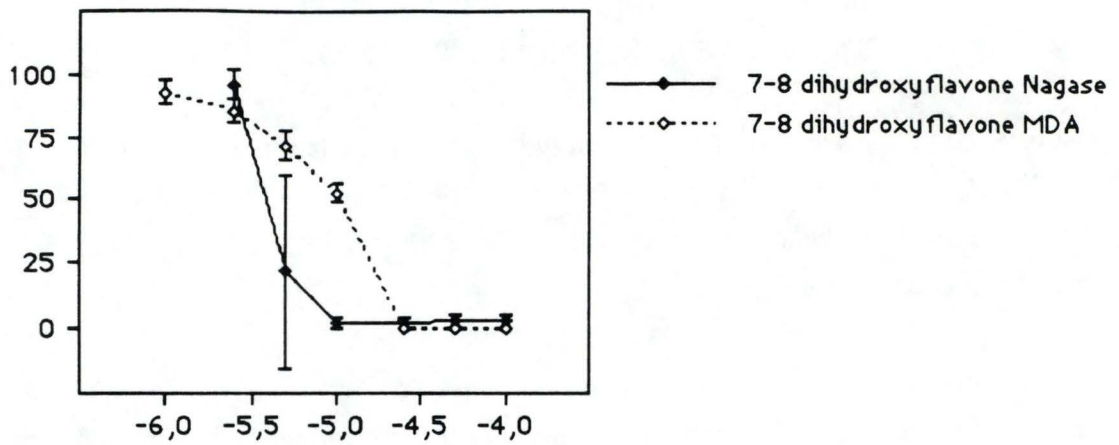
#### A. Présentation des résultats

Nous remarquons qu'il existe une correspondance parfaite entre les 2 phénomènes pour le kaempférol, la quercétine, la myricétine (*fig 40*) et la diosmétine (*fig 41*). La conservation de la latence enzymatique et l'inhibition de la peroxydation lipidique s'obtiennent à des concentrations de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  molaire pour la quercétine et de  $5 \cdot 10^{-5}$  molaire pour le kaempférol et la myricétine. La diosmétine, inefficace dans la conservation de latence enzymatique, n'inhibe pas la peroxydation lipidique.

La correspondance est beaucoup moins parfaite pour la 7,8 dihydroxyflavone (*fig 39*). Alors que la conservation de la latence enzymatique s'observe à une concentration de  $10^{-5}$  voire  $5 \cdot 10^{-6}$  molaire, l'inhibition de la peroxydation lipidique débute à  $2,5 \cdot 10^{-5}$  molaire.

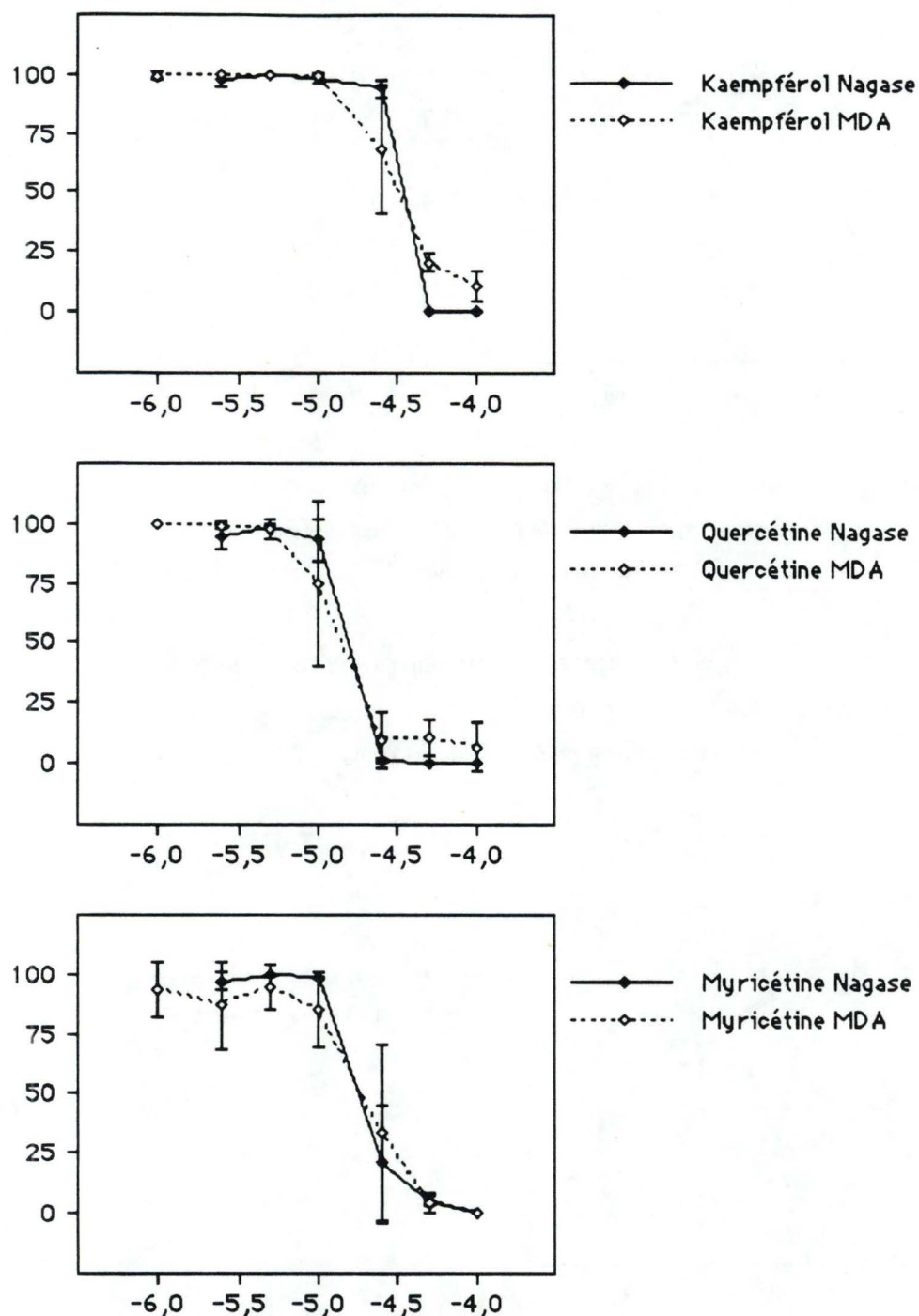
La (d) catéchine montre une absence de correspondance (*fig 42*). La latence enzymatique est préservée dès  $10^{-5}$  molaire mais l'absence de peroxydation lipidique ne s'observe qu'à une concentration de  $10^{-4}$  molaire.

Le détail des expériences est donné ci-après sous forme de graphique.



*FIG 39* Activité libre de la N-acétylglucosaminidase (Nagase) et concentration en malondialdéhyde (MDA) d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par le système Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïde hydroxylé.

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre (Nagase) en % corrigé*  
*la concentration en MDA en % corrigé*

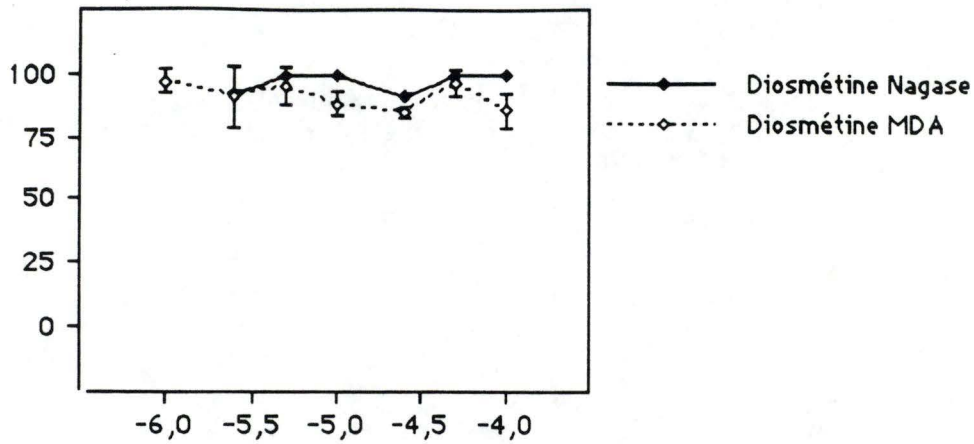


**FIG 40** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase (Nagase) et concentration en malondialdéhyde (MDA) d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par le système Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïdes hydroxylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

