



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF

# MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences  
Département de Biologie  
Pour l'obtention du diplôme de

## MAGISTERE

Option : Valorisation des ressources végétales

Par

**BOUCHEKRIT Moufida**

Thème

Etude de l'effet de  
quelques pesticides et flavonoïdes sur la respiration de la  
levure *Saccharomyces cerevisiae*

Soutenu le:

Devant le jury

Président	<b>M. Bounechada</b>	MC	UFAS.
Rapporteur	<b>B. Houcher</b>	MC	UFAS.
Examineurs	<b>A. Bouzidi</b>	MC	UFAS.
	<b>M. Hafsi</b>	MC	UFAS.

2009-2010



*Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant qui m'a donné la force et la patience afin de réaliser ce modeste travail, au terme duquel, il m'est un agréable devoir de formuler mes vifs remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ma formation tant morale qu'intellectuelle.*

*Je voudrais adresser mes sincères remerciements et ma gratitude la plus profonde à tous ceux qui ont aidé à réaliser ce travail. Parmi eux je remercie vivement mon encadreur Monsieur **Dr. B.Houcher** que vraiment je ne trouve pas l'expression idéale de lui traduire ma reconnaissance, je pourrai cordialement lui exprimé mes profondes remerciements.*

*J'adresse mes vifs remerciements au **Dr. M. Bounechada** qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur **Dr. M. Hafsi** ainsi que Monsieur **Dr A.W.Bouzidi** d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Merci à tous*



*Un merci du fond du cœur à ma famille qui est toujours à mes côtés, je remercie tout particulièrement, **mes parents** pour l'amour qu'ils m'ont porté et le goût de l'effort qu'ils m'ont transmis, **mes sœurs** et **mon frère** qui suivent mon travail de près avec affection et respect et qui m'encouragent à continuer et de terminer mon travail pendant les moments difficiles.*

*Un merci spécial pour Monsieur **Farid**, mes collègues et mes ami(e)s à l'université qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon, à la progression de mon travail, merci à **A.Gendouse** pour son soutien, J'ai vraiment de la chance d'être aussi bien entourée, merci **Dounia** et merci **Nano**.*

*Enfin, que tous ceux qui ont contribué à ma formation morale et scientifique et dont les noms ne figurent pas ici, trouvent à travers ce travail l'expression de ma profonde gratitude.*

*Et en fin, je dédie ce travail à mon ange, à ce qui me donne une valeur de ma vie, à ce qui m'encourage de continuer, **Iyed**.*

*Merci à tous*

*MOUFIDA*



## Résumé

La respiration cellulaire dépend d'un certain nombre de facteurs: métabolisme intense d'un substrat, chaîne respiratoire fonctionnelle, etc. Les processus métaboliques comprenant un échange gazeux peuvent être mesurés manométriquement par la méthode de Warburg. Pour tester l'influence de ces facteurs, la consommation d'oxygène par la levure *S.cereviciae* sera mesurée en présence et en absence du glucose (glc) et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire.

La comparaison des consommations d'oxygène en présence et en absence du glc, montre une différence significative ( $P < 0,01$ ), donc on peut conclure que le glucose stimule la consommation d' $O_2$  par les levures. Nous avons noté que le KCN (0.5mM) inhibe fortement la consommation d' $O_2$  par la suspension de levure; que ce soit dans le milieu phosphate balance salt (PBS) ou PBS-glucose (5%) (96.9% et 90.1%,  $p < 0.01$ ), et également on observe cette inhibition en présence du roténone (5mM) dans le milieu PBS et PBS-glc (5%) (86.46%, 83.82%), alors que l'inhibition en présence de  $NaN_3$  (1mM) dans le milieu PBS et PBS-glc (5%) est à: 65.61% et 73.44% respectivement, en présence des pesticides on a observé une inhibition de la consommation d' $O_2$  dans le milieu PBS et PBS-glc (5 %) pour une période d'incubation de 60 minutes à 25°C en présence de 2,4-D (5mM) (93.54% et 94.43% ,  $p < 0.01$ ), et de  $\delta$ -HCH (5mM) (91.3% et 92.81%,  $P < 0.01$ ), par contre on a observé une stimulation de la consommation d' $O_2$  en présence du paraquat (5mM) (16.94%) dans le milieu PBS. On a noté aussi que les flavonoïdes ont un effet inhibiteur sur la consommation d' $O_2$ , dont en présence de la quercétine dans le milieu PBS et PBS-glc (5%) le taux d'inhibition est égale à 89.31% et 86.71% respectivement ( $P < 0.01$ ). Alors que ce taux est égal à 89.42% et 91.72% en présence de la rutine ( $P < 0.01$ ). Le taux du phosphate ( $P_i$ ) dans la suspension de la levure en présence de 2,4-D (5mM) et azide de sodium (1mM) montre une différence très significative en présence du 2,4-D (5mM) ( $P < 0.001$ ).

**Mots clés:** *Saccharomyces cereviciae*; *Respiration*; *Flavonoïdes*; *Inhibiteurs*; *Pesticides*



## Abstract

Cellular respiration depends on a certain number of factors: intense metabolism of a substrate, functional chains respiratory, etc. The metabolic processes including a gaseous exchange can be measured by the manometric method of Warburg. To test the influence of these factors, the oxygen uptake by *Saccharomyces cereviciae* yeast will be measured in the absence and the presence of glucose and inhibitors of the respiratory chain.

The comparison of the oxygen uptakes in the absence and in the presence of glucose, shows a significant difference ( $p < 0.01$ ), therefore one can conclude that glucose supports the oxygen uptake by yeast. We noted that the KCN (0.5mM) inhibits strongly the oxygen uptake by the yeast suspension, that's in the phosphate balance salt (PBS) medium or in the PBS-glucose (5%) medium for 60 minutes of incubation at 25°C (96.93 vs. 90.14%;  $p < 0.01$ ), and also we observed this inhibition in the presence of roténone (5mM) in PBS medium and PBS-glc (5%) (86.46%, 83.82%), so that the inhibition in the presence of  $\text{NaN}_3$  (1mM) in the medium PBS and PBS-glc (5%) was 65.61% and 73.44%, respectively. In the presence of pesticides was observed an inhibition of  $\text{O}_2$  consumption in the medium PBS and PBS-glc (5%) for an incubation period of 60 minutes at 25°C in the presence of 2,4-D (5mM) (93.54% and 94.43%,  $p < 0.01$ ), and  $\delta$ -HCH (5mM), (91.3% and 92.81%,  $p < 0.01$ ). contrarily, we have observed a stimulation of the oxygen uptake (29.9%;  $p < 0.05$ ) in the presence of the paraquat (5mM), for 60 minutes of incubation at 25°C in PBS medium. It was also noted that flavonoids have an inhibitory effect on  $\text{O}_2$  consumption, which in the presence of quercetin in the PBS medium and PBS-glc (5%) the rate of inhibition is equal to 89.31% and 86.71% respectively ( $p < 0.01$ ) while this rate is equal to 89.42% and 91.72% in the presence of rutin ( $P < 0.01$ ). The rate of phosphate ( $\text{P}_i$ ) in the suspension yeast in the presence of 2,4-D (5mM) and sodium azide (1mM) showed a highly significant difference in the presence of 2,4-D (5mM) ( $P < 0.001$ ).

**Key words:** *Saccharomyces cereviciae*; Respiration; Flavonoids; Inhibitors; Pesticides

## الملخص:

يتعلق التنفس الخلوي بعدد من العوامل منها: هدم المواد, سلسلة تنفسية وظيفية... الخ , سيرورة هذا الهدم تظم تبادل في الغازات و التي يمكن قياسها بواسطة طريقة Worburg , لاختبار تأثير هذه العوامل يتم قياس كمية  $O_2$  المستهلكة من طرف خميرة الجعة في غياب و وجود سكر الجلوكوز و مثبطات للسلسلة التنفسية .

مقارنة استهلاك الأوكسجين في وجود وغياب سكر الجلوكوز أثبت وجود فرق معنوي , إذن يمكن الاستنتاج أن الجلوكوز يحفز عملية استهلاك الأوكسجين من طرف الخميرة .

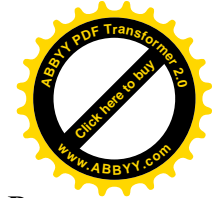
في دراستنا هذه وجدنا أن KCN (0.5 ملي مولار) يوقف وبشدة استهلاك الأوكسجين من طرف الخميرة أيا كان الوسط PBS أو PBS-glc (5%) (96,9% و 90,1% ,  $P > 0.01$ ) وكذلك في وجود Roténone (0.5 ملي مولار) (86,46% , 83,82%) , أما الشيط في وجود  $NaN_3$  (1ملي مولار) فهو وفي الوسطين PBS و PBS-glc (5%) 65,61% و 73,44% , كما نلاحظ كذلك تناقص في كمية  $O_2$  المستعملة من طرف الخميرة في وسط حضن PBS أو-PBS-glc لمدة 60 دقيقة في  $25^\circ$  م عند وجود 2,4-D (5 ملي مولار) (93,54% و 94,43% ,  $P > 0.01$ ) و  $\delta$ -HCH (5 ملي مولار) (91,5% و 92,81%) , وفي المقابل نلاحظ تحفيز لاستهلاك  $O_2$  في وجود Paraquate (4% 16,9%) في وسط PBS كما تلاحظ انخفاض في كمية  $O_2$  المستهلكة حيث انه عند وجود Quercetine في وسط PBS-glc أو PBS تقدر نسبة الشيط ب: 86,71% و 89,3% على التوالي , بينما تقدر هذه النسبة ب: 89,42% و 91,72% عند وجود Rutine ( $P > 0.01$ ).

نسبة الفوسفات (Pi) في معلق الخميرة عند وجود 2,4-D و  $NaN_3$  اثبت وجود فرق معنوي عند وجود 2,4-D (5ملي مولار) ( $P > 0.01$ ).

**الكلمات المفتاحية:** خميرة , تنفس , مثبطات , مبيدات , فلافونويدات



<b>Tableaux</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 01:</b> Classification des levures dans les Eumycètes .....	04
<b>Tableau 02:</b> Exemple d'une feuille de résultats et de correction de $h$ lue par référence au Thermobaromètre .....	39
<b>Tableau 03:</b> tableau de dilution de la gamme étalon du phosphate .....	40
<b>Tableau 04:</b> Pourcentages d'inhibitions de la consommation d'oxygène par la suspension de levure en présence et en l'absence du glucose (5%) pour une période d'incubation de 60 minutes.....	47

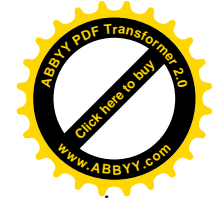


<b>Figures</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 01 :</b> La levure de bière <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	03
<b>Figure 02 :</b> Morphologie et principaux composants de la mitochondrie .....	10
<b>Figure 03 :</b> Les composants de la membrane interne mitochondriale .....	10
<b>Figure 04 :</b> Le schéma général de la chaîne respiratoire mitochondriale .....	12
<b>Figure 05 :</b> La NADH-Coenzyme Q oxydoréductase (complexe I) .....	14
<b>Figure 06 :</b> Cytochrome oxydase (complexe IV) .....	14
<b>Figure 07 :</b> CoQ-cyt C oxydoréductase (complexe III) .....	14
<b>Figure 08 :</b> Succinate déshydrogénase (complexe II) .....	14
<b>Figure 09 :</b> ATPase mitochondriale (complexe F <sub>0</sub> -F <sub>1</sub> ) .....	16
<b>Figure 10 :</b> les inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire .....	21
<b>Figure 11 :</b> le site d'action du cyanure (complexe IV) .....	21
<b>Figure 12 :</b> La structure de la roténone .....	23
<b>Figure 13 :</b> le site d'action de roténone .....	23
<b>Figure 14 :</b> Séquences du complexe IV et sites d'inhibitions .....	24
<b>Figure 15 :</b> La structure de paraquat .....	24
<b>Figure 16 :</b> La structure de 2,4-D .....	24
<b>Figure 17 :</b> La structure de la quercétine .....	27
<b>Figure 18 :</b> Effet de la quercétine sur la respiration mitochondriale .....	27
<b>Figure 19 :</b> La structure de la rutine .....	29
<b>Figure 20 :</b> la structure d'ATP .....	33
<b>Figure 21 :</b> le site d'action d'oligomycine .....	33
<b>Figure 22 :</b> Détail d'un manomètre de Warburg à volume constant .....	38
<b>Figure 23 :</b> Cinétique de la consommation d'oxygène par une suspension de levures en l'absence (■) et en présence du glucose 5% (▲) .....	43





<b>Figure 24 :</b> La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS en présence du KCN (5mM), de sodium azide (1mM) et de la roténone (5mM) .....	45
<b>Figure 25 :</b> La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS-glc (5%) en présence du KCN (5mM), de sodium azide (1mM) et de la roténone (5mM) .....	45
<b>Figure 26 :</b> La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS en présence de 2,4-D (5mM), du paraquate (5mM) et du $\delta$ -HCH (5mM) .....	46
<b>Figure 27 :</b> La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS-glc (5%) en présence de 2,4-D (5mM), du paraquate (5mM) et du $\delta$ -HCH (5mM) .....	46
<b>Figure 28 :</b> La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS en présence de la rutine (5mM) et de la quercetine (5mM) .....	48
<b>Figure 29 :</b> La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS-glc (5%) en présence de la rutine (5mM) et de la quercetine (5mM) .....	48
<b>Figure 30 :</b> Droite étalon du dosage du phosphate .....	49



- Tableau 01 :** Effet du KCN, de la roténone et de l'azide du sodium sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS (0.15M) à 25°C
- Tableau 02 :** Effet du KCN, de la roténone et de l'azide du sodium sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS-glucose (5%) à 25°C
- Tableau 03 :** Effet du paraquat, du  $\delta$ -HCH et de 2,4-D sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS (0.15M) à 25°C
- Tableau 04 :** Effet du paraquat, du  $\delta$ -HCH et de 2,4-D sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS-glucose (5%) à 25°C
- Tableau 05 :** Effet de la rutine et de la quercetine sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS (0.15M) à 25°C
- Tableau 06 :** Effet de la rutine et de la quercetine sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS-glucose (5%) à 25°C
- Tableau 07 :** Evaluation du phosphate inorganique en présence de 2,4-D et d'azide de sodium en milieu PBS.



<b>ADN:</b>	Acide désoxyribonucléique (DNA)
<b>ADP:</b>	Adénosine diphosphate
<b>AMP:</b>	Adénosine mono phosphate
<b>ATP:</b>	Adénosine triphosphate
<b>C.R.M.:</b>	Chaîne Respiratoire Mitochondrial
<b>DMSO:</b>	Diméthyle sulfoxyde
<b>FAD<sup>+</sup>:</b>	Flavine adénine dinucléotide oxydée
<b>FADH<sub>2</sub>:</b>	Flavine adénine dinucléotide réduite
<b>KCN:</b>	Cyanure de potassium
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</b>	Dihydrogénophosphate de potassium
<b>KOH:</b>	Hydroxyde de potassium
<b>M.E.M.:</b>	Membrane externe mitochondrial
<b>M.I.M.:</b>	Membrane Interne Mitochondrial
<b>NAD<sup>+</sup>:</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
<b>NADH<sup>+</sup>H :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduite
<b>NaN<sub>3</sub>:</b>	Azide de sodium
<b>OXPHOS:</b>	Oxydations phosphorylante
<b>PBS:</b>	Phosphate Balance Salt
<b>Pi:</b>	Phosphate inorganique
<b><i>S. cereviciae</i></b>	<i>Saccharomyces cereviciae</i>
<b>δ-HCH:</b>	δ-hexachlorocyclohexane
<b>2,4-D:</b>	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
<b>2-CPA:</b>	2-chlorophénoxyacetic acide
<b>4-CPA:</b>	4-chlorophénoxyacetic acide
<b>2, 4, 5-T:</b>	2, 4,5-trichlorophénoxyacetic acide



<b>Table des illustrations</b>	<b>Pages</b>
<b>Introduction</b> .....	01
<b>Revue bibliographique</b>	
1. Les levures .....	03
1.1. La classification des levures .....	04
1.2. La paroi .....	04
1.3. Le cycle de croissance .....	05
1.4. La physiologie des levures .....	05
1.4.1. Besoins nutritifs .....	05
1.4.2. Conditions physico-chimiques .....	06
1.4.3. Régulation fermentation – respiration .....	07
1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	08
2. La mitochondrie .....	09
2.1. La membrane interne mitochondriale (M.I.M.) .....	11
2.2. La chaîne respiratoire mitochondriale (C.R.M.) .....	11
2.3. Les complexes de la chaîne respiratoire .....	13
2.3.1. Complexe I .....	13
2.3.2. Complexe IV .....	13
2.3.3. Complexe III .....	15
2.3.4. Complexe II .....	15
2.3.5. Complexe V .....	15
2.4. La respiration cellulaire .....	16
2.5. La phosphorylation oxydative .....	17
2.6. La membrane externe mitochondriale .....	17
3. Les pesticides .....	18
3.1. Classification .....	18
3.2. Interaction pesticides-levures .....	18
3.3. Inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale .....	19
3.3.1. le cyanure .....	20
3.3.2. la roténone .....	22



3.3.3. L'Azyde de sodium .....	22
3.3.4. Le paraquat .....	25
3.3.5. L'hexachlorocyclohexane (HCH) .....	25
.....	
3.3.6. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) .....	25
4. Les flavonoïdes .....	26
4.1. La quercetine .....	26
4.2. La rutine .....	29
5. Le phosphate inorganique (Pi) .....	30
5.1. Les rôles d'ATP .....	30
5.2. Le mécanisme de la synthèse d'ATP (Théorie de Mitchell) .....	31
5.3. L'inhibition de la synthèse d'ATP .....	32
5.3.1. L'Oligomycine .....	32

### **Matériel et Méthodes**

1. Principe des mesures .....	34
2. Modalités Pratiques .....	35
3. Préparatifs .....	35
.....	
4. Conditions expérimentales .....	35
4.1. Préparation des manomètres .....	35
4.2. Préparation des fioles d'expérience .....	36
5. Mesure de la consommation d'oxygène .....	36
6. Calculs .....	39
7. Dosage du phosphate inorganique .....	40
8. Analyses statistiques .....	41

### **Résultats et discussion**

1. La consommation d'oxygène par les levures en l'absence et en présence du glucose .....	42
2. La consommation d'oxygène par les levures en présence du KCN, de NaN <sub>3</sub> et de la roténone .....	43
3. La consommation d'oxygène par les levures en présence du δ-HCH, du 2,4-D et du paraquat .....	44
4. La consommation d'oxygène par les levures en présence de la quercetine et de	



la routine .....	47
5. Dosage du phosphate inorganique .....	49
6. Discussion .....	51
<b>Conclusion</b> .....	56
<b>Référence bibliographiques</b> .....	58
<b>Annexe</b>	



# *Introduction générale*



## Introduction

Le fonctionnement cellulaire nécessite un apport continu d'énergie. Cette dernière, produite par les oxydations du métabolisme intermédiaire, est stockée sous forme d'acide adénosine triphosphorique (ATP), et distribuée aux réactions utilisatrices par exemple, les réactions en biosynthèse.

La formation d'ATP est essentiellement localisée dans les organites cellulaires importants: les mitochondries. Ces dernières sont souvent situées à proximité de structures nécessitant un apport énergétique. Leur nombre est constant dans les cellules d'un tissu donné. Elles possèdent deux membranes: une externe lisse et élastique et une interne se repliant vers l'intérieur pour former des crêtes qui contiennent tous les composants de la chaîne respiratoire (Lardy and Ferguson, 1969). On a pu montrer que ces deux membranes ont des propriétés différentes.

Les mitochondries sont le siège d'un mécanisme couplant la respiration aérobie et la genèse de l'ATP à partir d'ADP et de Pi. Ce mécanisme est connu sous le nom de phosphorylation oxydative.

Le catabolisme des substrats du cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) fournit des Coenzymes réduits tels que le Flavine et Nicotinamide adénosine dinucléotide ( $FADH_2$ ) et le ( $NADH_2$ ). Ces coenzymes sont orientés vers la chaîne respiratoire où ils cèdent leur paire d'électrons. Ces derniers transitent par les différents composants de la chaîne respiratoire et réduisent l'oxygène ( $O_2$ ) moléculaire.

Ce mécanisme a fait l'objet de nombreux travaux principalement chez les animaux et les plantes. Par contre on possède peu d'information sur les champignons, c'est pourquoi notre travail porte sur l'étude de la respiration chez un champignon *Saccharomyces cerevisiae*. La respiration cellulaire dépend d'un certain nombre de facteurs: métabolisme intense d'un substrat, chaîne respiratoire fonctionnelle,... Pour tester l'influence de ces deux facteurs, la consommation d'oxygène par les levures sera mesurée en présence et en l'absence de glucose, d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire (KCN, roténone et azide de sodium), trois herbicides, le paraquat (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridylum dichloride; méthyl viologen), l'acide (dichloro-2,4-phenoxy) acétique

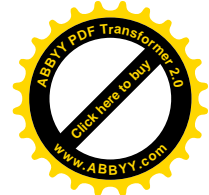




(2,4-D) et  $\delta$ -hexachlorocyclohexane ( $\delta$ -HCH) et deux flavonoïdes, la rutine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside) et la quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone).

Le phosphore joue un rôle important dans plusieurs aspects du métabolisme cellulaires notamment la synthèse d'ATP qui est la source d'énergie pour de nombreuses réactions cellulaires, pour cela la modification du Pi sera mesurée dans une suspension de levure en présence et en l'absence de 2,4-D et de l'azide de sodium.

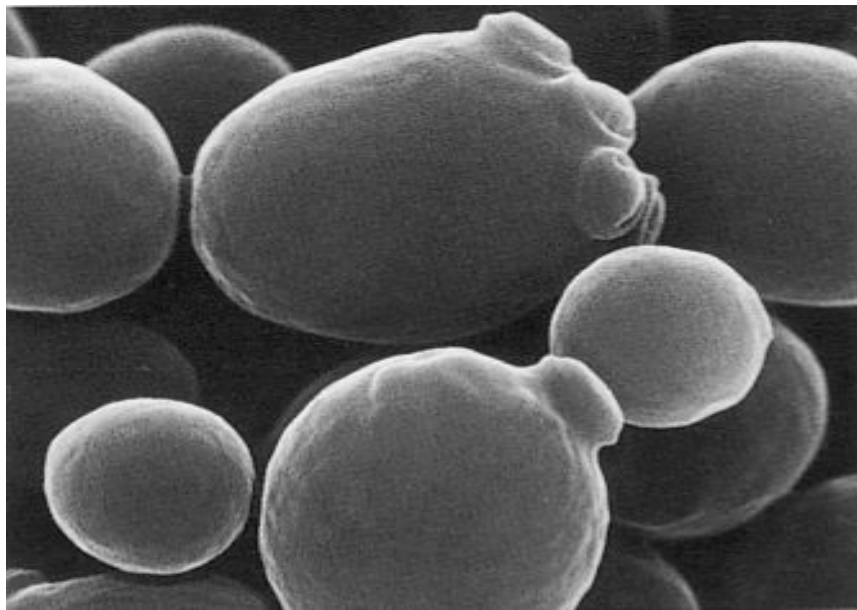
Le but de ce travail est d'étudier l'effet de certains pesticides et flavonoïdes sur la respiration cellulaire et précisément sur la chaîne respiratoire mitochondriale et la phosphorylation oxydative (la synthèse d'ATP), à l'aide d'un système expérimental levurien *Saccharomyces cerevisiae*.



# *Revue bibliographique*

## 1. Les levures

Les levures peuvent être définies comme étant des champignons unicellulaires se reproduisant par bourgeonnement ou fission (Kreger-van Rij, 1984). Elles sont ubiquistes dans l'environnement et peuvent donc adapter leur métabolisme à des sources nutritives très variées. Cette flexibilité métabolique est due en majeure partie à une large gamme d'enzymes extra et intracellulaires (Van Den Brink *et al.*, 1998; Balzan *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2004).



**Figure 01:** *saccharomyces cerevisiae* (La levure de bière)

(Photo).

Actuellement, les levures sont probablement les organismes eucaryotiques dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée. Ceci tient à leurs activités biochimiques exploitées sur le plan industriel, mais aussi à la simplicité de leur organisation unicellulaire et à leur croissance rapide dans les conditions contrôlées du laboratoire, qui en font un modèle expérimental particulièrement commode (Bocquet, 1993; Ohgiya *et al.*, 1997; Murray et Correia, 2001).

Ainsi, le développement spectaculaire des techniques moléculaires chez les levures, en particulier *Saccharomyces cerevisiae* (la levure de boulangerie), fait que cette levure est actuellement l'organisme de référence en biologie cellulaire et moléculaire des eucaryotes (Lacour *et al.*, 1996; Van Den Brink *et al.*, 1998; Schägger,



2002; Ballatori et Villalobos, 2002; Fang et Beattie, 2003; Hiraga *et al.*, 2005 ; Hwang *et al.*, 2005).

### 1.1. La classification des levures

Les levures appartiennent à 3 classes de champignons: les ascomycètes, les basidiomycètes et une troisième classe les deutéromycètes regroupant les formes imparfaites des levures (tab. 01).

**Tableau 01:** Classification des levures dans les Eumycètes (D’après Kreger Van Rij, 1984).

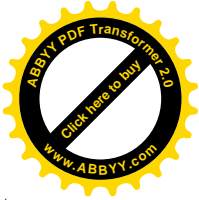
Classe	Sous classe	Ordre	Famille
Ascomycètes			
	Hémiascomycètes		
		Endomycétales	Spermophthoraceae
			Saccharomycetaceae
Basidiomycètes			
		Ustilaginales	Filobasidiaceae
			Levure formant des teliospores
		Tremellales	Sirobasidiaceae
			Tremeliaceae
Deutéromycètes			
		Blastomycètes	Cryptococcaceae
			Sporobolomycetaceae

A l’intérieur de ces classes, les levures sont regroupées en ordre, famille, sous-famille éventuellement genres et espèces. (Bouix et Leveau, 1993).

### 1.2. La paroi

En microscope électronique la paroi des ascomycètes apparaît avec une couche claire large et une couche sombre plus mince alors que la paroi des basidiomycètes est composée d’un nombre variable de couches claires et sombres en alternance. Cette caractéristique est utilisée pour étudier les levures asporogènes et les rattacher à l’une des classes de levure sporogènes (Bouix et Leveau, 1993).

La composition chimique de la paroi, en particulier les polysaccharides varie entre les ascomycètes et les basidiomycètes dont:



- Les ascomycètes contiennent essentiellement des glucanes et des mannanes et un peu de chitine.

- Les basidiomycètes contiennent essentiellement des glucanes et de la chitine (Bouix et Leveau, 1993).

### **1.3. Le cycle de croissance**

La croissance d'un microorganisme est pratiquement synonyme de la multiplication, elle correspond à l'augmentation du nombre d'individus.

Le cycle de croissance consiste en 3 phases principales: Il commence par une phase de croissance exponentielle au cours de laquelle le temps de génération prend sa valeur minimale et la population croît considérablement, suivie d'une phase quasi stationnaire caractérisée par un taux nul de croissance, enfin une phase de déclin ayant un taux de mortalité élevé dû à l'épuisement du substrat et l'accumulation des métabolites toxiques (Bocquet, 1993; Jackson, 1994). Une phase de latence peut précéder ces 3 phases, il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise certaines de ses enzymes (Bouix et Leveau, 1993; Jackson, 1994; Wright *et al.*, 1995).

### **1.4. La physiologie des levures**

Plusieurs caractéristiques physiologiques des levures contribuent à leurs succès en tant que microorganismes industriels.

#### **1.4.1. Besoins nutritifs**

Pour leur vie, pour leur développement et pour l'expression de leurs propriétés, les microorganismes ont besoin d'énergie et d'éléments nutritifs. Leur croissance est considérée comme une série d'interactions entre la cellule et l'environnement, celui-ci devant fournir les éléments nécessaires à la nutrition et de plus, sous forme utilisable par ces microorganismes.

##### **1.4.1.1. Nutrition carbonée**

Le carbone est le composé majeur de la cellule, il constitue environ 50% du poids sec (Bocquet, 1993). Les composés carbonés sont utilisés à la fois comme source



d'énergie fournie par leur oxydation et de carbone exigé pour la biosynthèse des constituants cellulaires (Arnaud et Guiraud, 1993), et la plus utilisés les glucides.

#### **1.4.1.2. Nutrition azotée**

L'azote est quantitativement le substrat de deuxième importance pour la levure (Bocquet, 1993), son rôle est capital car il est constitutif des molécules simples et des macromolécules essentielles au fonctionnement cellulaire (Bouix et Leveau, 1993). La plupart des levures sont capables d'utiliser les sources azotées minérales simples, mais aussi des composés organiques divers tels que les acides aminés et les peptides (Botton, 1991).

*Saccharomyces cerevisiae* est incapable d'utiliser les nitrates (Bouix et Leveau, 1993), et certaines substances sont nécessaires à des concentrations assez faibles: phosphate, magnésium, soufre, potassium, calcium, zinc,...

#### **1.4.2. Conditions physico-chimiques**

Outre les exigences nutritives, le développement microbien est sous la dépendance de paramètres environnementaux créés autour de lui par son milieu. Les levures tolèrent de larges gammes de pH (de 3 à 8), et la température courante de leur culture se situe entre 25°C et 30°C.

##### **1.4.2.1. Oxygène**

Le développement de la levure et la fermentation ne sont pas possibles en l'absence complète d'oxygène; il n'y a pas de levures anaérobies strictes (Bouix et Leveau, 1993).

Une anaérobiose partielle augmente l'utilisation du glucose par la levure et améliore sa production de biomasse et sa capacité fermentaire, en permettant la biosynthèse des stérols et des acides gras insaturés à longues chaînes constitutifs des membranes (Charpentier, 1993; Venturin *et al*, 1994).

*S. cerevisiae* requiert de très faibles quantités d'oxygène dissous pour la synthèse de ses enzymes respiratoires (Bouix et Leveau, 1993).



#### 1.4.2.2. Ethanol

Selon les souches et l'état physiologique de la culture, l'éthanol est toxique pour des concentrations de 8 à 18% en volume et peut entraîner la mort des cellules (Charpentier, 1993). Les molécules d'éthanol vont se substituer aux molécules d'eau à l'intérieur de la membrane plasmique, réduisant ainsi sa fluidité et sa perméabilité et entraînant une inhibition du transport de substrat (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996).

Toutes les levures ne présentent pas la même sensibilité à l'éthanol, les plus résistantes sont les saccharomyces que l'on utilise dans les procédés de fermentation alcoolique pour l'élaboration des boissons ou la production d'éthanol industriel (Bouix et Leveau, 2003).

#### 1.4.3. Régulation fermentation–respiration

L'oxygène seul ne suffit pas à faire basculer le métabolisme d'une voie métabolique à une autre. Effectivement, dès l'instant où le taux de substrat dépasse une certaine valeur critique (de l'ordre de 1 à 5 g.L<sup>-1</sup>) la levure produit de l'éthanol quelque soit le niveau d'aération considéré (Delia-Dupuy et Strehaiano, 1996; Vasserot, 1996).

Chez *S. cerevisiae*, l'adaptation respiratoire est un programme génétique complexe assurant la synthèse de l'ATP dans un milieu pauvre en glucose (Wright *et al.*, 1995) aux contraires, à des concentrations élevées de glucose peuvent inhiber la respiration cellulaire, ce phénomène s'appelle effet **Crabtree**. Ainsi, en présence d'oxygène et de forts taux de substrats on va avoir une saturation de la voie respiratoire et l'excédent de pyruvate sera alors détourné vers la voie fermentaire qui va ainsi se mettre à fonctionner parallèlement à la voie respiratoire, c'est le métabolisme **respiro-fermentaire** (Vasserot, 1996).