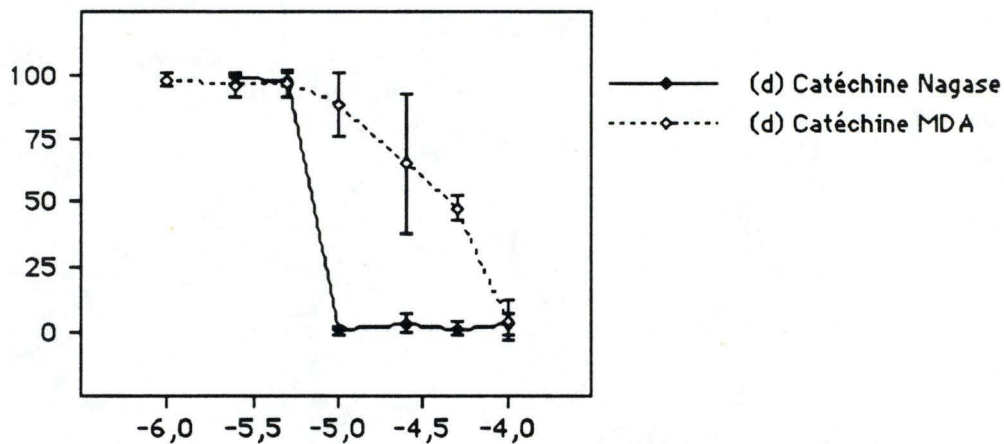
*en ordonnée: l'activité libre (Nagase) en % corrigé*

*la concentration en MDA en % corrigé*



**FIG 41** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase (Nagase) et concentration en malondialdéhyde (MDA) d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par le système Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de flavonoïde méthoxy substitué.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre (Nagase) en % corrigé*  
*la concentration en MDA en % corrigé*



**FIG 42** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase (Nagase) et concentration en malondialdéhyde (MDA) d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de radicaux libres produits par le système Acide ascorbique/FeCl<sub>2</sub> et de la proanthocyanidine (d) catéchine.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre (Nagase) en % corrigé*  
*la concentration en MDA en % corrigé*

## B. Constatation

Les flavonoïdes et leur dérivés, substances faisant partie d'une même famille, possèdent des propriétés différentes : la quercétine, par exemple, protège les lysosomes des radicaux libres en empêchant la peroxydation lipidique, la (d) catéchine, par contre, semble agir également à un autre niveau.

Ces résultats nous permettent de suspecter qu'outre l'inhibition de la peroxydation lipidique, les flavonoïdes possèdent au moins un autre niveau d'action permettant de conserver la latence enzymatique de lysosomes soumis à un "stress radicalaire".

### I.3.2. DISCUSSION

#### I.3.2.1. COMPARAISON DES SYSTEMES X/XO Fe/ADP ET X/XO

La quercétine et la (d) catéchine protègent des lysosomes mis en présence du système X/XO Fe/ADP, elles ne possèdent pas cette capacité en absence de Fe/ADP.

Une hypothèse tenant compte de la nature des radicaux libres produits peut être avancée; le système X/XO permet la formation d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la présence de Fe<sup>+++</sup> permet la formation de OH<sup>·</sup>. La ferritine présente dans le lysosome mobilisable en Fe<sup>+++</sup> (Biemond *et al.*, 1986) est une supposition aujourd'hui contestée. Nous en déduisons que seul le système X/XO Fe/ADP peut produire des OH<sup>·</sup>. Dès lors, la quercétine et la (d) catéchine seraient de bons "scavenger" de OH<sup>·</sup> (en accord avec la littérature) mais de piètre "scavenger" de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (en désaccord avec la littérature) et/ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (absence de référence).

La comparaison "toxicité du système X/XO"-"toxicité du système X/XO Fe/ADP" confirme que les OH<sup>·</sup> sont beaucoup plus redoutables que les O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Halliwell and Gutteridge, 1984).

Toutefois, il a été remarqué que contrairement au système X/XO Fe/ADP, le système X/XO ne produit pas de MDA (résultats non montrés), il ne déstabiliserait donc pas les lysosomes par peroxydation lipidique.

Alors que la (d) catéchine n'inhibe pas la production d'acide urique (inhibition de la xanthine oxydase), la quercétine possède cette propriété. L'inefficacité de cette dernière dans la protection des lysosomes contre les radicaux libres produits par le système X/XO s'expliquerait par le fait que l'inhibition ne serait que partielle, son efficacité contre les

radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP montre qu'elle possède d'autres niveaux d'action (cf I.2.2.1. MECANISME(S) DE PROTECTION)

### I.3.2.2. RELATION PERTE DE LATENCE ENZYMATIQUE - LIPOPEROXYDATION

La (d) catéchine à certaines concentrations n'inhibe pas la peroxydation lipidique mais elle protège la membrane lysosomale, son mécanisme d'action reste à découvrir.

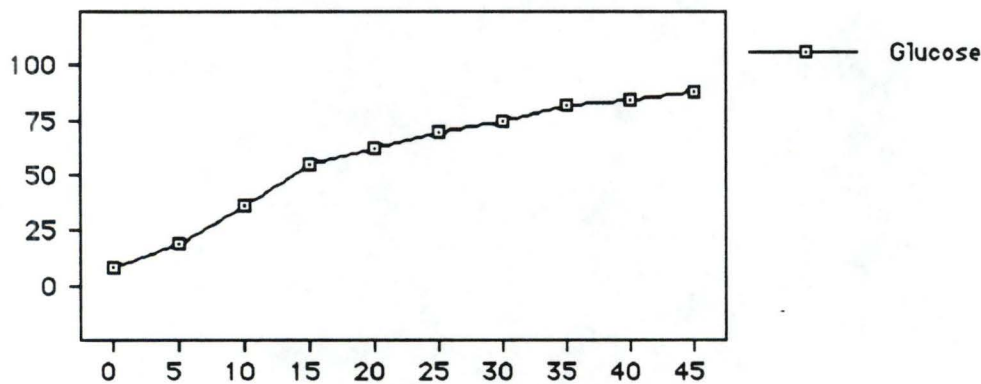
Il a été mis en évidence que les proanthocyanidines peuvent interagir spécifiquement avec des protéines (Hagerman and Butler, 1981). Une hypothèse plausible quant au mode d'action de la (d) catéchine serait que, suite au lien (d) catéchine-protéine membranaire, ces protéines membranaires se montrent moins réactionnelles aux attaques radicalaires. Ce phénomène s'expliquerait notamment par le masquage des acides aminés sensibles.

Une seconde hypothèse fait intervenir la phospholipase A 2. L'induction de la perméabilité mitochondriale à diverses molécules et ions semble provenir d'une sensibilisation (provoquée par la peroxydation lipidique) des phospholipides membranaires à la phospholipase A 2. Cette sensibilisation conduit à l'hydrolyse des phospholipides membranaires (Erdahl *et al.*, 1991). Si un tel mécanisme existe dans le lysosome, la (d) catéchine pourrait protéger la membrane lysosomale en inhibant la phospholipase A2.

## II. INFLUENCE DES FLAVONOÏDES SUR LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE AU GLUCOSE

### II.1. ESTIMATION DU POUVOIR LESANT

L'incubation d'une préparation lysosomale dans une solution isotonique en glucose (0,25 M) provoque la disparition du phénomène de latence enzymatique : le glucose, molécule perméante, conjugue son pouvoir osmotique à celui du contenu lysosomal et entraîne une hypertonicité de ce compartiment vis à vis du milieu extérieur. L'appel d'eau en résultant crée un gonflement conduisant à la rupture de l'organite comme l'illustre la *fig 43*, rendant compte de l'augmentation d'activité libre en N-acétylglucosaminidase en fonction du temps d'une fraction lysosomale incubée en présence de glucose.



*FIG 43* Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée pendant des temps croissants en présence de glucose (molécule perméante).