### 1.5. *Saccharomyces cerevisiae*

Elle appartient à la classe des Ascomycètes, à la famille des *Saccharomycetoideae*, genre *Saccharomyces* (Bouix et Leveau, 1993 ; Kreger-van Rij, 1984).

Elle présente un métabolisme respiratoire de capacité limitée (Vasserot, 1996), elle est du type fermentaire (Botton, 1991; Belin, 1996). Largement utilisée en fermentation alcoolique industrielle où elle s'est imposée, elle possède une forte tolérance à l'éthanol, aux concentrations élevées de sucre et une stabilité en anaérobiose (Michel *et al.*, 1990; Jackson, 1994; Panon, 1997). Elle est économiquement avantageuse, elle croit et fermente rapidement aux faibles valeurs du pH spécifique du moût (Jackson, 1994; Drilleau, 1996). Elle est capable de prédominer surtout pendant les stades tardifs lorsque l'anaérobiose et le taux d'éthanol augmentent (Dueñas *et al.*, 1994; Bizeau *et al.*, 1992).

Par ailleurs, elle possède de nombreux attributs qui s'ajoutent à ses caractéristiques biochimiques et physiologiques, entre autres un génome entièrement séquencé, relativement petit et compacte permettant des analyses globales au niveau du génome en entier, et dont les gènes sont facilement manipulés, effacés, remplacés, ce qui les rend un modèle génétique virtuellement idéal (Ballatori et Villalobos, 2002; Dolinski et Botstein, 2006).





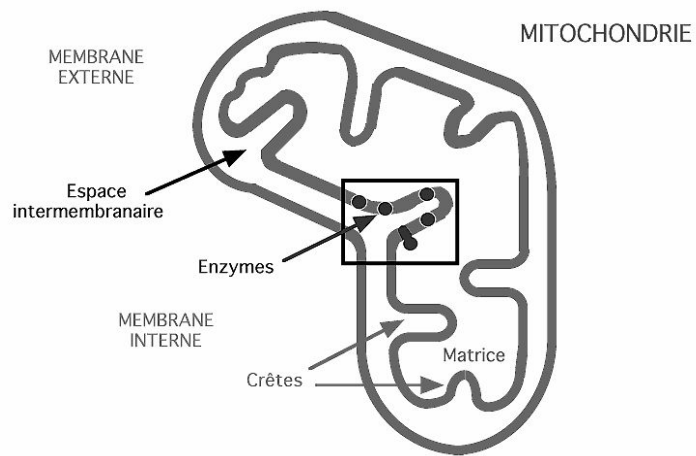
## 2. La mitochondrie

La mitochondrie est un organe intracellulaire à double membrane qui intervient dans la production énergétique de la cellule et qui possède son propre génome, leur nombre est très variable en fonction du type cellulaire.

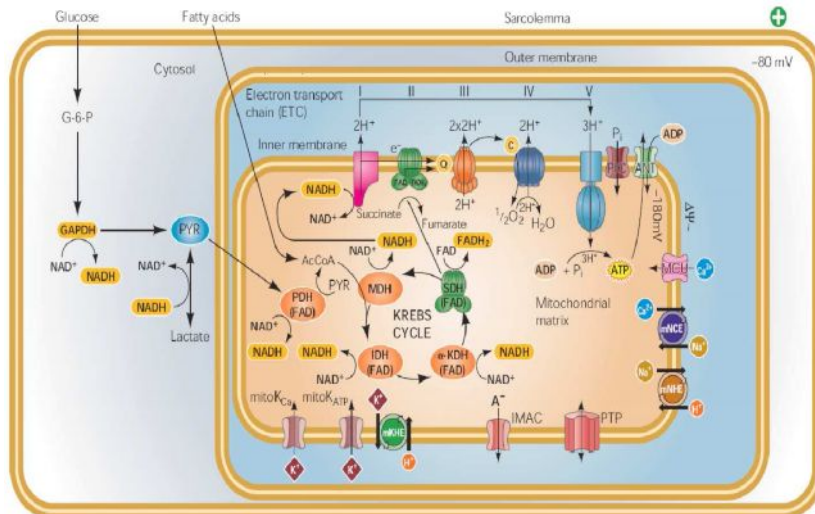
Selon les théories récentes, la cellule eucaryote proviendrait de la fusion d'une archéobactérie (hôte) anaérobie avec une protéobactérie (symbiote), ancêtre de la mitochondrie. Au cours de l'évolution, cette protéobactérie a transmis l'essentiel de ses gènes à la cellule hôte. À présent, la mitochondrie dépend de l'hôte qui fournit les substrats et les protéines nécessaires à sa survie et la mitochondrie fournit l'ATP nécessaire à la cellule (Nevière, 2008).

La mitochondrie est le siège de la respiration, elle comporte une double membrane: membrane externe et interne séparées par l'espace intermembranaire (Fig.02), à l'intérieur de la membrane interne est un compartiment soluble appelé matrice, les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (C.R.M) sont situées dans la membrane interne mitochondriale (M.I.M.) (Raisonnier, 2005). Elle forme un compartiment cellulaire où ont lieu des réseaux métaboliques comme par exemple le cycle citrique, la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la chaîne de transporteurs des électrons, le transport des métabolites à travers la membrane mitochondriale interne et la synthèse d'ATP (Vendelin *et al.*, 2005).

Le schéma général de la C.R.M. (Fig.04) est expliqué sur un agrandissement de la partie encadrée de cette mitochondrie.



**Figure 02:** Morphologie et principaux composants de la mitochondrie.  
(Raisonnier, 2005).



**Figure 03:** Les composants de la membrane interne mitochondriale.  
(O'rourke *et al.*, 2005).



## 2.1. La membrane interne mitochondriale (M.I.M.)

Elle forme des replis appelés crêtes qui pénètrent à l'intérieur de la matrice afin d'augmenter sa superficie (Fig.02), elle contient 30% de phospholipides, 70% de protéines, dont des complexes protéiques de la chaîne respiratoire et différents transporteurs comme par exemple la TIM (Translocase of the Inner Membrane) qui assurent le transport des protéines, et les transporteurs qui font partis de la famille de transporteurs mitochondriaux (MCF: Mitochondria Carrier Family) composée de:

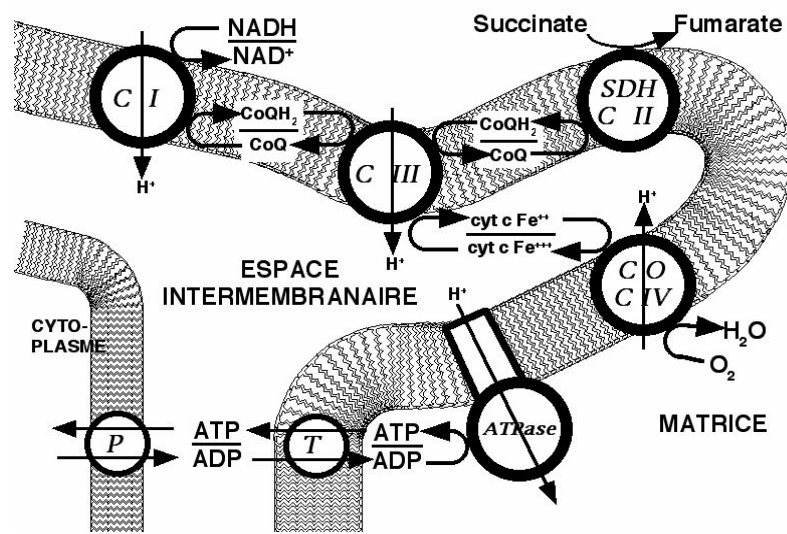
- symports:  $H^+$ /pyruvate translocase,  $H^+/H_2PO_4^-$ : transporteur du phosphate inorganique ( $H_2PO_4$ ).
- antiport ANT (Adenine Nucleotide Translocase) ,  $Na^+/Ca^{2+}$  antiport.
- uniport de  $Ca^{2+}$  et d'autres (Saks et Pison, 2009) (Fig.03).

## 2.2. La chaîne respiratoire mitochondriale (C.R.M)

La chaîne respiratoire est un ensemble de réactions catalysées par de gros complexes enzymatiques de la membrane interne des mitochondries, dont l'effet est le couplage de l'oxydation en présence d'oxygène avec les coenzymes transporteurs d'hydrogène comme le NADH ou le coenzyme QH<sub>2</sub>, en a phosphorylation de l'ADP en ATP (Raisonnier, 2005).

Elle est localisée dans la membrane interne mitochondriale et composée d'une centaine de protéines différentes organisées en 5 complexes hétéropolymeriques (Mitchell et Moyle, 1967) et de 2 transporteurs mobile d'électron: le coenzyme Q (ou ubiquinone) et le cytochrome C (Moussard, 2002).

Cette voie métabolique nécessite la présence des cinq complexes enzymatiques avec leurs cofacteurs liés, des coenzymes libres NAD, du coenzyme Q, du cytochrome C , d'ADP, du phosphate, du protons, du magnésium, et enfin du substrats comme l'oxygène, le succinate, le glycérophosphate ou les acyl-coenzymes A (Raisonnier, 2005).



**Figure 04:** Le schéma général de la chaîne respiratoire mitochondriale (Raisonnier, 2005).

Les complexes I à IV assurent les réactions d'oxydoréductions en série qui permettent en début de chaîne de désoxyder les dérivés réduits produits par le métabolisme intermédiaire (NADH, FADH,...) et en fin de chaîne de réduire l'oxygène moléculaire en eau. En parallèle du transfert d'électrons, les complexes I, III et IV expulsent des protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire ils génèrent ainsi un gradient électrochimique dont l'énergie est utilisée par le complexe V pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ce mécanisme couple la chaîne d'oxydoréductions et la phosphorylation de l'ATP (Mitchell et Moyle, 1967) d'où le nom de chaîne des oxydations phosphorylantes (OXPHOS).

La chaîne des OXPHOS est unique par sa double origine génétique, la grande majorité des sous-unités des complexes de la chaîne des OXPHOS est codée par des gènes nucléaires mais 13 protéines essentielles de la chaîne sont codées par l'ADN mitochondriale. Ces 13 protéines sont des sous-unités des complexes respiratoires I, III, IV et V. Parmi les cinq complexes de la chaîne des OXPHOS, seul le complexe II est donc totalement codé par l'ADN nucléaire (Brown *et al.*, 1979).



## 2.3. Les complexes de la chaîne respiratoire

### 2.3.1. Complexe I

La NADH-Coenzyme Q oxydoréductase est la première enzyme de cette voie métabolique, ces enzymes sont situées dans la membrane interne de la mitochondrie, cette membrane est représentée par sa face matricielle dans la partie haute de l'image (Fig.05) et au dessous de la coupe de cette membrane se situe l'espace intermembranaire.

Elle est constituée de sous-unités et de cofacteurs liés. Les sous-unités sont marquées par des parallélépipèdes en jaune et les cofacteurs en vert: on aperçoit une flavine mononucléotide et des cofacteurs liés constitués d'atomes de fer et de soufre (on les appelle centres Fer-Soufre) au nombre de 6. L'hydrogène qui est le substrat de l'enzyme est apporté par le coenzyme NADH, et transféré par l'enzyme vers le coenzyme Q présent dans les lipides de la membrane (Fig.05) (Raisonnier, 2005).

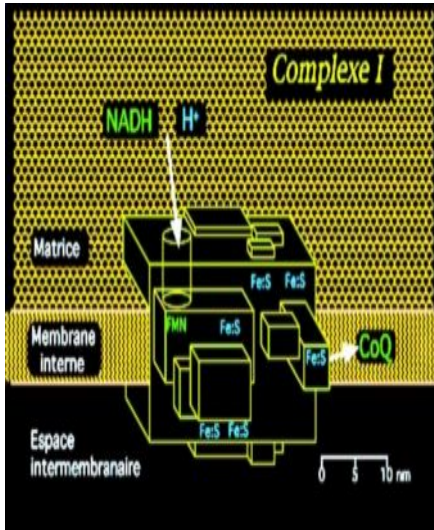
### 2.3.2. Complexe IV

Le cytochrome oxydase est situé dans la membrane interne et dépasse surtout sur la face intermembranaire, elle est constituée de 2 moitiés identiques contenant les mêmes coenzymes liés. On aperçoit le cytochrome qui contient deux noyaux hèmes appelés  $a$  et  $a_3$  chacun d'entre eux étant associé à un atome de cuivre (Fig.06).

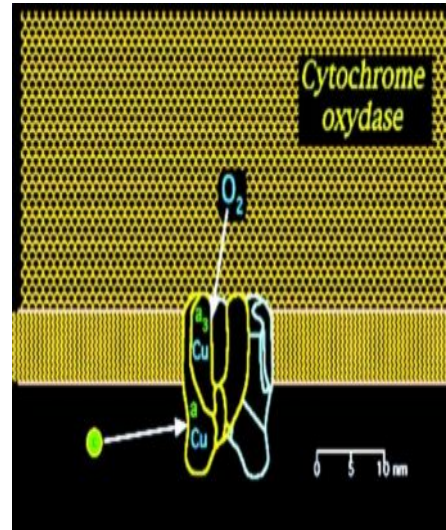
Les électrons qui sont le substrat de l'enzyme sont apportés par le cytochrome  $C$  de l'espace intermembranaire puis transférés par l'enzyme vers l'oxygène de la respiration qui diffuse des vaisseaux vers la matrice des mitochondries.

Dans les cellules, le rapport des concentrations du cytochrome  $C$  réduit et oxydé n'est pas égal à l'unité et l'Oxygène est beaucoup moins abondant que l'eau, de sorte que la réaction produit moins de chaleur que dans les conditions standard (Raisonnier, 2005).

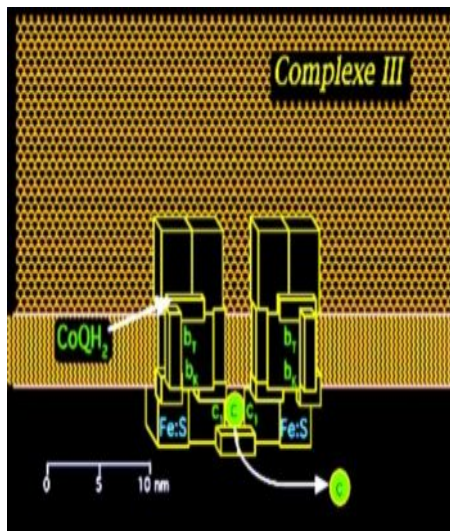




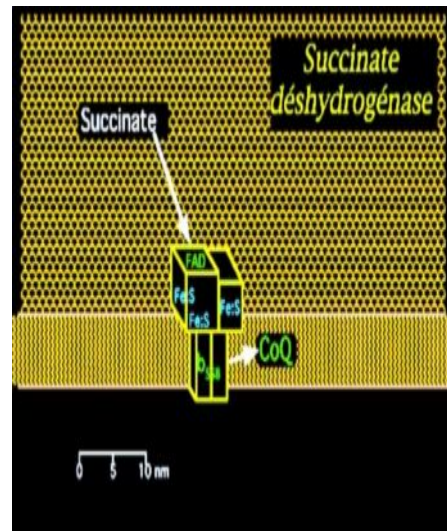
**Figure 05:** La NADH Coenzyme Q oxydoréductase (complexe I)  
(Raisonnier, 2005).



**Figure 06:** Cytochrome oxydase  
(complexe IV)  
(Raisonnier, 2005).



**Figure 07:** CoQ-cyt C oxydoréductase (complexe III)  
(Raisonnier, 2005).



**Figure 8:** Succinate déshydrogénase  
(complexe II)  
(Raisonnier, 2005).



### 2.3.3. Complexe III

La Coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase est située dans la membrane interne et dépasse largement sur les deux faces. Elle est constituée de 2 moitiés identiques contenant les mêmes coenzymes liés (Fig.07).