*en abscisse: le temps d'incubation en minutes*

*en ordonnée: l'activité libre en %*

### II.2. ETUDE DES FLAVONOÏDES ET DERIVES

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'effet des flavonoïdes et de leurs dérivés sur des lysosomes soumis à un stress osmotique induit par la pénétration du glucose dans ces organites.

## II.2.0. PRELIMINAIRE

1. Les valeurs supérieures à 100% et inférieures à 0%, ont été respectivement ramenées à ces valeurs maximales et minimales.

2. Les activités libres et totales s'évaluent par dosage de la N-acétylglucosaminidase.

3. Les expériences ont été réalisées en utilisant des temps d'incubation de 15 et de 25 minutes, les résultats étant concordants, seuls les temps d'incubation de 15 minutes sont représentés.

4. Ce chapitre comprend quelques expressions définies comme précédemment, celles-ci permettent les comparaisons nécessaires à l'élaboration de conclusions. Nous parlons **d'une protection totale** lorsque l'activité libre, exprimée en % corrigé, est proche de 0%, **d'une protection partielle** lorsque celle-ci ne dépasse pas 25% et **d'une protection relative** si elle est supérieure à 25%.

**La notion de produit le plus efficace** est définie comme le produit assurant une protection pratiquement totale à la concentration la plus faible possible.

## II.2.1. ANALYSE DES RESULTATS

Les produits étudiés se répartissent en 3 groupes comprenant flavonoïdes, flavanoïdes et proanthocyanidine.

L'examen des graphiques nous révèle que certaines substances contrecarrent l'effet lésant que provoque la pénétration de glucose sur la membrane lysosomale, d'autres par contre, ne possèdent pas cette propriété. On remarque également que parmi les substances actives le degré d'efficacité est différent.

Ce chapitre est composé de 2 parties, la première, intitulée "recherche d'un effet potentiel", nous permettra de sélectionner les substances efficaces, la deuxième, intitulée "détermination du degré d'efficacité", cernera le degré d'efficacité des substances actives.

Flavonoides	Flavone		Active		
		Dérivés hydroxylés	6-monohydroxyflavone	Active	
	7-monohydroxyflavone		Active		
	7,8-dihydroxyflavone		Active		
	5,7-dihydroxyflavone ou Chrysine			Inactive	
	5,7,4'-trihydroxyflavone ou Apigénine		Active		
	3,5,7-trihydroxyflavone ou Galangine			Inactive	
	3,7,3',4'-tétrahydroxyflavone ou Fisétine		Active		
	3,5,7,4'-tétrahydroxyflavone ou Kaempférol		Active		
	3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou Quercétine		Active		
	3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone ou Morine		Active		
	3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavone ou Myricétine		Active		
	Substituants méthoxy		3,5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Kaempféride		Inactive
			5,7,3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavone ou Diosmétine		Inactive
			Substituants rutinoside	3-rutinoside de quercétine ou Rutine	
		7-rutinoside de diosmétine ou Diosmine			Inactive
5-hydroxy-7,3',4'-éthoxy-3-rutinoside ou Troxérutine		Inactive			
Flavanoides	Flavanone			Inactive	
		Dérivés hydroxylés	5,7,4'-trihydroxyflavanone ou Naringénine		Inactive
	3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone ou Taxifoline			Inactive	
	Substituants rutinoside	5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone -7-rutinoside ou Hespéridine		Inactive	
Proanthocyanidine		3,5,7,3',4'-flavanpentol ou (d) Catéchine		Inactive	

*Tableau 6. Récapitulatif de l'(in)activité des flavonoïdes testés dans la protection des lysosomes contre le stress osmotique induit par la pénétration du glucose.*

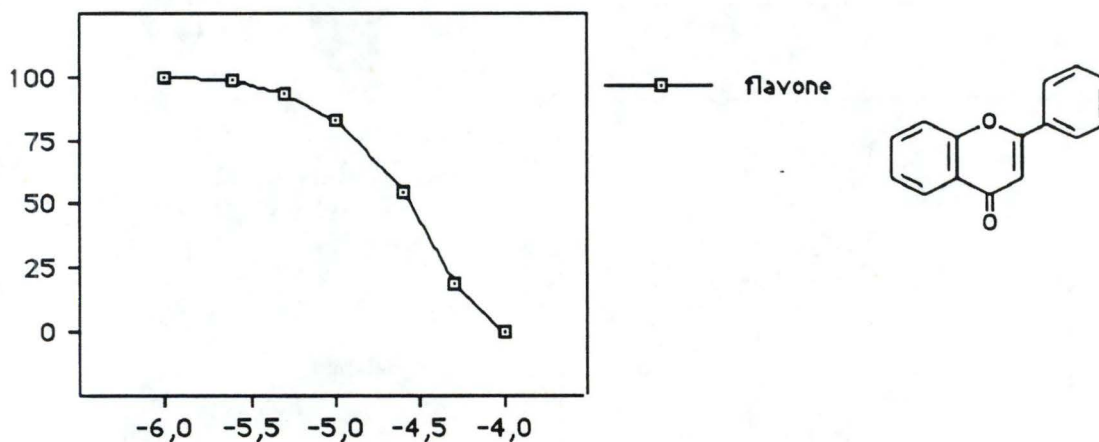
## II.2.1.1. RECHERCHE D'UN EFFET POTENTIEL

### A. Présentation des résultats

Toutes les substances actives sont des flavonoïdes, seule la galangine et dans une moindre mesure la chrysine font figures d'exceptions.

Il s'agit de la flavone, la 6-hydroxyflavone et la 7-hydroxyflavone (flavonoïdes monohydroxylés), la 7,8-dihydroxyflavone (flavonoïde dihydroxylé), l'apigénine (flavonoïde trihydroxylé), la fisétine et le kaempférol (flavonoïdes tétrahydroxylés), la quercétine et la morine (flavonoïdes pentahydroxylés) et la myricétine (flavonoïde hexahydroxylé)(fig 44, fig 45, fig 45').

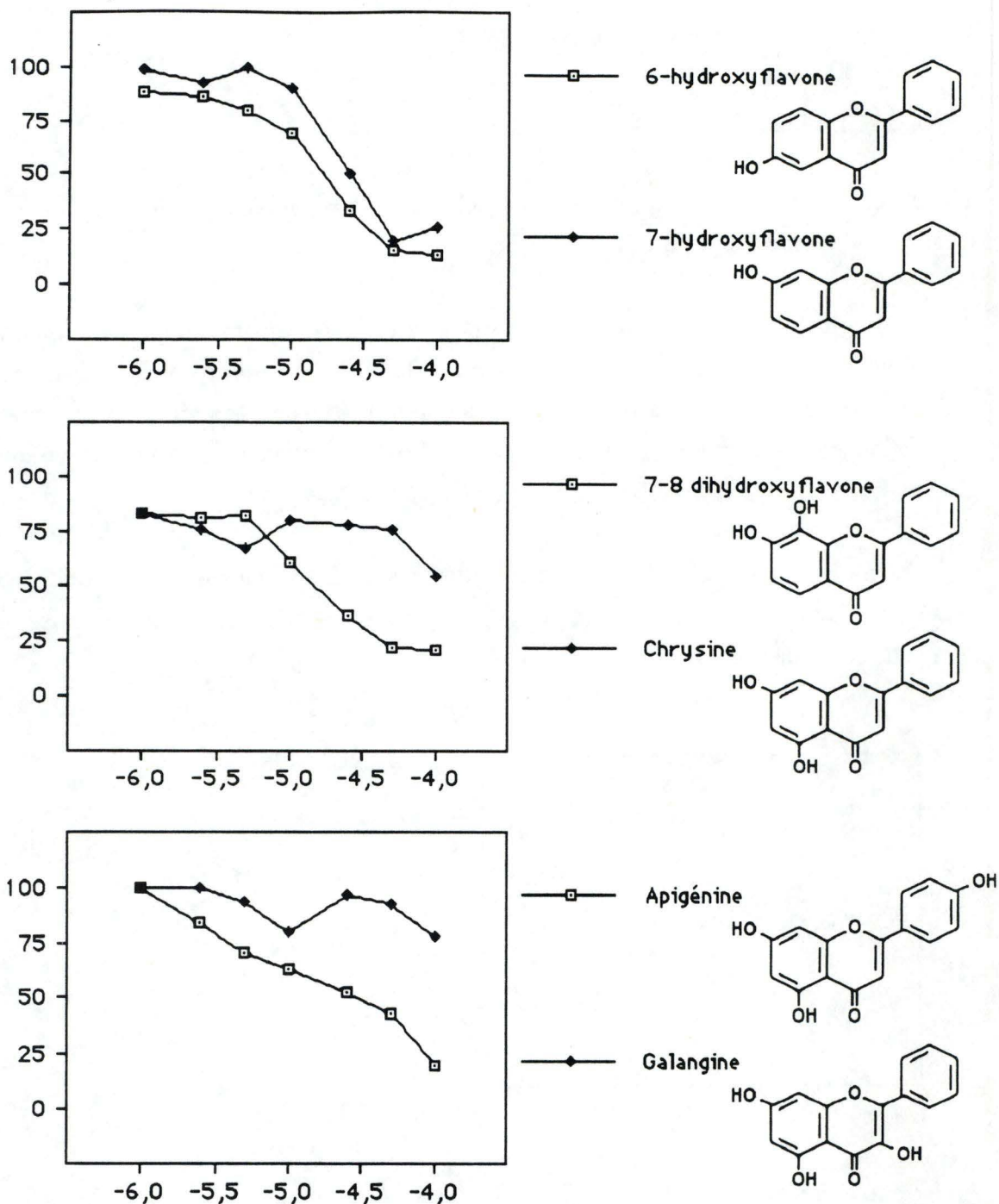
Le *tableau 6* ci-contre permet de visualiser les résultats obtenus pour la totalité des expériences réalisées. Les graphiques ci-après permettent quant à eux de visualiser les détails de ces expériences.