Les atomes d'hydrogène qui sont le substrat de l'enzyme sont apportés par le coenzyme QH<sub>2</sub>, leurs électrons sont transférés par l'enzyme vers le cytochrome C qui déplace dans l'espace intermembranaire (Raisonnier, 2005).

### 2.3.4. Complexe II

La succinate déshydrogénase est une enzyme de la membrane interne de la mitochondrie faisant partie de deux voies métaboliques, le cycle de KREBS et la chaîne respiratoire mitochondriale.

Elle est constituée de quatre chaînes d'acides aminés dont deux sont incluses dans la membrane interne de la mitochondrie, deux autres étant seulement liées aux premières sur la face matricielle de la membrane (Fig.08).

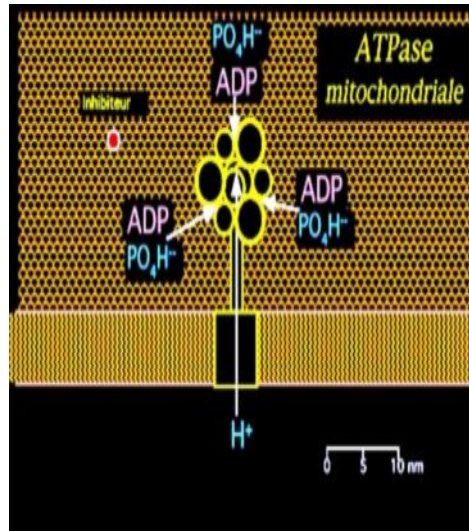
Le succinate substrat de l'enzyme, est oxydé en fumarate par les sous-unités internes, qui contiennent un coenzyme FAD lié et plusieurs centres Fer-Soufre (Raisonnier, 2005).

### 2.3.5. Complexe V

L'ATPase mitochondriale est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale, elle est constituée d'une partie membranaire insérée dans la membrane interne de la mitochondrie, et d'une tête (appelée corpuscule de GREEN) qui dépasse fortement de la membrane vers la matrice mitochondriale et se voit très nettement au microscope électronique (Fig.09). Cette tête est formée de plusieurs sous-unités qui produisent l'ATP dans la mitochondrie (Raisonnier, 2005).

L'ATPase mitochondriale est une protéine complexe constituée de 11 sous-unités différentes. Contrairement aux autres enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, elle pompe les protons de l'espace intermembranaire vers la matrice. Ce faisant, elle récupère l'énergie que les autres enzymes de la chaîne utilisent pour accumuler les

protons dans l'espace intermembranaire, cette énergie est couplée à la réaction de phosphorylation de l'ADP par un phosphate minéral (Pi) en présence de magnésium, réaction endérgonique qui consomme 31 kJ/mol (Raisonnier, 2005).



**Figure 9:** ATPase mitochondriale (complexe F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>)  
(Raisonnier, 2005).

## 2.4. La respiration cellulaire

La respiration cellulaire est un mode de production de liaisons riches en énergie (sous forme d'ATP) qui se caractérise par des oxydations phosphorylantes:

- Actives au sein d'une membrane riche en cytochromes.
- Dont l'accepteur final d'électrons est l'oxygène.
- Dont l'intermédiaire entre oxydation et phosphorylation (couplage) est un gradient ionique doublé d'un potentiel de membrane.

Elle se distingue des fermentations, qui produisent aussi des liaisons riches en énergie (sous forme d'ATP) par des oxydations phosphorylantes:

- Actives au sein d'un compartiment soluble (cytoplasme par exemple).
- Dont l'accepteur d'électrons n'est pas l'oxygène (par exemple le pyruvate).





— Dont les intermédiaires entre oxydation et phosphorylation (couplage) sont des molécules riches en énergie (par exemple 1,3 diphosphoglycérate) (Raisonnier, 2005).

## 2.5. La phosphorylation oxydative

En 1930, il a été émis l'hypothèse que la respiration aérobie doit être couplée à une phosphorylation de l'acide adénosine di-phosphorique (ADP). En 1948, il a montré que la phosphorylation oxydative n'avait lieu que dans la fraction mitochondriale isolée d'un homogénat de foie, par ultra-centrifugation différentielle. De toutes les espèces étudiées jusqu'à présent, la mitochondrie est le siège des phosphorylations oxydatives.

Les réactions d'oxydations du catabolisme (glycolyse,  $\beta$ -oxydation des acides gras, catabolisme des acides aminés, cycle de l'acide citrique) qui son pris en charge les coenzymes NAD et FAD.

- D'une part, la réoxydation de ces coenzymes est indispensable à l'entretien du catabolisme oxydatif.
- D'autre part, le pouvoir réducteur de ces coenzymes est utilisé à la synthèse d'ATP.

Le processus qui couple la réoxydation des NADH,  $H^+$  et  $FADH_2$  à la synthèse d'ATP par phosphorylation de l'ADP appelé **oxydation phosphorylante** (Moussard, 2002).

## 2.6. La membrane externe mitochondriale (M.E.M.)

C'est une barrière sélective pour des métabolites, certaines protéines qui peuvent passer via le transporteur de protéines TOM (translocase of the outer membrane), et ions. Par l'intermédiaire du contrôle du flux des métabolites énergétiques via le VDAC (voltage dependent anion channel), la M.E.M. participe à la régulation de la phosphorylation oxydative (Colombini, 1979).



### 3. Les pesticides

Couramment appelés produits phytosanitaires, les pesticides (du latin « pestis » signifiant « fléau, calamité ») ont une dénomination qui provient du nom anglais « pests », c'est-à-dire insectes ou plantes nuisibles. Ce sont des substances xénotiques utilisées en agriculture pour combattre les ravageurs, les maladies et les mauvaises herbes (Fdil, 2004).

L'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (USEPA) définit un pesticide comme étant n'importe quelle substance prévue pour empêcher, détruire, repousser, ou atténuer n'importe quel parasite. Ceci inclut les insecticides, les herbicides, les fongicides, les fumigènes, les algicides, et d'autres substances (Landgraf *et al.*, 1998). La réglementation française et européenne ne reconnaît pas l'appellation pesticide mais elle définit précisément les notions de produits phytopharmaceutiques et de biocide (Vigouroux-Villard, 2006).

Le terme pesticide n'a été introduit que récemment, il s'est substitué à "produit antiparasitaire" et à "produit phytopharmaceutique", qui n'ont pas exactement la même signification. Il désigne de manière plus générale une préparation ou substance capable de lutter contre une espèce nuisible. Selon le type d'espèce à laquelle il est destiné, le pesticide sera dénommé insecticide, acaricide, nématicide, fongicide, rodenticide ou herbicide (Fdil, 2004).

#### 3.1. Classification

D'après leur cible, les pesticides sont divisés en: herbicides, insecticides, fongicides, acaricides, molluscicides, nématocères, rodenticides et corvicides.

Selon leur structure chimique, ils peuvent être: organochlorés, organophosphorés, organostaniques, carbamates, benzimidazoles, triazoles, pyréthrinoïdes de synthèse, pyrimidines et autres (Jawich, 2006).

#### 3.2. Interaction pesticides-levures

La membrane plasmique des levures est le site d'action de nombreux antifongiques qui vont soit se complexer aux stérols soit inhiber la synthèse de



l'ergostérol et entraîner ainsi une désorganisation de la structure membranaire, et par la suite, un déséquilibre dans les échanges de la levure avec le milieu environnant; suivi par différentes perturbations tel qu'une accumulation d'acides gras libres, une inhibition de la respiration et de la synthèse des acides nucléiques accompagnée par une augmentation du poids sec et des déformations morphologiques notables (Buchenaer, 1987; Bonaly, 1991; Hargreaves *et al.*, 1996). La toxicité des pesticides pouvant s'exercer directement envers des composants intracellulaires levuriens de différents compartiments cellulaires, des actions cytotoxiques et génotoxiques diverses viennent alors s'ajouter et se combiner (Ahlers *et al.*, 1991; Goin et Mayer, 1995; Sohn *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2002).

Pour conclure, on peut noter qu'en matière d'interaction avec les pesticides, le modèle levurien se montre comme un système approprié pour répondre à nombreuses hypothèses de cytotoxicité et génotoxicité directe ou indirecte. Ainsi, perturbation des systèmes membranaires, inhibitions enzymatiques, stress oxydatif, perte de chromosome, métabolites réactionnels électrophiles, et autres actions cytotoxiques et/ou génotoxiques sont relevés parallèlement à la baisse de la viabilité et la diminution de la croissance et de l'activité fermentaire des levures sous l'effet des pesticides. Donc, les levures peuvent être passives et subir l'action toxique, comme elles pourraient participer à cette toxicité par bioactivation des pesticides en métabolites réactifs électrophiles présentant une forte probabilité de liaison avec les macromolécules structurales et résultantes en adduits, à l'exemple du métabolisme levurien de l'aflatoxine *B1*. Donc, là aussi le métabolisme peut jouer un rôle crucial qui peut être nuisible, ou protecteur lorsque les métabolites obtenus sont moins toxiques que le pesticide initial, mais, si les pesticides exercent une action toxique envers les levures, ces dernières peuvent à leur tour diminuer les résidus de pesticides par adsorption et/ou métabolisation des molécules toxiques (Jawich, 2006).

Cette vue d'ensemble ne peut que souligner l'efficacité du modèle levurien pour définir les bases cellulaires et moléculaires de la toxicité des pesticides (Jawich, 2006).

### **3.3. Les inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale**

Les principaux seront les suivants :

- **Complexe I:** Roténone, Barbiturique, Meperidine (Dolosal) (Fig.10).



- **Complexe II:** Malonate, Thényltrifluoroacétone (TTFA).
- **Complexe III:** Antimycine A, Myxothiazol, Dimercaprol.
- **Complexe IV:** Cyanure, Azide, Oxyde de carbone (Fig.10).
- **Complexe F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>:** Oligomycine, Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD).
- **ATP translocase:** Atractylate, Bongkrékate.

- Le complexe I peut être inhibé par la roténone, extraite des racines de certaines légumineuses et utilisée comme poison de pêche par les indiens, certains médicaments sédatifs comme les Barbituriques ou le Dolosal ont aussi cet effet.

- Le malonate est un petit diacide connu comme inhibiteur du complexe II, compétitif vis-à-vis du succinate. Le TTFA est un chélateur de métaux lourds utilisé pour le dosage de l'Uranium.

- Les inhibiteurs du complexe III sont l'antimycine A et le myxothiazol qui agissent respectivement aux niveaux du cytochrome *bK* et du centre Fer-Soufre.

- L'oxyde de carbone et les cyanures sont des inhibiteurs des enzymes ayant l'Oxygène pour substrat comme le cytochrome oxydase (Raisonnier, 2005).

### 3.3.1. Le cyanure

Le terme cyanure désigne le radical anionique  $-C\equiv N$ . Les composés capables de libérer du cyanure peuvent être de nature inorganique ou organique. Les composés inorganiques peuvent être simples (par exemple: AgCN, KCN) ou complexes (par exemple  $A [CN]_y$ ,  $A[M]_x[CN]_y$ ). Les composés organiques peuvent être des glucosides ou des nitriles (Dosselin *et al.*, 1984), il peut s'accumuler dans les cellules en se fixant aux métalloprotéines ou aux enzymes comme la catalase ou la cytochrome-c-oxydase (Ellenhorn et Barceloux, 1988).

L'ion cyanure est le plus puissant des poisons de la chaîne respiratoire, il inhibe la cytochrome-c-oxydase (Fig.11) dans le transport des électrons (chaîne respiratoire) de la mitochondrie, entravant à la fois le métabolisme oxydative et la phosphorylation oxydative qui y est associée (Dreisenbach et Robertson, 1987 ; Holland, 1983).

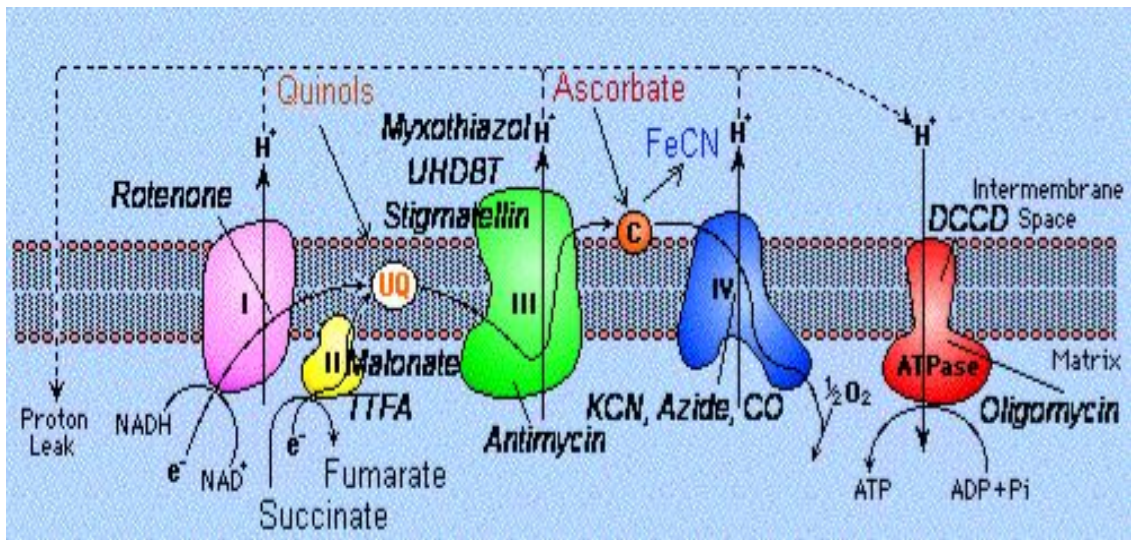


Figure 10: les inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire.

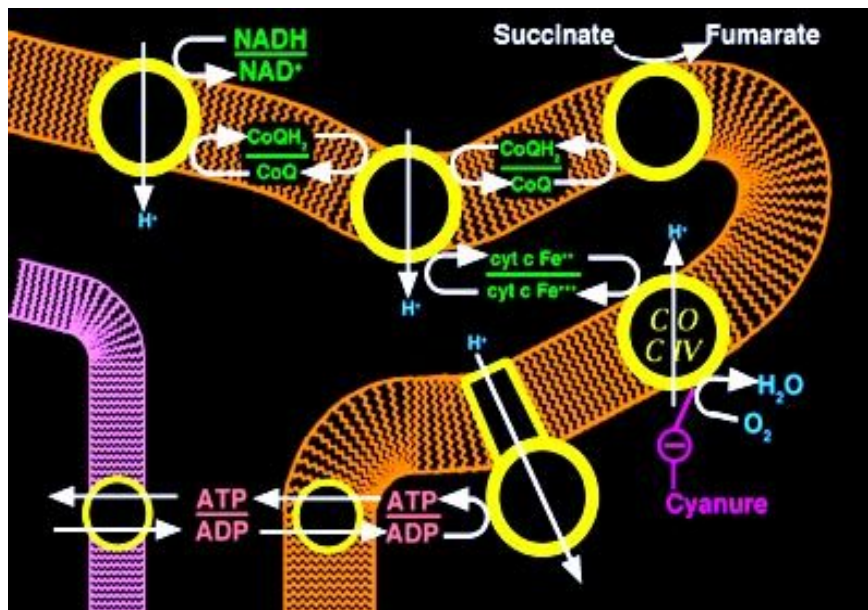


Figure 11: le site d'action du cyanure (complexe IV)

(Raisonier, 2005).



### 3.3.2. La roténone

La roténone est le plus actif des composés roténoïdes à action insecticide dont la digueline (extraite de *deguelia* d'Afrique), le toxicarol (*Tephrosia toxicaria* d'Amérique centrale), la tephrosine (*Tephrosia virginiana*) l'elliptone, le malaccol, le sumatrol..., qui ont été isolés de ces plantes. La roténone est particulièrement attrayante car elle n'agit pas sur le système nerveux mais sur les mécanismes de la respiration cellulaire, à l'opposé de la nicotine et du pyrèthre, elle est inoffensive pour les animaux à sang chaud administrée *per os*, mais en revanche très active sur les animaux à sang froid: batraciens, poisson, reptiles. Elle inhibe les oxydations cellulaires en interrompant le transfert dans la chaîne respiratoire, portant atteinte au métabolisme énergétique mitochondrial (Regnault-Roger *et al.*, 2002).

La roténone inhibe le NADH-coenzyme Q oxydoréductase ou complexe I ou il ralentit l'utilisation par ce complexe du NADH, donneur d'hydrogène, et du coenzyme Q, receveur d'hydrogène. En somme, l'inhibition de ce complexe entraîne l'inhibition de toute la chaîne respiratoire mitochondriale (Fig.13) (Raisonnier, 2005).

### 3.3.3. L'azide de sodium

L'azide de sodium est un inhibiteur bien connu du cytochrome oxydase, bloque la chaîne respiratoire mitochondriale entre les cytochromes *a* et *a<sub>3</sub>*, de sorte que le cytochrome *a* est réduit cependant le cytochrome *a<sub>3</sub>* est oxydé (Fig.14). En outre, l'azide inhibe l'activité mitochondriale  $F_1F_0$ -ATPase dans la voie d'hydrolyse de l'ATP et supprime l'activité des enzymes antioxydantes comme la catalase, la peroxydase et la superoxyde dismutases (Rikhvanov *et al.*, 2001).

L'oxyde de sodium, n'exerce aucune action toxique sur *S. cereviciae* à 30°C, cependant, l'inhibition de la respiration sensiblement ralentit la croissance de la levure (Parsell et Lindquist, 1993).

L'azide de sodium est un inhibiteur multifonctionnel. En somme, il est responsable de l'inactivation du cytochrome oxydase, il supprime l'activité des enzymes antioxydantes. Entraînant la perturbation de la cellule de la réaction défensive (Wieser *et al.*, 2000).



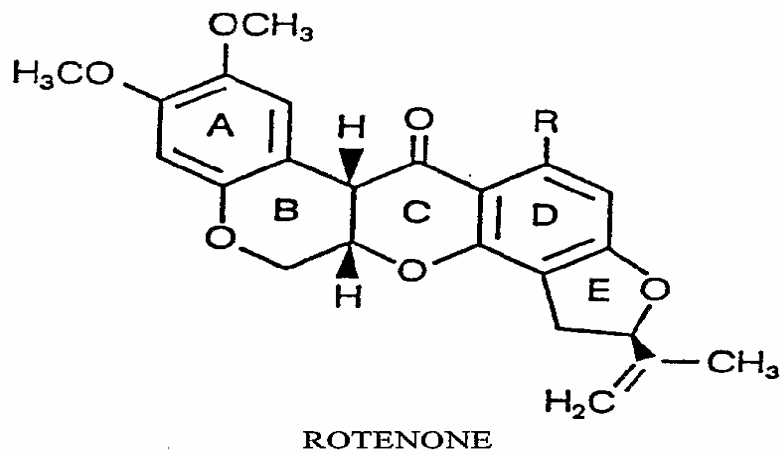


Figure12: La structure de la rotenone  
(Regnault-Roger *et al.*, 2002).

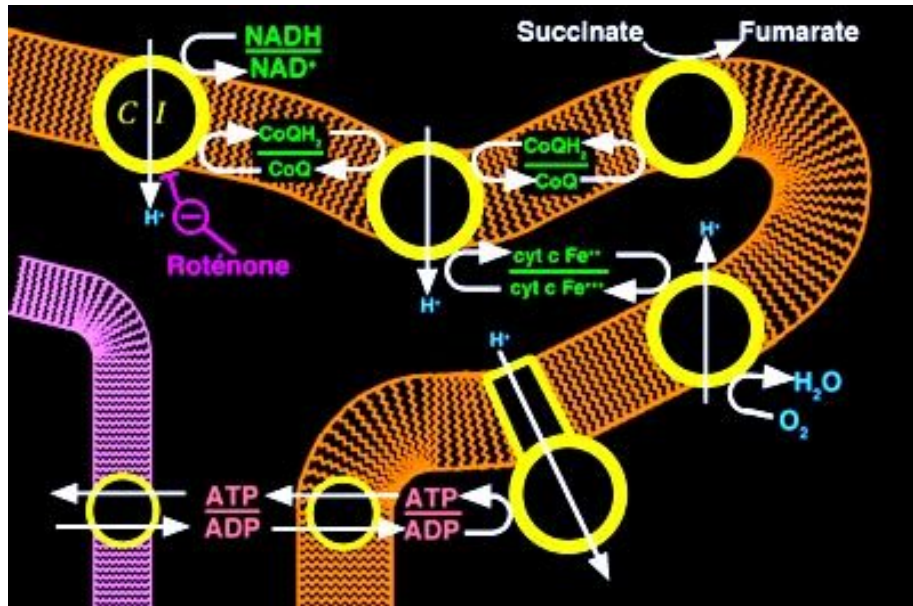


Figure 13: le site d'action de rotenone  
(Raisonnier, 2005.).







### 3.3.4. Le paraquat

Le paraquat est un composé dipyridilium qui apparemment ne pénètre pas la membrane mitochondriale, l'action cytotoxique limitée qu'il présente chez les animaux ne peut pas être dérivée de la chaîne du transport d'électrons mitochondriale par un mécanisme de NADH oxydase alternatif, conduisant à un appauvrissement d'ATP, le paraquat ne produit que légère stimulation de la respiration chez les mitochondries du foie intact de rat (Gage, 1968).

### 3.3.5. L'hexachlorocyclohexane (HCH)

L'hexachlorocyclohexane (HCH) est une substance synthétique qui existe sous huit formes chimiques appelées isomères. La désignation de ces isomères est fonction de la position des atomes d'hydrogène dans la structure chimique. Le lindane ( $\delta$ -HCH) est un isomère gamma du HCH à 99,5% (gamma-HCH), et c'est le seul isomère actif du HCH qui ait des propriétés pesticides.

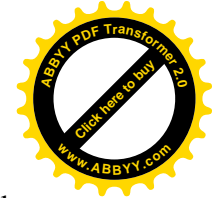
Le lindane est un polluant organique persistant (POP) qui était toujours homologué comme insecticide au Canada, au Mexique et aux États-Unis en mars 2002. Parmi les polluants de l'environnement, particulièrement dans l'Arctique, le lindane est l'un des insecticides organochlorés les plus courants et les plus puissants.

Les organochlorés inhibent la  $Mg^{2+}$  ATPase du système nerveux central (SNC) et la  $Na^+/K^+$  ATPase, enzymes respectivement associées aux phosphorylations oxydatives et au maintien des concentrations cellulaires faibles en calcium, et au transport des cations au travers des membranes cellulaires. Ce mécanisme d'action serait responsable de leur neurotoxicité (Bonvallo et Dor, 2004).

### 3.3.6. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)

L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique appelé couramment 2,4-D est un herbicide systémique de type chlorophénoxy largement utilisé au Canada (Ottawa, 1987).

Le premier herbicide synthétique, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), fut conçu en 1945 (EdelahiD, 2004; Perrin et Scharff, 1997). A partir de ce moment, plusieurs substances chimiques ont été développées telles que les triazines (1955) et les chloroacétamides (1956) (EdelahiD, 2004).



Le composé phenoxy avec la position chlorure 2 et 4 du 2,4-D, inhibe la consommation d'oxygène moins que le 2-CPA (2-chlorophenoxyacetic acide), mais plus que le 4-CPA. (4-chlorophenoxyacetic acide). Le composé phenoxy avec les trois groupes chlore à la position 2,4 et 5 (2,4,5-T) inhibe la consommation d'oxygène plus que les autres composés phenoxy à chlore (Robert et Hiltibran, 1972).

## 4. Les flavonoïdes

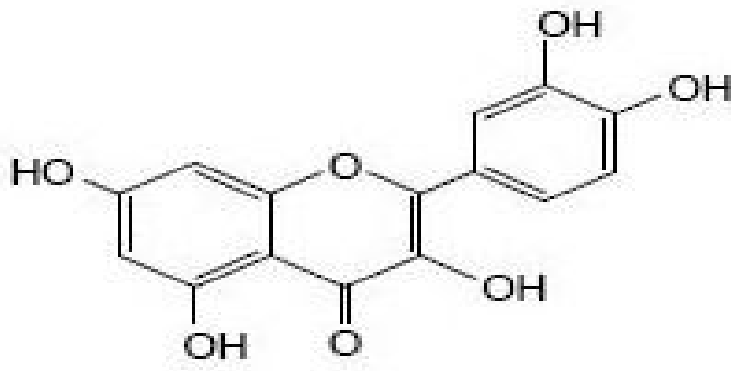
Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi, 2004).

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de *Szent Gyorgyi* en 1938. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique *P* (*P* étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine *P* n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines. par contre, les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses (Hadi, 2004).

### 4.1. La quercétine

La quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) (Erlund, *et al*, 2000) est un flavonoïde communément trouvée dans les fruits et légumes, il est facilement absorbé après l'ingestion.

Les plantes synthétisent les flavonoïdes sous forme de métabolites secondaires, produit de la dégradation des acides aminés aromatiques, tels que la phénylalanine et de tyrosine, comme une défense contre les dégâts du stress oxydatif (Winkel-Shirley, 2002).



Quercetin

Figure 17: La structure de la quercétine (Nuengchamnonng *et al.*, 2004).

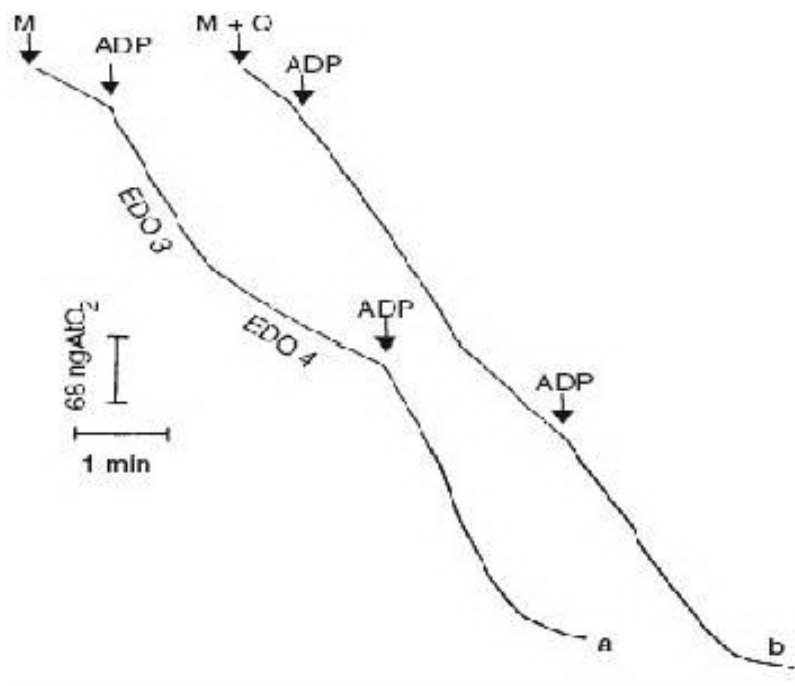


Figure 18: Effet de la quercétine sur la respiration mitochondriale (Ortega et García, 2009).



La **figure 18** montre deux traces représentatives de la respiration, sans la quercétine (trace a) et avec 50 $\mu$ M quercétine (trace b). Dans les deux traces, 200 $\mu$ M d'ADP ont été ajoutée pour stimuler la phosphorylation oxydative. Il a été constaté que la quercétine diminué le contrôle de la respiration de  $3,25 \pm 0,22$  à  $1,87 \pm 0,20$ ; soit une inhibition de 42%. Cela indique que la quercétine découplée la phosphorylation oxydative, selon les concentrations utilisées dans les dosages, qui étaient de 30 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 45 $\mu$ M et 50 $\mu$ M. À des concentrations plus faibles, cet effet n'a pas été observé (Ortega et García, 2009).

Il existe un certain nombre de travaux sur l'effet des flavonoïdes sur la fonction mitochondriale. Ces travaux indiquent que ces composés protégeant efficacement les mitochondries du tissu cardiaque de subir les dégâts lors de la perfusion liée à l'ischémie (Brookes *et al.*, 2002). En outre, les flavonoïdes évitent les dégâts oxydatif induit par les mercuriels dans les mitochondries du cerveau (Franco *et al.*, 2007), et protègent contre les découplants et les inhibiteurs de la synthèse d'ATP mitochondrial (Trumbeckaite *et al.*, 2006; Dorta *et al.*, 2005).

### **Action de la quercétine**

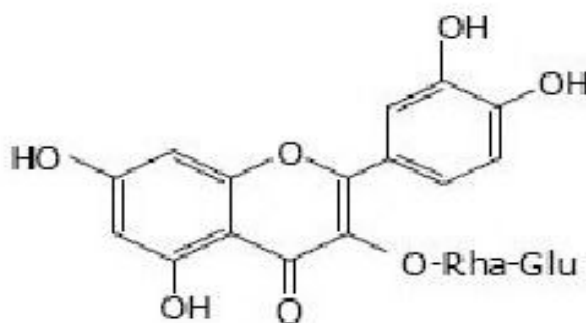
La quercétine a un large spectre d'activités. Il a été montré in vitro qu'elle:

- agit comme un antioxydant (Filipe *et al.*, 2004) ;
- inhibe l'oxydation du LDL (Low Density Lipo-polysaccharides). (Formica et Regelson, 1995; Janisch *et al.*, 2004, Yamamoto *et al.*, 1999) ;
- inhibe la voie de l'oxyde nitrique (Chan, 2000; Mu *et al.*, 2001) ;
- a une activité anti-inflammatoire (Formica et Regelson, 1995) ;
- a un potentiel comme agent anticancéreux (Shenouda, 2004) ;
- a une activité antihistaminique (Marozzi *et al.*, 1970).



## 4.2. La rutine

La rutine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside) est le rutinoside quercetine (Youdim *et al.*, 2003).



Rutin

**Figure 19:** Structure de la rutine  
(Nuengchamnong *et al.*, 2004).

La rutine est l'un des flavonoïdes primaires chez un certain nombre de plantes (Kim *et al.*, 2005). Le sarrasin est une source naturelle majeure de la rutine (Holasova *et al.*, 2002).

La rutine est utilisée par l'alimentation animale, les cosmétiques et les industries chimiques comme un pigment naturel, un stabilisant, un conservateur des aliments, et un absorbant des rayons UV (Gonnet, 1999; Palmer *et al.*, 2002). La rutine a un diverses activités biologiques qui sont bénéfiques pour la santé humaine, comme antioxydant efficace (Gao *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2000).



## 5. Le phosphate inorganique (Pi)

Le phosphore joue un rôle important dans plusieurs aspects du métabolisme cellulaire, notamment la synthèse d'adénosine-triphosphate (ATP) (Fig.20), qui est la source d'énergie pour de nombreuses réactions cellulaires. Le phosphore est également un composant important des phospholipides dans les membranes cellulaires, il est présent dans les liquides intra- et extracellulaires et participe directement ou indirectement à la plupart des processus métaboliques (Kuntz, 1996).

L'adénosine triphosphate est un nucléotide composé, sa structure comporte une base azotée, l'adénine, liée par une liaison N-osidique au  $\beta$ -D-ribose, l'ensemble de ces deux corps constitue l'adénosine qui est un nucléoside.