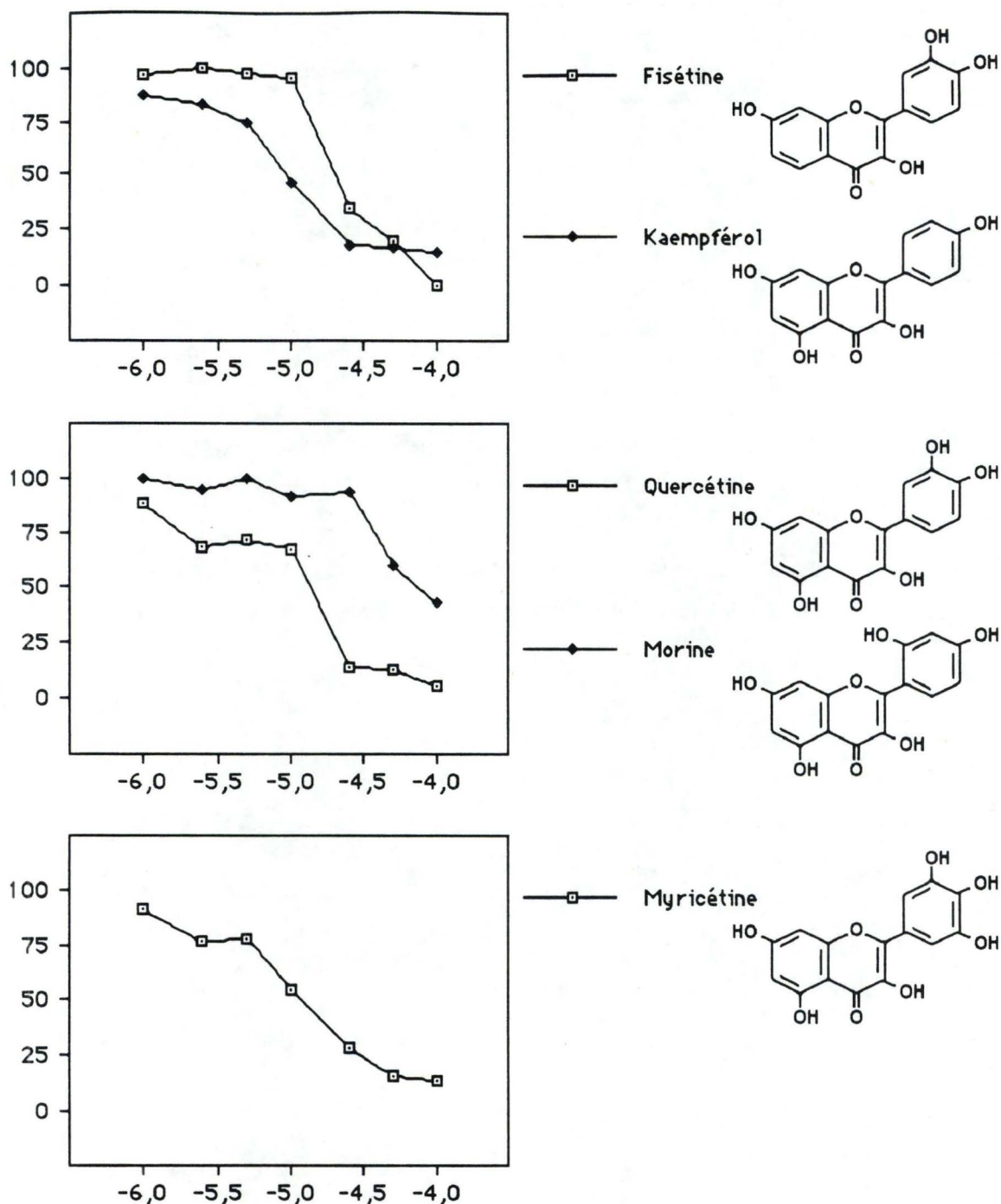
**FIG 44** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et du flavonoïde flavone.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



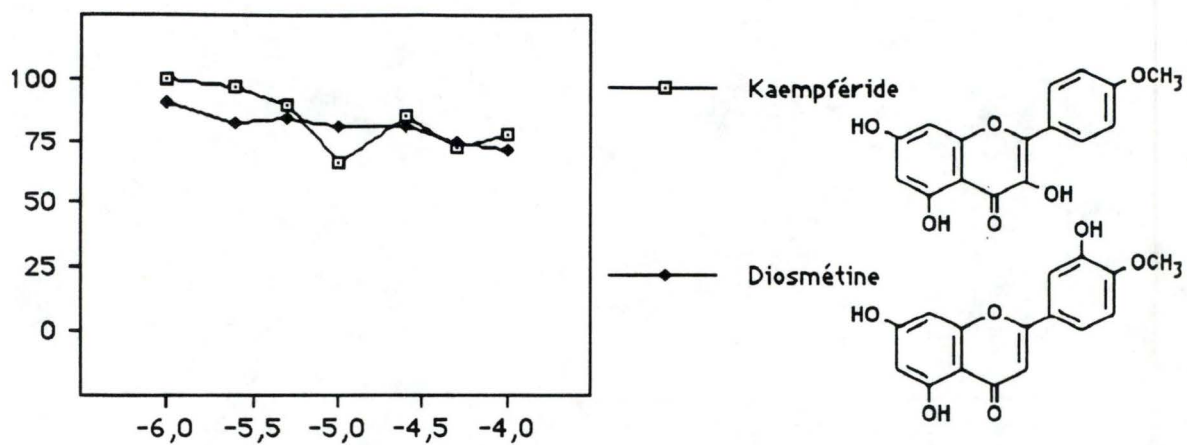
**FIG 45** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavonoïdes hydroxylés.*  
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 45'** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavonoïdes hydroxylés.*