- L'acide adénylique ou 5'AMP est l'ester dérivé de l'adénosine par phosphorylation du carbone 5' du ribose.
- Une deuxième molécule d'acide phosphorique liée à la précédente par une liaison anhydride forme l'adénosine diphosphate ou l'ADP.
- Une troisième molécule d'acide phosphorique liée à la précédente par une autre liaison anhydride forme l'adénosine triphosphate ou l'ATP.
- Les enzymes utilisant l'ATP ou l'ADP comme coenzyme, nécessitent en même temps la présence du cation magnésium comme cofacteur (Raisonnier, 2005).

### 5.1. Les rôles d'ATP

- Le coenzyme ATP joue toujours dans les réactions enzymatiques le rôle de donneur d'énergie par hydrolyse d'une de ses liaisons riches en énergie.
- Cette énergie peut apparaître sous de multiples formes: en énergie mécanique comme dans les contractions musculaire, en énergie osmotique comme dans les échanges  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  au niveau des membranes cellulaires, en énergie chimique pour effectuer des synthèses de molécules biologiques, en énergie calorique pour maintenir la température de  $37^\circ\text{C}$ , en énergie électrique pour la propagation de l'influx nerveux et enfin en énergie lumineuse chez le ver luisant par exemple.



• En plus de l'énergie, les enzymes transfèrent souvent une partie de la structure chimique de l'ATP. Ainsi, l'ATP peut être:

— donneur de phosphate, avec la plupart des enzymes de phosphorylation ou kinases;

— donneur de pyrophosphate, comme dans l'activation de la vitamine B1 ou thiamine;

— donneur d'AMP, comme dans l'activation des acides gras ou des acides aminés;

— donneur d'adénosine enfin comme dans la synthèse des coenzymes B12 ou adénylméthionine (Raisonnier, 2005).

## 5.2. Le mécanisme de la synthèse d'ATP (La théorie de Mitchell)

Les étapes sont les suivantes:

- En tout premier lieu, le transport des électrons à travers la chaîne respiratoire est nécessaire.

- La formation de l'ATP exige la création de gradient de densité de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire. c'est le potentiel électrochimique créé qui fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP.

- Une fois le gradient créé, la synthèse de l'ATP est effectuée par une enzyme contenue dans des protubérances sphériques situées sur le côté matriciel de la M.I.M. Ces sphères sont connues sous le nom de facteur de couplage 1 ou  $F_1$ . Son rôle physiologique est de catalyser la synthèse de l'ATP. Il contient l'ATPase ou l'ATP synthétase.

- A la base de  $F_1$  et constituant son pédoncule membranaire, il existe une autre unité protéique essentielle appelée  $F_0$  ou canal protonique. La liaison entre  $F_0$  et  $F_1$  est assurée par plusieurs autres protéines dont l'ensemble est le complexe  $F_0$ - $F_1$ . Le facteur  $F_0$  assure le reflux des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice à travers la membrane interne et permet la libération de l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP.

Quant à la synthèse de l'ATP on sait peu de choses. On ne pense que son initiation débute grâce à l'action directe du flux de protons à travers  $F_0$  sur  $F_1$ . Le  $P_i$  est activé et, simultanément est attaqué par l'ADP pour donner l'ATP.



La vitesse de la phosphorylation oxydative est conditionnée par le besoin en ATP. Dans les conditions physiologiques le transport des électrons est étroitement lié à la synthèse de l'ATP. Le facteur le plus important qui détermine la vitesse de la phosphorylation est le taux d'ADP dans la cellule. Le transport des électrons, nécessaire à la formation du gradient de densité de protons et la synthèse de l'ATP sont deux processus couplés (Raisonnier, 2005).

### **5.3. L'inhibition de la synthèse d'ATP**

La formation de l'ATP utilise l'énergie mise en réserve par le potentiel électrochimique créé lors de la formation du gradient de densité de protons. Elle entraîne donc la dissipation de l'énergie. Par le reflux des protons vers la matrice elle permet aussi la neutralisation du gradient électrique (relaxation) (Raisonnier, 2005).

#### **5.3.1. L'Oligomycine**

C'est un antibiotique. Elle se fixe sur le canal protonique (Fo) et le bloque, empêchant ainsi le reflux des protons vers la matrice. La synthèse d'ATP et la relaxation de la membrane sont donc inhibées (Fig.21). Par voie de conséquence le transport des électrons dans la chaîne respiratoire se trouve à son tour arrêté. En résumé l'Oligomycine bloque le transport des électrons et la phosphorylation de l'ADP d'où inhibition de la phosphorylation oxydative (Raisonnier, 2005).



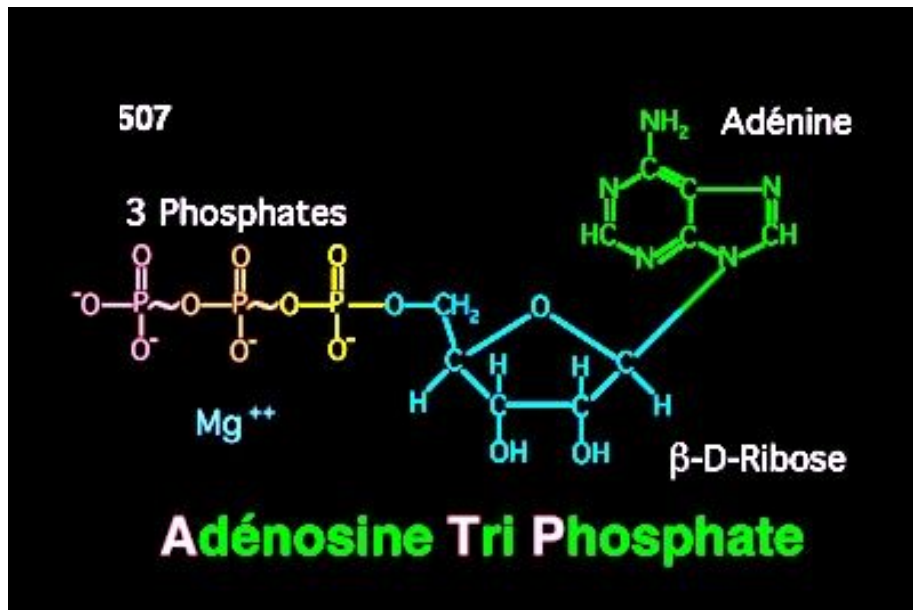


Figure 20: la structure d'ATP  
(Raisonnier, 2005).

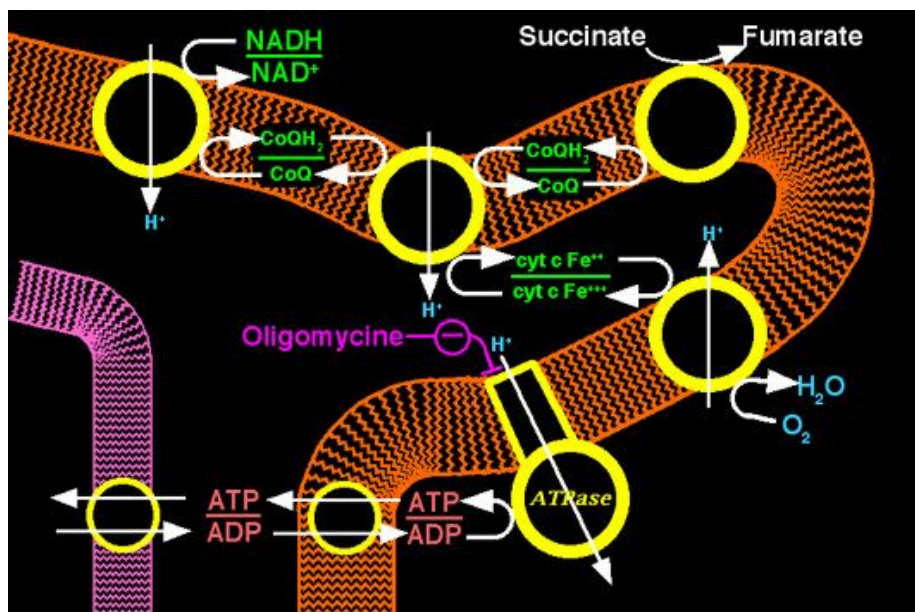


Figure 21: le site d'action d'Oligomycine  
(Raisonnier, 2005).



# *Matériel et méthodes*



## 1. Principe des mesures

Les processus de métabolisme comprenant un échange gazeux peuvent être mesurés manométriquement par la méthode Warburg. La technique Warburg est basée sur les lois des gaz. Les mesures sont effectuées dans un système fermé, c'est-à-dire l'enceinte de réaction, qui est relié à un manomètre. Toute absorption ou cession de gaz à l'intérieur de l'enceinte de réaction conduit à une modification de la pression du gaz, qui est proportionnelle à la quantité de gaz échangée. Entre la quantité de gaz échangée  $x$  et la variation de pression mesurée aux manomètres  $h$  il existe la relation:

$$x = h \cdot K \quad (1)$$

La constante propre au récipient  $K$  est fonction du volume de l'enceinte de réaction, de la température existante lors de la mesure, du volume du liquide dans l'enceinte de réaction et du pouvoir de dissolution des gaz échangés dans ce liquide à la température de l'expérience et est obtenue par:

$$K = \frac{V_g \cdot 273 / T + V_f \cdot \alpha}{P_0} \quad (2)$$

où

$V_g$  = Volume de l'enceinte de gaz fermée (volume du récipient de réaction + volume de la branche du manomètre reliant le récipient jusqu'au repère 15,0 –  $V_f$ ), en  $\mu\text{l}$ .

$V_f$  = Volume total de tous les liquides introduits en  $\mu\text{l}$ .

$T$  = Température de l'essai en K ( $0^\circ\text{K} = -273^\circ\text{C}$ ).

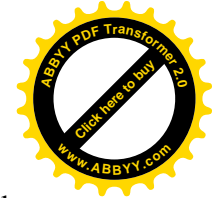
$\alpha$  = Coefficient d'absorption de Bunsen des gaz échangés.

$P_0$  = Pression normale (760mm d'Hg = 10000mm solution Brodie du liquide manométrique).

## 2. Modalités Pratiques

- Le volume de la fiole est inscrit sur le bouchon purgeur. Veiller à la correspondance entre les n° portés sur le bouchon et la fiole.

- Le volume de la branche manométrique conduisant du rodage où s'adapte la fiole jusqu'au repère 150 est inscrit sur la clef du robinet à trois voies.



- Le volume ( $V_f$ ) est égal au volume des réactifs introduits dans la fiole additionné du volume du matériel vivant (la levure).

- Le volume  $V_g$  se calcule:  $V_g = (\text{Vol. fiole} + \text{Vol. manomètre}) - V_f$ .

### 3. Préparatifs

Les produits utilisés sont de qualité analytique (Merck, Biochem Chemopharma, Acros Organics, Prolabo).

- Tampon phosphatique (PBS), pH 7.4 par mélange de 2 volumes de solution à 0.15M de potassium dihydrogénophosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), avec 8 volumes de solution à 0.15M de di-Sodium hydrogénophosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).

- Suspension de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*, SAFLEVURE) à 2% dans PBS.

- Solution de glucose à 5% dans PBS (G-PBS).

- Solution KOH 45 %.

- Solution de KCN (0.5mM), d'azide de sodium (1mM), de paraquat (5mM) dans le PBS et de 2,4-D (5mM), de la roténone (5mM), de  $\delta$ -HCH (5mM), de la quercétine (5mM) et la rutine (5mM) dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) (volume final 4%).

### 4. Conditions expérimentales

Avant l'expérience, il faut remplir le bain-marie et les manomètres, et graisser les cols rodés du manomètre et des récipients de réaction. Le bain-marie de l'appareil Warburg est à chauffer à 25°C.

#### 4.1. Préparation des manomètres

Vérifier que la quantité de liquide manométrique est suffisante dans chacune des branches du manomètre (le serrage de la vis P doit entraîner la montée du liquide dans chacune des 2 branches). Veiller à ce qu'il n'y ait pas de bulbes d'air. Graisser (vaseline) modérément mais soigneusement les rodages du robinet T, du bouchon G et de la branche latérale du manomètre. Noter le volume des fioles et des manomètres (Fig. 22).



## 4.2. Préparation des fioles d'expérience

La consommation d'oxygène par la levure de boulangerie est mesurée dans des conditions différentes: en l'absence et en présence du glucose (5%) et en l'absence et en présence du cyanure de potassium (KCN) (0.5mM), azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) (1mM), roténone, paraquat,  $\delta$ -HCH, 2,4-D, quercétine et rutine (5mM). Centrifuger la suspension levure à 3000 rpm pendant 5 minutes, réaliser une pré-incubation à 37°C en présence d'inhibiteur (roténone, 2,4-D, paraquat,  $\delta$ -HCH, quercétine et rutine) dans le DMSO (volume final 4%).

Dans 7 fioles, coincer verticalement dans la cuve centrale un morceau de papier filtrant d'environ  $1\text{cm}^2$  (agrandissement de la surface d'absorption de  $\text{CO}_2$ ) et placer dans cette cuve 200 $\mu\text{l}$  de KOH 45%. Attention la KOH ne doit pas tomber dans l'enceinte principale. Lors de la dissimilation (respiration) des cellules de levure il y'a d'une part, consommation d'oxygène et d'autre part dégagement de gaz carbonique. Pour mesurer la consommation d'oxygène, le gaz carbonique doit être éliminé par absorption dans l'hydroxyde de potassium dans l'enceinte de réaction. Dans l'enceinte principale, on introduit 1ml d'une suspension de levure à 2%, 1.5ml tampon phosphatique, pH 7.4, 0.2ml de glucose à 5%, 50 $\mu\text{l}$  (KCN ou azide de sodium ou paraquat). On introduit dans l'enceinte principale d'un récipient de réaction le même volume, en eau distillée, que celui utilisé pour l'enceinte de réaction (thermobaromètre).

Dans le cas des inhibiteurs hydrophobe (roténone, 2,4-D,  $\delta$ -HCH, quercétine et rutine), on introduit dans l'enceinte principale, 1.5ml tampon phosphatique, 0.2ml de glucose à 5% et 1ml de la suspension levure-inhibiteur.

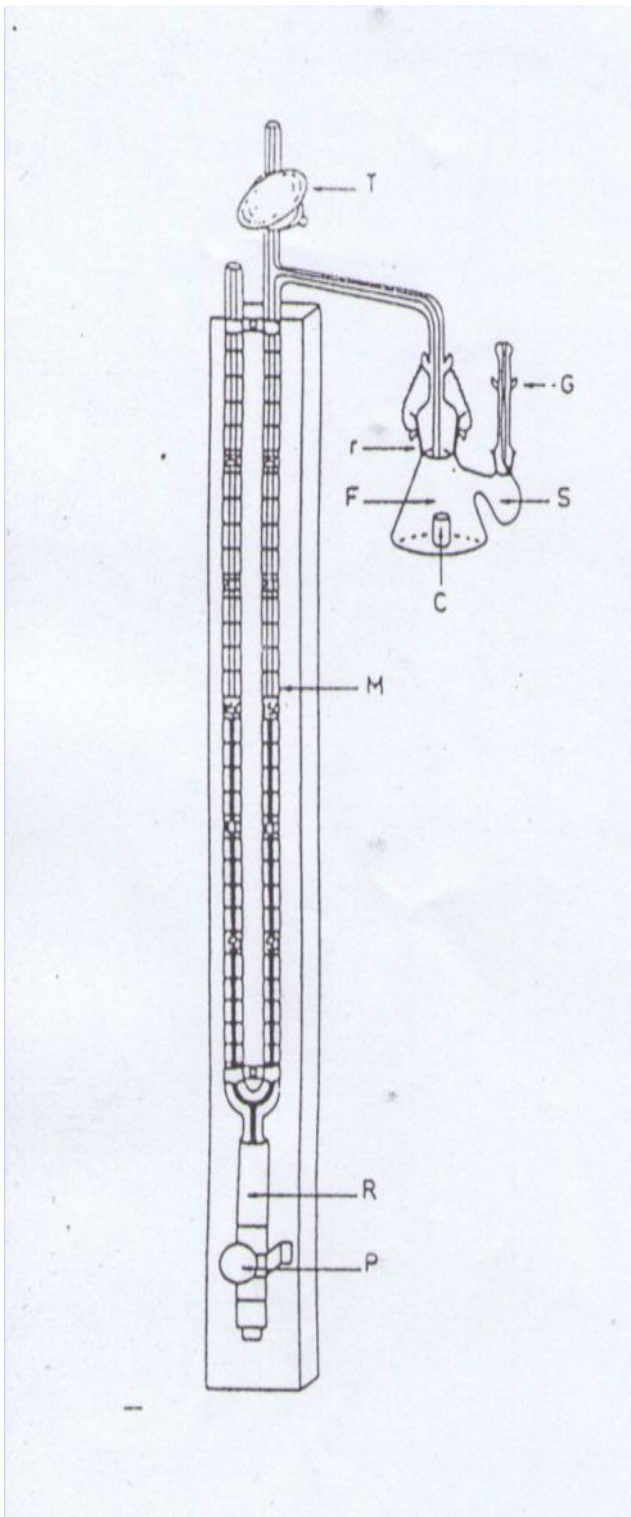
## 5. Mesure de la consommation d'oxygène

Chaque récipient de réaction est relié à un manomètre, et suspendu dans le bain-marie. Pour ce faire, il faut veiller à ce que les récipients de réaction soient immergés dans l'eau jusqu'à la mi-hauteur du col rodé. Les allonges à ampoule doivent être obturées (veiller à la position respective du bouchon du capillaire). Pour assurer une température uniforme, les récipients de réaction sont agités pendant 10 minutes et les robinets des manomètres étant ouverts.