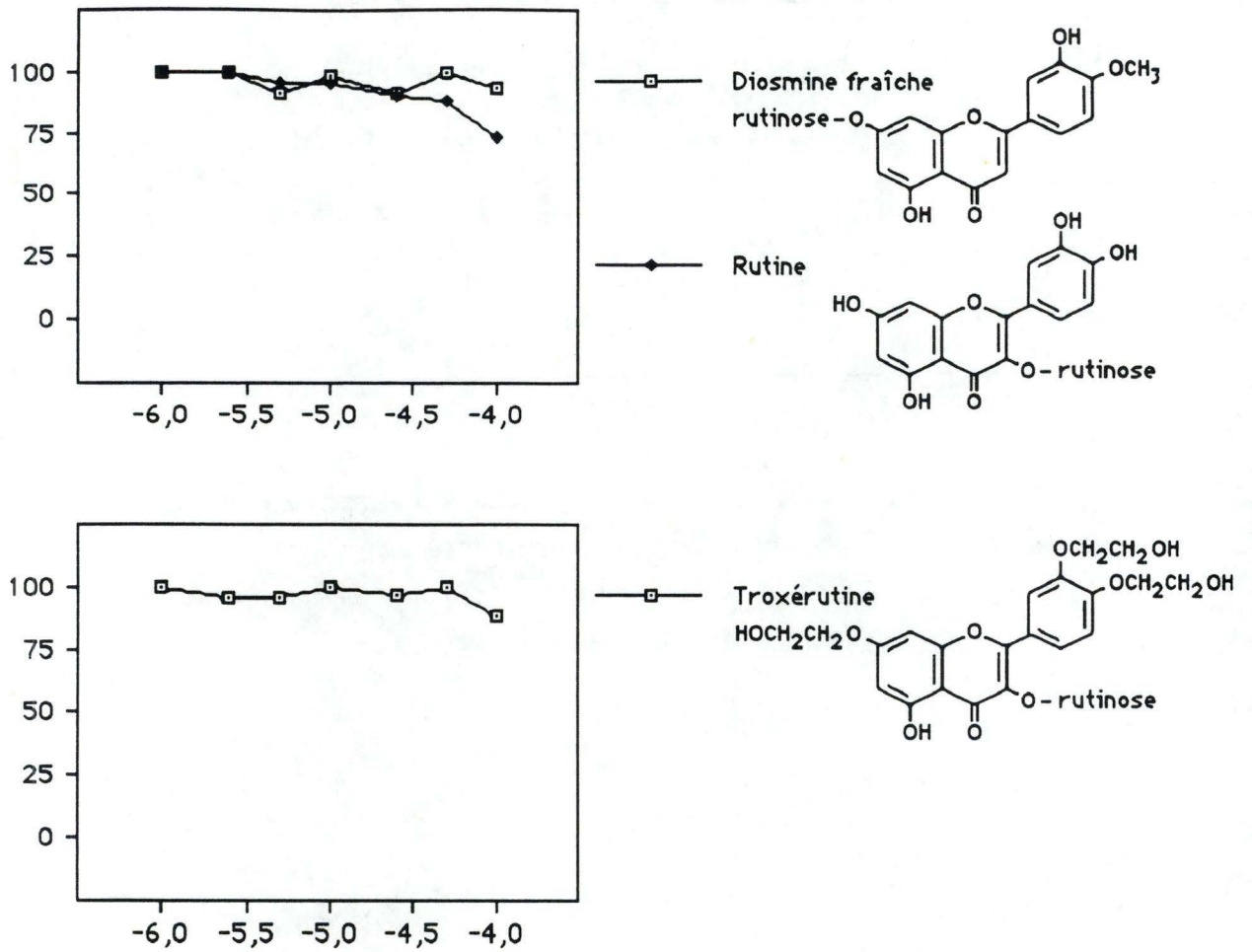
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG. 46** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavonoïdes méthoxy-substitué.*

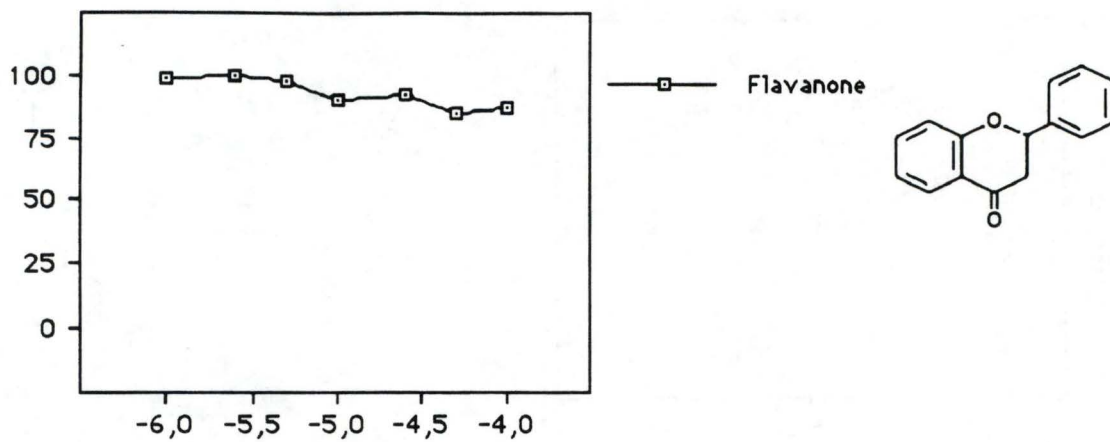
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



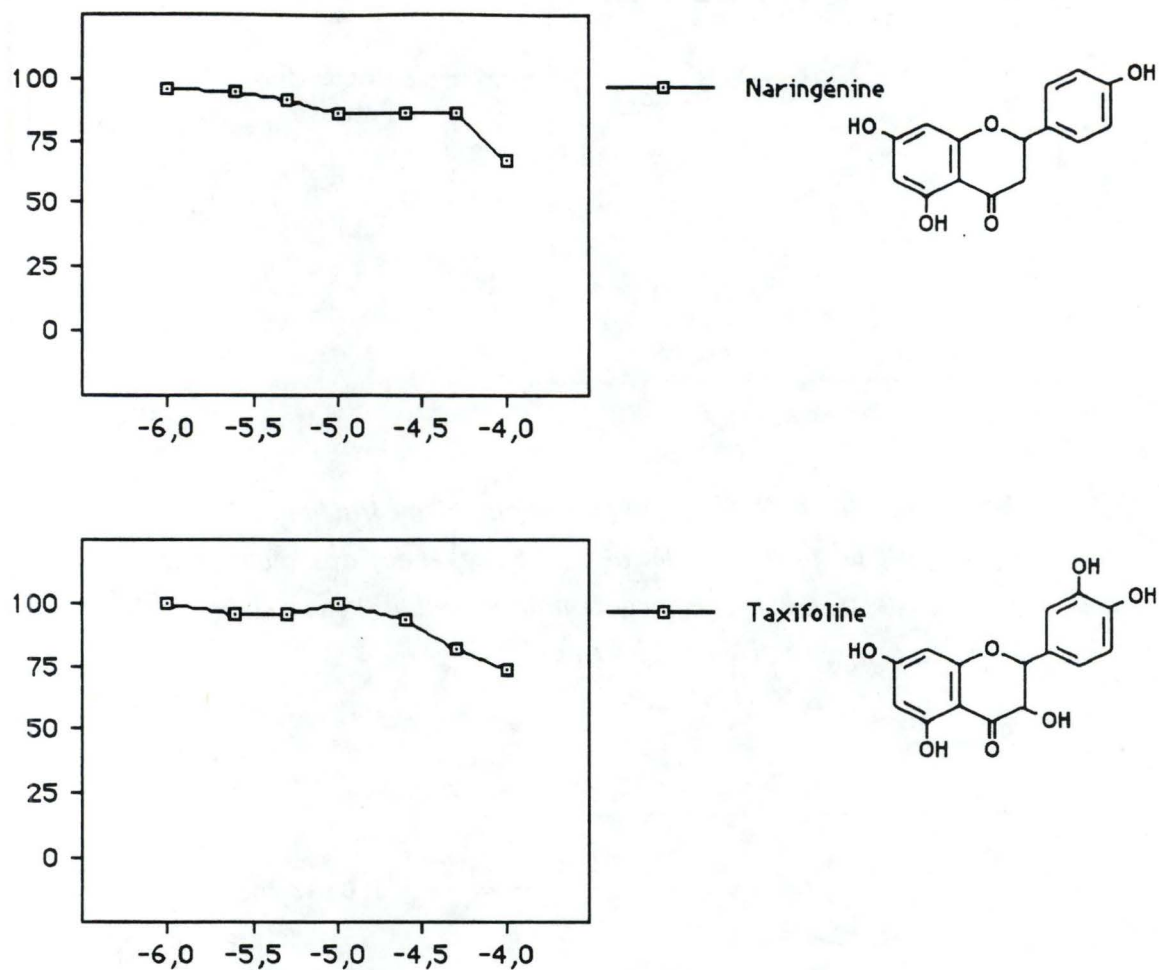
**FIG 47.** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavonoïdes rutinoglycosylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