On règle ensuite, le dispositif d'agitation étant arrêté, le liquide manométrique sur le repère 15,0 sur les branches des manomètres reliées avec les récipients de réaction. Les robinets des manomètres sont fermés, le niveau du liquide manométrique est relevé dans la branche ouverte du manomètre, ce niveau est noté et le dispositif d'agitation est remis en marche (début de l'expérience).

A des intervalles réguliers de 10 minutes, le liquide manométrique est remis à 15,0 sur chacune des branches des manomètres reliant les récipients de réaction (volume maintenu constant dans l'enceinte de réaction) et le niveau dans la branche ouverte du manomètre est relevé et noté. Après 60 minutes, l'expérience est arrêtée.



- M** – manomètre.
- R**-réservoir contenant le liquide manométrique.
- P** - pince à vis.
- G** - bouchon purgeur.
- F** - fiole détachable comprenant.
  - r- rodage normalisé s'adaptant au manomètre.
  - s - diverticule latéral.
  - c- cuve centrale pouvant recevoir la potasse.

**Figure 22:** Détail d'un manomètre de Warburg à volume constant.



## 6. Calculs

Les valeurs de mesure relevées des récipients d'essai donnent la différence en mM de liquide manométrique, provenant de la consommation d'oxygène des cellules de levure. Les modifications éventuellement observées sur le thermobaromètre indiquent les variations de pression d'air et de température pendant la durée de l'expérience. Les valeurs mesurées correspondants des récipients d'essai sont éventuellement à corriger en conséquence. Ces valeurs dites corrigées ( $h$ ), est la différence des valeurs algébriques de  $h$  lue et du thermobaromètre au même temps (Tab.02). Le coefficient d'absorption pour l'oxygène ( $\alpha_{O_2}$ ) suivant Bunsen est pour 25°C de 0.0283. On peut calculer à partir de ces valeurs l'oxygène consommé par les cellules de levure en  $\mu\text{l}$ , selon la formule:

$$x = h \cdot K$$

**Tableau 02:** Exemple d'une feuille de résultats et de correction de  $h$  lue par référence au Thermobaromètre.

Temps (min.)	Thermobaromètre		Fiole N°...		
	lecture	$h$	lecture	$h$ lue	$h$ corrigé
0	151	0	150	0	0
10	152	+1	146	-4	-5
20	156	+5	140	-10	-15





## 7. Dosage du phosphate inorganique(Pi)

### Principe

C'est un dosage spectrophotométrique basé sur le dosage de Scheneral (1956).

### Réactifs

- Acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) (6N) .....1 volume.
- Heptamolybdate d'ammonium ( $(NH_4)_6 MO_{24}, 4H_2O$  (2,5%) .....1 volume.
- Acide ascorbique (10%) .....1 volume.
- Eau distillée .....2 volume.

Le mélange doit être fait extemporanément.

### La gamme étalon

La gamme étalon est construite à partir d'une solution mère de  $KH_2PO_4$  à 0,1mg/ml de phosphate selon le tableau suivant:

**Tableau 03:** tableau de dilution de la gamme étalon du phosphate

P ( $\mu g/ml$ )	0	5	10	20
$KH_2PO_4$ ( $\mu l$ )	0	50	100	200
$\Delta H_2O$ ( $\mu l$ )	1000	950	900	800

A l'issue de l'expérience de la consommation d' $O_2$  par la levure, prélever des aliquotes de la suspension de levure à partir des cellules de réactions de l'appareil de Warburg, incubées en présence et en l'absence de l'inhibiteur (Azide 1mM et 2,4-D 5mM), puis les mettre dans des tubes à centrifuger. Passé le délai de centrifugation 3000 rpm pendant 5 minutes, prélever 0,5ml du surnageant ainsi obtenu au 1/20<sup>ème</sup> dans l'eau distillée, mettre 0,5ml de la solution témoin (PBS) dans un tube à essai et 0,5ml de la solution test dans un autre tube. Puis à chaque prise d'essai, ajouter 4ml du réactif dans tous les tubes simultanément (y compris de la gamme étalon) et agiter immédiatement chaque tube. Placer le portoir contenant les tubes au bain-marie à 40°C pendant 30 minutes. Passé le délai d'incubation, lire la densité optique de la coloration bleue obtenue à 660 nm.



## 8. Analyses statistiques

L'équation de la droite de régression est calculée, le coefficient de corrélation est comparé à 0 avec le test de *Student*. Si  $r$  est significativement différent de zéro. Les données ont été exprimées en moyennes et écart types. Les comparaisons ont été effectuées par le test de *Student*, la seuil de significativité a été fixé à 0.05.



# *Résultats*



La mesure de la consommation d'oxygène est effectuée dans un milieu physiologique PBS (phosphate balance salt) (0.15M, pH 7.4) et en présence du glucose 5%. L'effet du KCN, de  $\text{NaN}_3$ , de la roténone, du paraquat, de  $\delta\text{-HCH}$ , de 2,4-D, de la quercétine, et de la rutine sur la consommation d'oxygène est testé en incubant la suspension de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) pendant 60 minutes à 25°C.

### **1. La consommation d'oxygène par les levures en absence et en présence du glucose**

Afin de s'assurer que la consommation d'oxygène est sensiblement proportionnelle à la durée d'incubation, une série de mesures de la consommation d'oxygène est effectuée pendant le temps de 10 à 60 minutes. Les résultats montrent que la relation de proportionnalité est vérifiée pour une période d'incubation de 60 minutes (Fig. 23). Le coefficient de corrélation en l'absence du glucose, est significativement différent de 0 ( $r = 0.997$ ;  $p < 0.001$ ). Le test de *Student* appliqué sur le coefficient de corrélation avec un degré de liberté d.d.l = 10 ( $t = 40.73$ ). La droite de régression est donnée par l'équation:

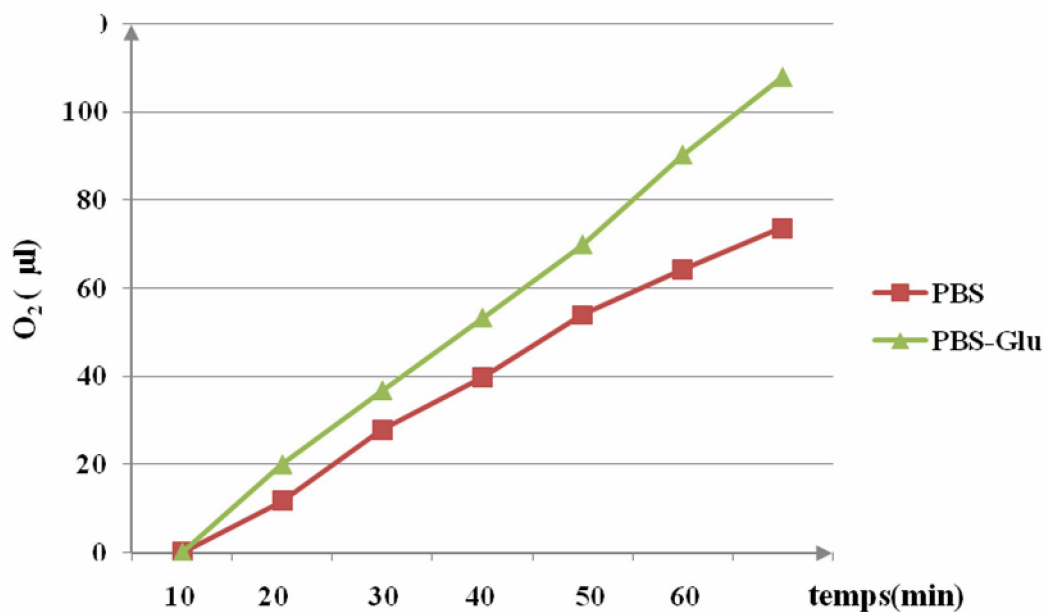
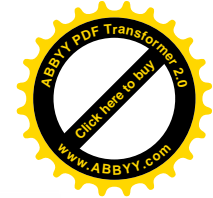
$$Q_{O_2} = 1.25 t + 1.025$$

Egalement, le coefficient de corrélation en présence du glucose est significativement différent de 0 ( $r = 0.999$ ;  $p < 0.001$ ). La droite de régression est donnée par l'équation:

$$Q_{O_2} = 1.78 t + 0.705$$

Le test de *Student* appliqué sur le coefficient de corrélation avec un degré de liberté d.d.l = 10 ( $t = 70.65$ ), montre que la liaison entre la consommation d'oxygène et le temps d'incubation est hautement significative ( $p < 0.001$ ). La linéarité de la droite permet de conclure aux bonnes conditions d'incubation (quantités suffisantes de glucose et d'oxygène). La vitesse de la consommation d'oxygène est donnée par la pente de la droite de régression: 1.78  $\mu\text{l d'O}_2/\text{min}$ .

La comparaison des consommations d'oxygène en absence et en présence de glucose, montre une différence significative ( $p < 0.01$ ). De ces résultats, on peut conclure que le glucose favorise la consommation d'oxygène par les levures.



**Figure 23:** La cinétique de la consommation d'oxygène par une suspension de levures en absence (■) et en présence du glucose 5% (▲).

## 2. La consommation d'oxygène par les levures en présence du KCN, de $\text{NaN}_3$ et de la roténone

La comparaison des consommations périodiques d' $\text{O}_2$  pendant le temps de 10 à 60 minutes en présence du KCN (5mM), de la roténone (5mM) et de  $\text{NaN}_3$  (1mM) dans le milieu PBS (Fig. 24) ou PBS-glc (Fig. 25), montre une différence significative ( $P < 0,05$ ), nous avons noté que le KCN inhibe fortement la consommation d' $\text{O}_2$  par la suspension de levure dans le milieu PBS (0,15mM) en absence et en présence du glc (5%) pour une période d'incubation de 60 minutes, le taux d'inhibition est respectivement égal à 96,9% ( $p < 0.003$ ) et 90,1% ( $p < 0.005$ ) ( $\bar{X} = 2,26 \pm 9,48$ ,  $n = 12$ ).

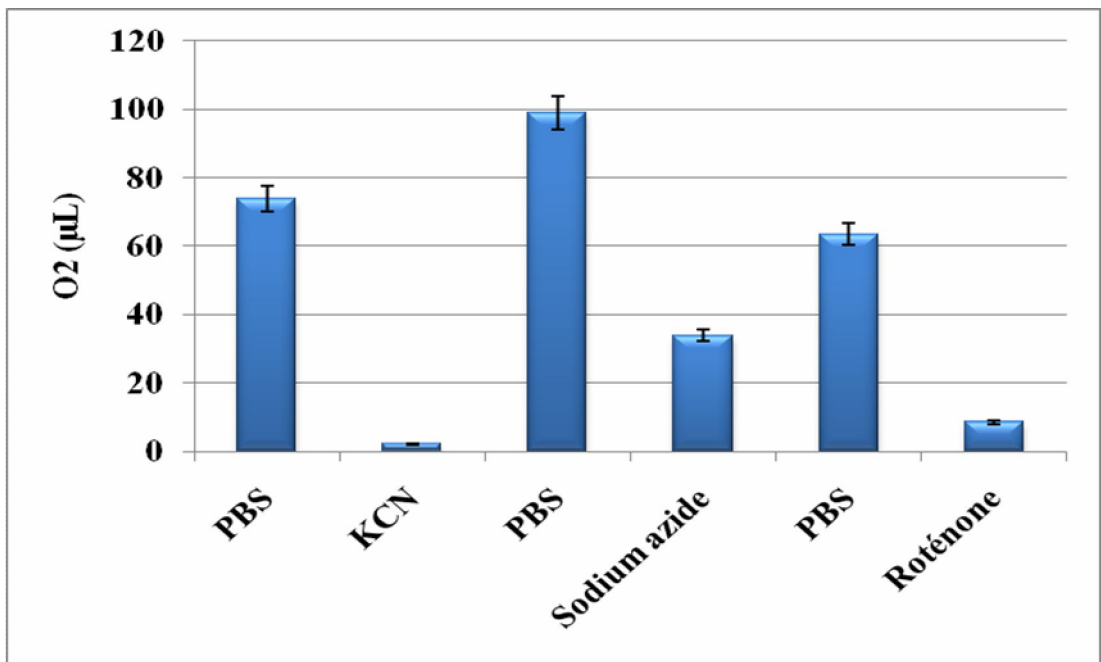
En présence de la roténone, ce taux d'inhibition est respectivement égal à 86,46% ( $p < 0,009$ ) et 83,82% ( $p < 0,013$ ) ( $\bar{X} = 8,60 \pm 6,36$ ,  $n = 12$ ). alors qu'en présence de  $\text{NaN}_3$  ce taux est égal à 65,61% ( $p < 0,022$ ) en absence de glc et 73,44% ( $p < 0,005$ ) en présence du glc (5%) ( $n = 12$ ) (Tab.04).