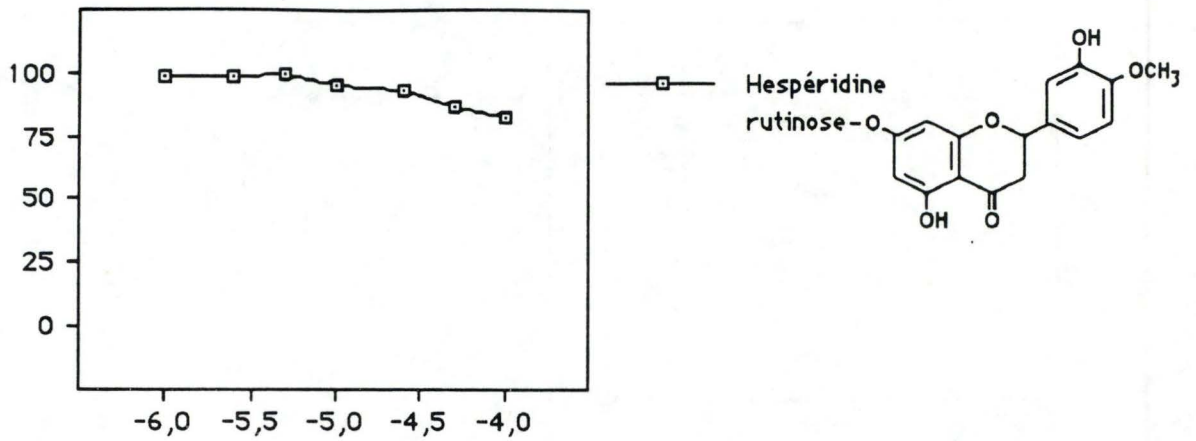
*FIG 48. Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et du flavanoïde flavanone*  
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



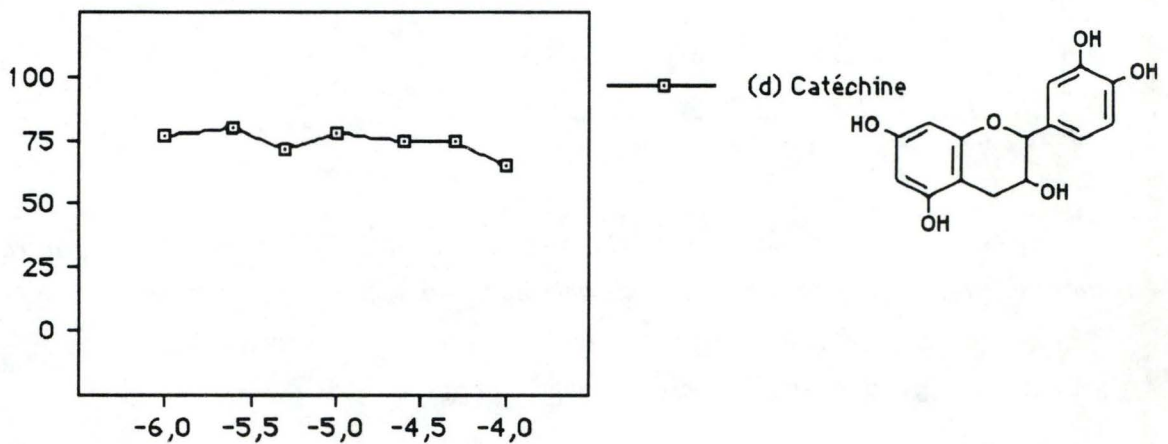
**FIG 49** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavanoïde hydroxylé.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



**FIG 50** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavanoïde rutinoglycosylé.*  
*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée : l'activité libre en % corrigé*



**FIG 51** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de la proanthocyanidine (d) catéchine.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*  
*en ordonnée : l'activité libre en % corrigé*

## B. Constatations

Les flavanoïdes et la proanthocyanidine testés sont inefficaces, la protection "osmotique" semble être propre aux flavanoïdes.

### II.2.1.2. DETERMINATION DU DEGRE D'EFFICACITE

Les produits permettant de préserver les lysosomes ont alors été étudiés de manière plus détaillée afin de déterminer la concentration à laquelle débute cette protection. Pour ce faire, tandis que dans la série d'expériences précédente un flavonoïde (ou un dérivé) était testé à différentes concentrations, ici tous les flavanoïdes (ou les dérivés) actifs seront testés à une même concentration et l'expérience sera répétée 3 fois pour permettre un calcul de moyennes.

Les produits testés sont des dérivés possédant une capacité de protection contre les attaques radicalaires. En effet, il nous a paru intéressant de rechercher les produits combinant la protection "radicalaire" et la protection "osmotique".

## A. Présentation des résultats

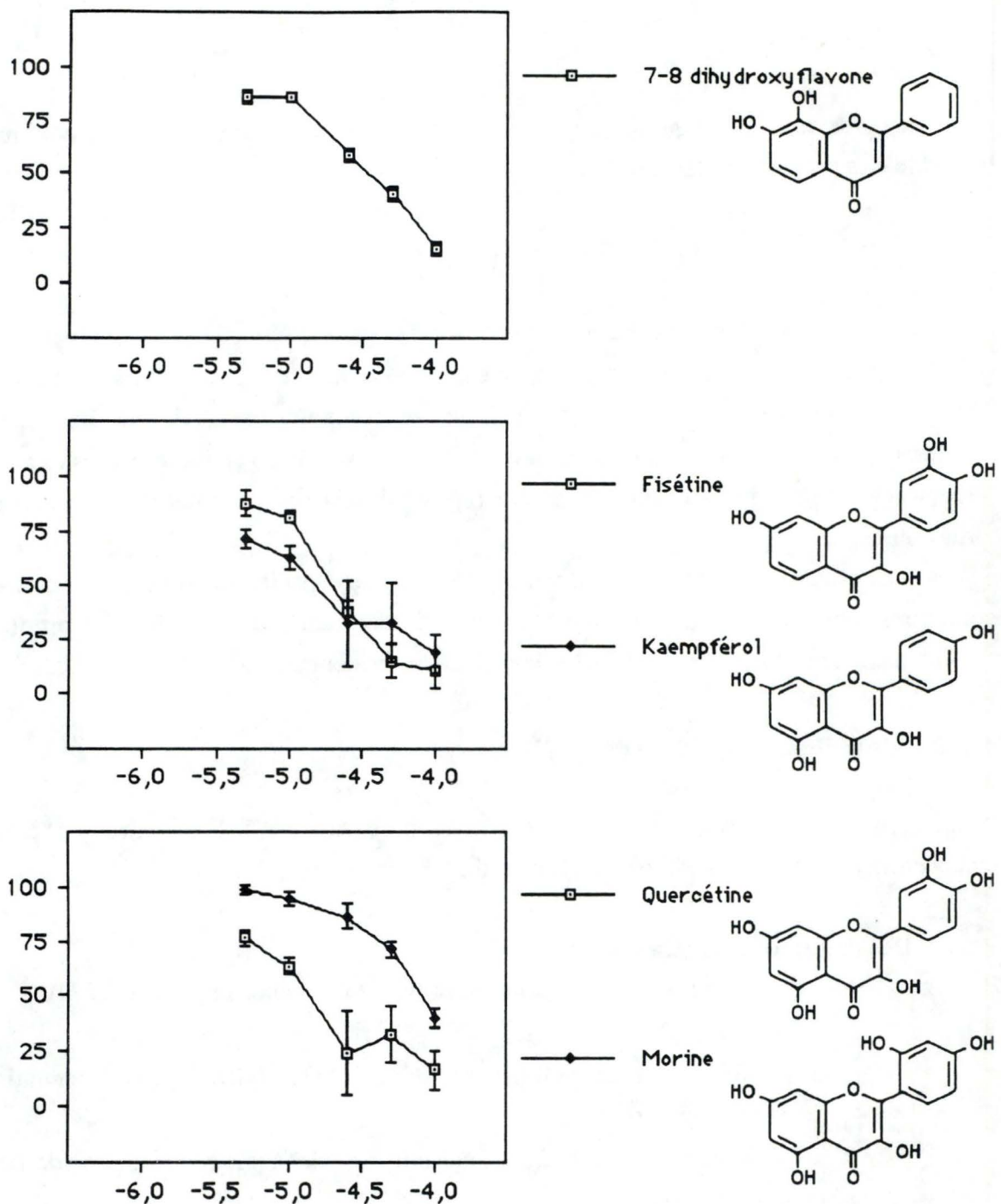
Nous remarquons directement que seule la myricétine (flavonoïde hexahydroxylé) à une concentration de  $10^{-4}$  molaire assure une protection totale (*fig 52'*).

Des protections partielles sont trouvées pour :

- la quercétine (flavonoïde pentahydroxylé) à une concentration de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  molaire (*fig 52*).
- la fisétine et le kaempférol (flavonoïdes tétrahydroxylés) à une concentration de  $5 \cdot 10^{-5}$  molaire (*fig 52*).
- la 7-8 dihydroxyflavone (flavonoïde dihydroxylé) à une concentration de  $10^{-4}$  molaire (*fig 52*).

La morine (flavonoïde pentahydroxylé) est d'efficacité relative (*fig 52*).

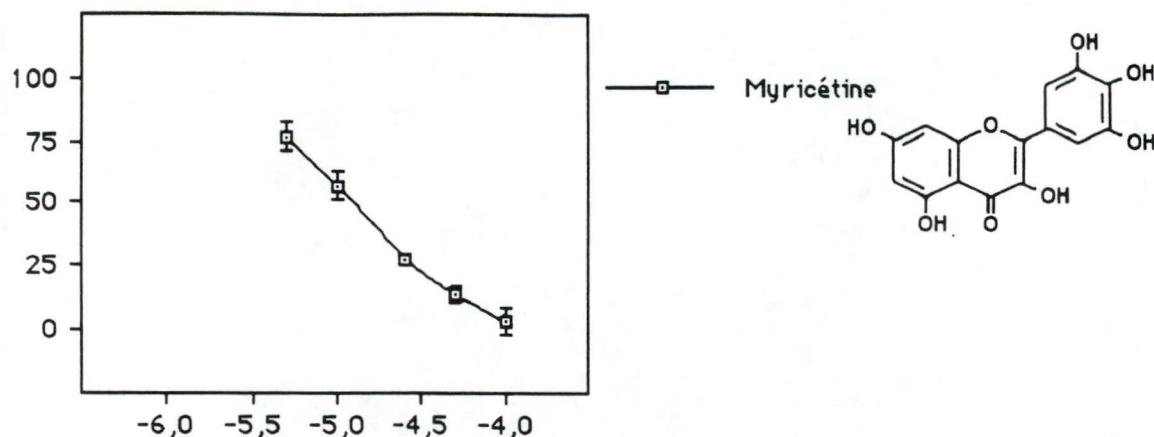
Les détails de ces expériences sont donnés ci-après sous forme de graphiques: les valeurs sont des moyennes accompagnées de leur déviation standard.



**FIG. 52** *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavonoïdes hydroxylés.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*



*FIG 52'* *Activité libre de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction L de foie de rat incubée en présence de glucose (molécule perméante) et de flavonoïde hydroxylé.*

*en abscisse: le log de la concentration (molaire) en produit testé*

*en ordonnée: l'activité libre en % corrigé*

### B. Constatation

Une seule substance assure une protection totale : la myricétine.

## II.2.2. DISCUSSION

### II.2.2.1 MECANISME(S) DE PROTECTION

Les résultats montrent que certains flavonoïdes ou dérivés protègent les lysosomes du choc osmotique provoqué par la pénétration du glucose.

Une quelconque action des flavonoïdes sur le glucose n'est pas envisageable, celle-ci se situe donc au niveau de la membrane lysosomale et pourrait s'opérer de 2 manières différentes; d'une part par diminution de la perméabilité de la membrane au glucose, d'autre part par consolidation de la membrane la rendant plus résistante au gonflement résultant de l'entrée d'eau.

Si la première hypothèse nous paraît plus plausible, aucune observation déterminante n'a permis de confirmer ou d'infirmer la seconde.

Le mécanisme d'action de ces substances dans l'interaction avec la membrane lysosomale reste à découvrir:

- action via une variation de fluidité de la bicouche (une diminution de fluidité entraîne une diminution de perméabilité)
- action via une interaction avec des sites spécifiques impliqués dans le transport (une occupation de site entraîne une diminution de la perméabilité). Cette hypothèse prône une pénétration du glucose par transporteur.

#### II.2.2.2. RELATION STRUCTURE-FONCTION

Les substances utilisées sont réparties en 3 groupes: flavonoïde, flavanoïde et proanthocyanidine. Les variations de structure qui s'opèrent lorsque l'on passe d'un groupe à l'autre se situent au niveau de la double liaison dans le noyau C et du groupe cétone en position 4.

La comparaison flavonoïdes-flavanoïdes-proanthocyanidine nous permet de penser que la double liaison présente dans le noyau C des flavonoïdes est indispensable à la fonction de protection (exception faite de la galangine et dans une moindre mesure de la chrysine).

La comparaison flavonoïdes hydroxylés-flavonoïdes substitués nous montre que l'addition de substitutions entraîne une perte d'activité.

Les substances étant d'efficacité similaire, il est difficile de tirer des conclusions en ce qui concerne les modifications structurales pouvant améliorer le degré d'efficacité. La morine semble toutefois moins efficace. Ceci s'interpréterait, par comparaison avec les autres substances actives, par une influence négative d'un dérivé hydroxyle en position 2' ou de la position para des dérivés hydroxyles dans le noyau B.

#### II.2.3.2. RECAPITULATIF

L'action des flavonoïdes (ou dérivés) s'exercerait par diminution de la perméabilité de la membrane au glucose mais l'hypothèse d'une augmentation de résistance de la membrane au gonflement n'est pas à exclure.

Les caractéristiques structurales importantes dans la protection des lysosomes contre l'activation osmotique semblent être :

- la double liaison présente dans le cycle C
- l'absence de groupement substitué

# CONCLUSIONS

1. Les flavonoïdes et leurs dérivés sont présents en grande quantité dans des extraits végétaux (extrait de *Ginkgo biloba* par exemple) possédant des effets thérapeutiques. Il est possible que ces effets soient liés au fait que ces composés protègent les membranes des organites subcellulaires, en particulier les membranes lysosomales, contre toute une série d'agressions. Les extraits végétaux sont intéressants parce qu'ils comprennent une grande variété de ces substances.

2. Les radicaux libres oxygénés provoquent un effet lésant sur les lysosomes.

Certains flavonoïdes protègent les membranes lysosomales contre les radicaux libres. Ceux-ci possèdent au moins deux OH, de préférence en position ortho, un troisième confère également une activité de protection si il est localisé dans le noyau pyrane. La présence de la double liaison et l'absence de groupe cétone dans le noyau pyrane semble également d'une certaine importance.

Les flavonoïdes peuvent agir en exerçant une activité antiradicalaire, en inhibant la peroxydation lipidique, en exerçant une activité antioxygène ou en complexant les métaux de transition. Cependant, en ce qui concerne l'effet sur les lysosomes, les observations ne sont pas toujours en accord avec de telles explications. La myricétine, par exemple, est un très bon "scavenger" de radicaux hydroxyles (Pincemail *et al.*, 1990) mais elle est inefficace dans la protection des lysosomes contre les radicaux libres produits par le système X/XO Fe/ADP. Par ailleurs, la (d) catéchine possède un effet stabilisateur sur le lysosome mis en présence de radicaux libres mais n'inhibe pas la peroxydation lipidique. Il est dès lors possible que les flavonoïdes agissent en s'opposant également à d'autres phénomènes que ceux empêchant l'oxydation de la membrane. Par exemple, la peroxydation des phospholipides membranaires peut sensibiliser ceux-ci à l'hydrolyse, les flavonoïdes pourraient exercer une action inhibitrice sur l'enzyme responsable de l'hydrolyse.

3. Le glucose, molécule perméante, provoque un effet lésant sur le lysosome.

Certains flavonoïdes inhibent l'activation osmotique induite par le glucose, ceux-ci présentent une double liaison dans le noyau pyrane et une absence de groupements substitués. Ils peuvent agir en perturbant l'état physique de la membrane lysosomale, la rendant moins perméable au glucose ou en interagissant avec des sites impliqués dans le transport du glucose.

4. Il existe des flavonoïdes qui se montrent inefficaces aussi bien contre les radicaux libres que contre le glucose (naringénine, hespéridine), d'autres qui n'exercent leur action protectrice que contre un seul de ces deux stress (flavone, flavanone efficaces contre le glucose; taxifoline, (d) catéchine efficaces contre les radicaux libres). Seulement quatre substances combinent les deux protections, il s'agit de la quercétine, de la 7,8-dihydroxyflavone, du kaempférol et de la morine, le degré d'efficacité décroissant du premier cité au dernier.

# BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WATSON, J.D. (1989)  
Molecular biology of the cell  
second edit°, 275  
eds Flammarion Medecin Sciences, New-york
- BIEMOND, P., SWAAK, J. G., BEINDORFF, C. M. AND KOSTER, J. F. (1986)  
Superoxyde-dependent and independent mechanisms of ions mobilization from  
ferritine by xanthine oxydase  
Biochem. J., 239, 169-173
- BIRD, S.J., FORSTER, S. AND LLOYD, J.B. (1987)  
Translocation of sugars into rat liver lysosomes  
Biochem. J., 245, 929-931
- BUEGE, J. A. AND AUST, S.D. (1978)  
Microsomal lipid peroxydation  
Methods in Enzymol., 52, 302-310
- BRACKE, M.E., VYNCKE, B., DE PESTEL, G., VAKAET, L., BOURGOIS, L., VAN LAREBEKE,  
N., BORTIER, H. AND MAREEL, M.M. (1990)  
Effect of flavonoids on cancer cell invasiveness  
Flavonoids in Biology & Medicine III :  
Current Issues in Flavonoid Research, 279-292
- CILLARD, J., MOREL, I., CILLARD, P., LESCOAT, G. AND GICQUEL, M. (1990)  
Flavonoids as free radical scavengers  
Flavonoids in Biology & Medicine III :  
Current Issues in Flavonoid Research, 144-160
- CLOSTRE, F.(1986)  
De l'organisme aux membranes cellulaires : les différents niveaux d'actions  
pharmacologiques de l'extrait de *Ginkgo biloba*  
Nouv. Presse Med., 15, 1529-1538
- DAEMS, W.T.H., WISSE, E., BREDEROO, P. (1969)  
Electron microscopy of the vacuolar apparatus  
Lysosomes in biology and pathology (Dingle J.T., Fell H.B. eds.), 1, 64-112  
North Holland Publishing, Amsterdam
- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R., APPELMANS, F. (1955)  
Tissue fractionation studies. 6.  
Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue  
Biochem. J., 60, 604-617
- DE DUVE, C. & WATTIAUX, R. (1966)  
Functions of lysosomes  
Ann. Rev. Physiol., 28, 435-495
- DOCHERTY, K., BRENCHELEY, G.V. AND HALES, C.N. (1979)  
Evidence for carrier-mediated facilitated diffusion  
Biochem. J. , 178, 361-366
- ERDAHL, W.L., KREBSBACH, R.J. AND PFEIFFER, D.R. (1991)  
A comparison of phospholipid degradation by oxidation and hydrolysis  
during the mitochondrial permeability transition  
Arch. Biochem. Biophys., 285, 252-260

- ETIENNE, A., HECQUE, F., CLOSTRE, F. AND DEFEUDIS, F. D. (1982)  
Comparative effects of an extract of *Ginkgo biloba* and chlorpromazine on the in vitro osmotic fragility of rat erythrocytes  
J. Pharmacol, 13, 291-298
- FISHER, A.B. (1988)  
Intracellular production of oxygen-derived free radicals  
Oxygen radicals and tissue injury  
Proc of an Upjohn Symposium/ Oxygen Rad.  
Allen Press, Kansas (Ed. Halliwell), 34-39
- FORSTER, S. AND LLOYD, J.B. (1988)  
Solute translocation across the mammalian lysosome membrane  
Biochim. Biophys. Acta , 947, 465-491
- FREEMAN, B.A. AND CRAPO, J.D. (1982)  
Free radicals and tissue injury  
Lab. Invest., 47, 412-426
- HAGERMAN, A.E. AND BUTLER, L.G. (1981)  
The specificity of proanthocyanidin-protein interactions  
J. Biol. Chem., 256, 4494-4497
- HALES, C.N. DOCHERTY, K. AND MAGUIRE, G.A. (1984)  
Lysosomes in Biology and pathology  
Dingle, J.T. Dean, R.T. and Sly, W., Eds., 7, 165-174, Elsevier, Amsterdam
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (1984)  
Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease  
Biochem. J., 219, 1-13
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (1985)  
Free radicals in Biology and medicine, edited by Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.,  
Clarendon Press Oxford
- HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (1986)  
Iron and free radical reactions : two aspects of antioxidant protection  
Trends Biochem. Sci, 11, 372-375
- HOSOKAWA, N., HIRAYOSHI, K., NAKAI, A., HOSOKAWA, Y., MARUI, N., YOSHIDA, M., SAKAI, T., NISHINO, H., AOIKE, A., KAWAI, K. AND NAGATA, K. (1990)  
Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins  
Cell Structure and Function, 15, 393-401
- JADOT, M., COLMANT, C., WATTIAUX-DE CONINCK, S. AND WATTIAUX, R. (1984)  
Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2 naphthylamide  
Biochem. J., 219, 965-970
- JADOT, M., WATTIAUX-DE CONINCK, S. AND WATTIAUX R. (1989)  
Effect of diethylstilbestrol on the osmotic activation of lysosomes induced by glucose  
Biochem. J., 262, 981-984
- KURIKI, Y. AND RACKER, E. (1976)  
Inhibition of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) adenosine triphosphate and its partial reaction by quercetin  
Biochemistry, 15, 4951-4955

- MAGUIRE, G.A., KAY, J.D.S. AND HALES, C.N. (1988)  
Lysosomal sugar transport : facilitated or free diffusion ?  
Biochem. J. , 252, 621-623
- PINCEMAIL, J., DEBY, C., DRIEU, K., ANTON, R. AND GOUTIER, R. (1990)  
Flavonoids as "antioxydants"  
Flavonoids in Biology & Medicine III :  
Current Issues in Flavonoid Research, 161-179
- PRYOR, W.A. (1976)  
The role of free radical reactions in biological system  
Free radical in biology, 1, 240-250 edited by Pryor, W.A.,
- REIJNGOUD, D.J. AND TAGER, J.M. (1977)  
The permeability properties of the lysosomal membrane  
Biochim. Biophys. Acta, 472, 419-449
- ROBAK, J. AND GRYGLEWEKI, R.J. (1988)  
Flavonoids are scavengers of superoxide anions  
Biochem. Pharmacol., 37, 837-841
- RUBANYI, G.M. (1988)  
Vascular effect of oxygen-derived free radicals  
Free Radical. Biol. Med., 4, 107-120
- SHNEIDER, D.L., BURNSIDE, J., GORGA, F.R., NETTLETON, C.J. (1978)  
Properties of the membrane proteins of rat liver lysosomes  
Biochem. J., 176, 75-82
- SUOLINNA, E-M., BUCHSBAUM, R. N., RACKER, E. (1975)  
The effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells  
Cancer Research, 35, 1865-1872
- VAES, G. (1966)  
Subcellular localisation of glycosidases in lysosomes  
Methods enzymol., 8, 509-514
- WATTIAUX-DE CONINCK, S., THIBAUT, C., GONZE, M.M., HAMER, I. AND WATTIAUX, R. (1990)  
Effect of *Ginkgo biloba* extract on lysosomes  
Flavonoids in Biology & Medicine III :  
Current Issues in Flavonoid Research, 597-602