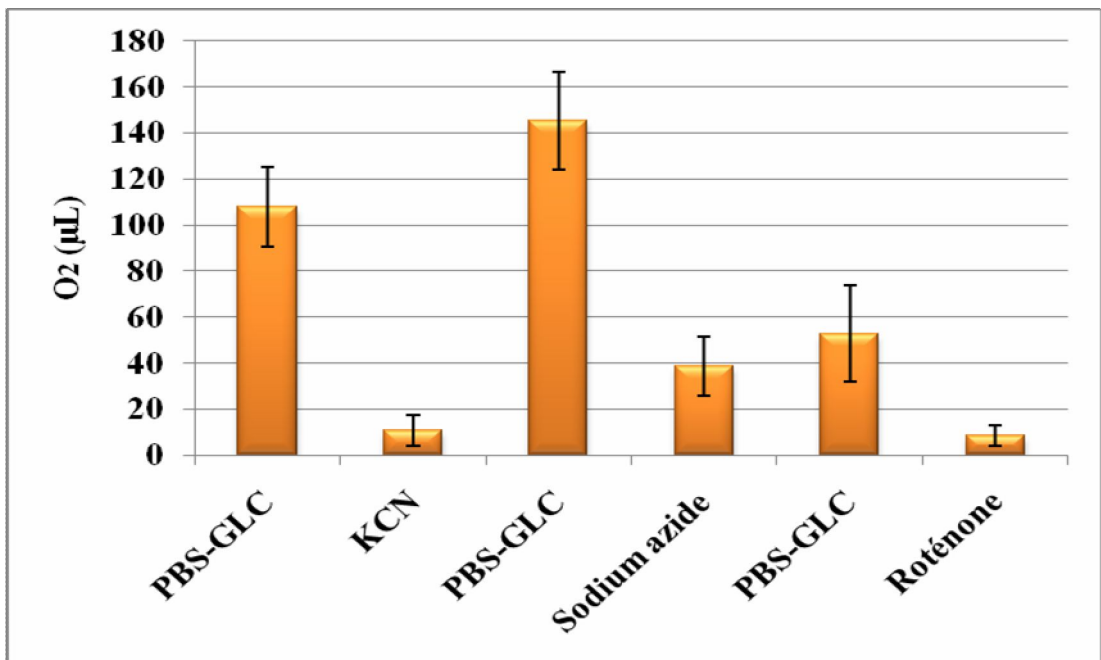
### 3. La consommation d'oxygène par les levures en présence du $\delta$ -HCH, du 2,4-D et du paraquat

L'effet d'inhibition des consommation périodique d'O<sub>2</sub> pendant le temps d'une heure dans le milieu PBS ou PBS-glc (5%) comme nous l'avons vu précédemment dans le cas du KCN, la roténone et de NaN<sub>3</sub>, le test de *student* montre une différence significative en présence du  $\delta$ -HCH (5mM) et de 2,4-D (5mM) par contre, il n'y a pas une différence significative en présence du paraquat, dont on a observé une stimulation minime de la consommation d'O<sub>2</sub> en présence et en absence du glucose et qui est de 16,94% et 11,23% respectivement ( $\bar{X} = 177,61 \pm 10,60$ , n = 12) (Fig.26, 27).

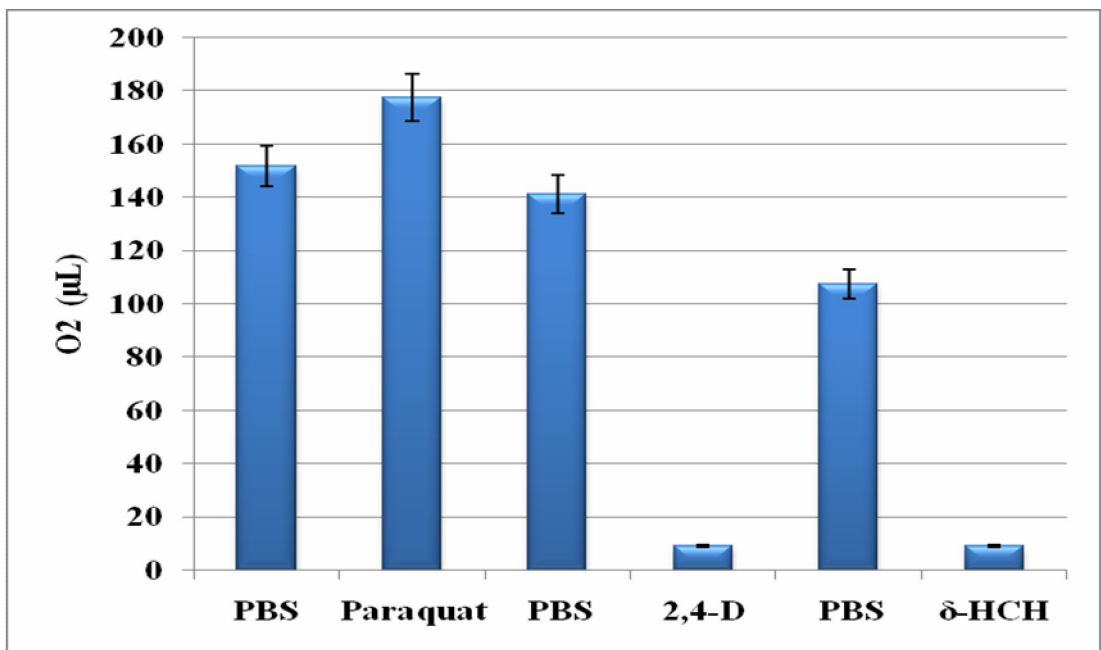
En présence de 2,4-D (5mM) et du  $\delta$ -HCH (5mM), le taux d'inhibition de la consommation d'O<sub>2</sub> est de 93,54% (P < 0,003 ;  $\bar{X} = 9.11 \pm 3.46$ ) et 91,3% (P < 0,005 ;  $\bar{X} = 9.35 \pm 10.24$ ) en absence du glc respectivement, par contre en présence du glc, ce taux est égal à 94,43% (P < 0,003) et 92,81% (P < 0,006) respectivement (n = 12) (Tab.04).



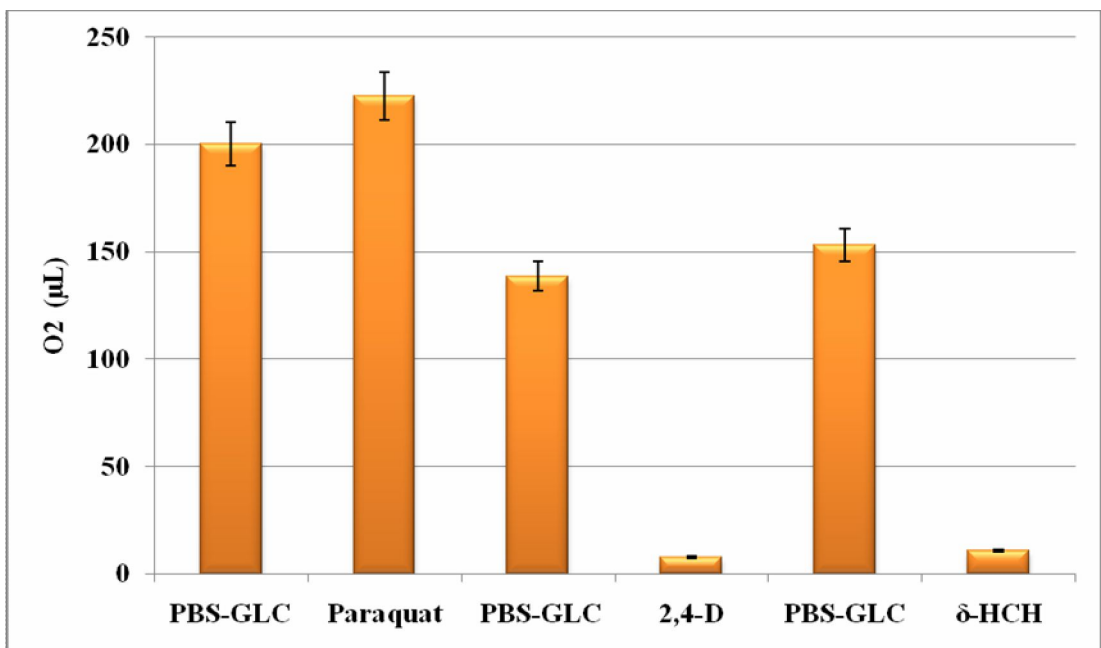
**Figure 24:** La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS en présence du KCN (5mM), de l'azide de sodium (1mM) et de la roténone (5mM).



**Figure 25:** La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS-GLC (5%) en présence du KCN (5mM), de l'azide de sodium (1mM) et de la roténone (5mM).



**Figure 26:** La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS en présence de 2,4-D (5mM), du paraquat (5mM) et du δ-HCH (5mM).



**Figure 27:** La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS-glc (5%) en présence de 2,4-D (5mM), du paraquat (5mM) et du δ-HCH (5mM).





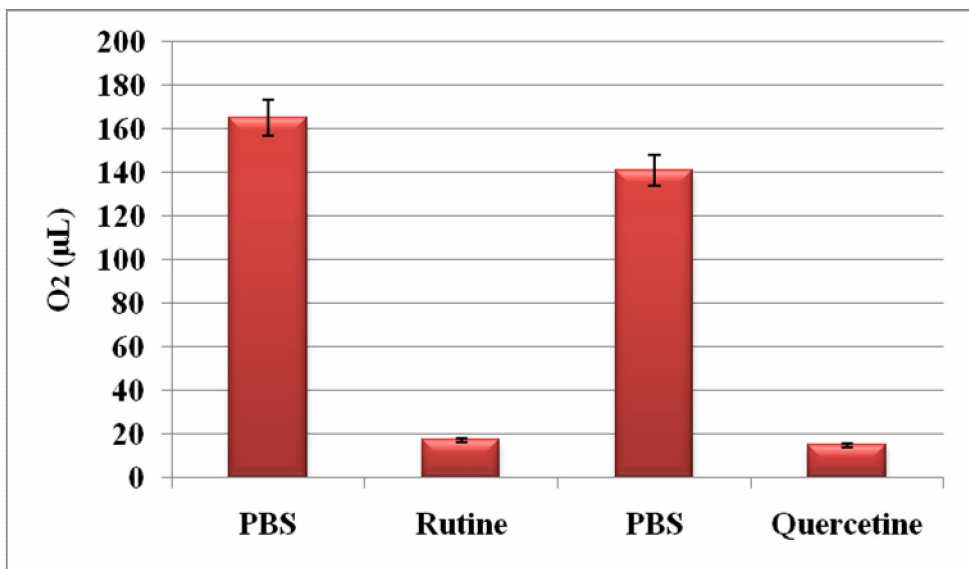
#### 4. La consommation d'oxygène par les levures en présence de la quercetine et de la rutine

La consommation d'O<sub>2</sub> est inhibée par la présence des flavonoïdes (quercetine, rutine) dans le milieu PBS en absence et en présence du glc (5%), la rutine et la quercetine ont presque le même taux d'inhibition, qui est respectivement 89,42% ( $\bar{X} = 17.47 \pm 10.88$ ) et 89,31% ( $\bar{X} = 15.06 \pm 7.11$ ) en absence du glc (5%) (Fig. 28) et en présence du glc (5%) 91,72%, 86,71%, respectivement (n = 12) (Fig.29).

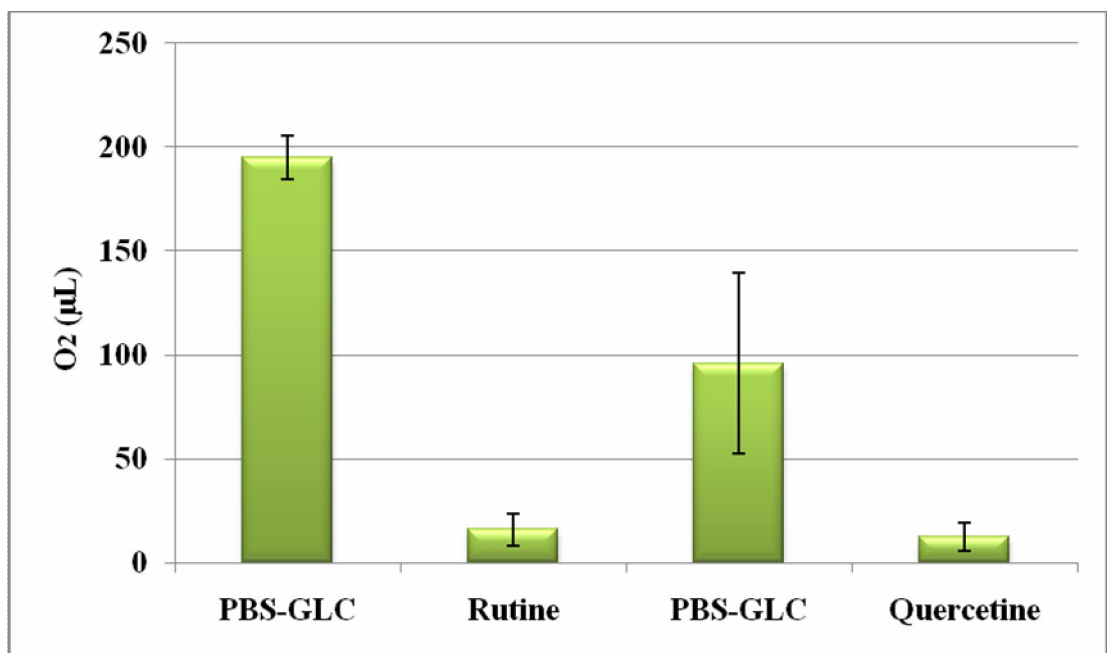
Le test de *student* montre une différence significative en présence de la rutine (p < 0,005) et la quercetine (p < 0,003) dans le milieu PBS et (p < 0,007) et (p < 0,008) dans le milieu PBS-glc (Tab.04).

**Tableau 04:** Pourcentages d'inhibitions de la consommation d'oxygène par la suspension de levure en présence et en l'absence du glucose (5%) pour une période d'incubation de 60 minutes.

Milieu	KCN (0.5mM)	NaN <sub>3</sub> (1mM)	Roténone (5 mM)	Paraquat (5 mM)	2,4-D (5mM)	δ-HCH (5mM)	Quercetine (5 mM)	Rutine (5mM)
PBS	96,9*	65,61*	86,46*	-16,94	93,54*	91,3*	89,31*	89,42*
PBS-Glucose	90,1*	73,44*	83,82*	-11,23	94,43*	92,81*	86,71*	91,72*



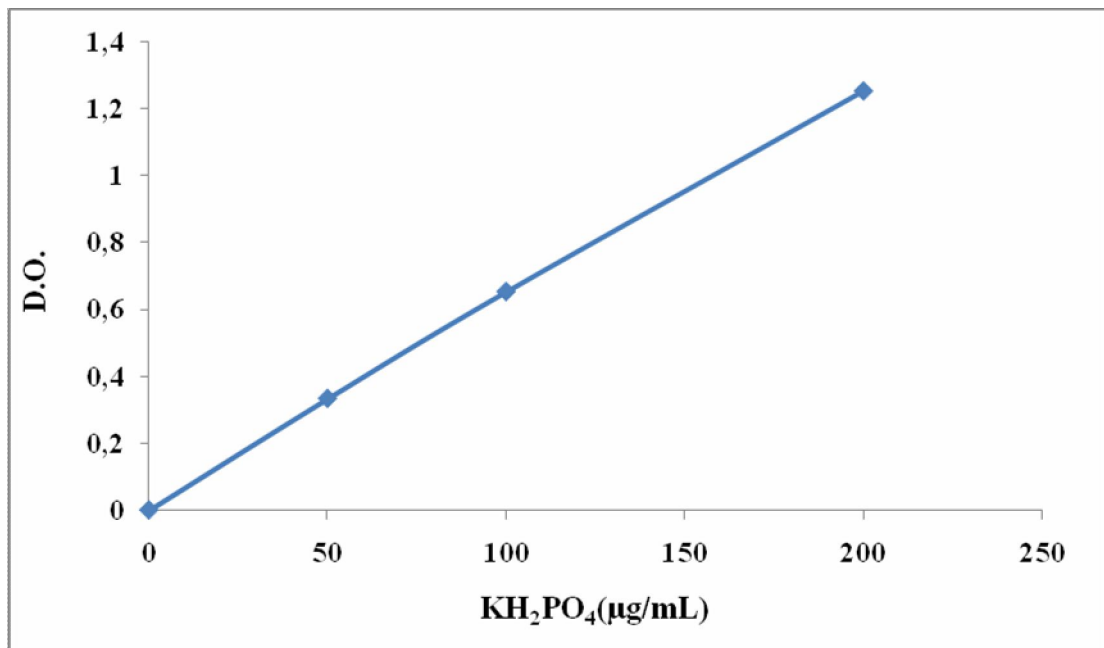
**Figure 28:** La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS en présence de la rutine (5mM) et de la quercetine (5mM).



**Figure 29:** La consommation d'oxygène par une suspension de levure dans le milieu PBS-glc (5%) en présence de la rutine (5mM) et de la quercetine (5mM).



## 5. Dosage du phosphate inorganique



**Figure 30:** Droite étalon du dosage du phosphate.

En vue de déterminer le phosphate inorganique dans la suspension de la levure à partir des cellules de réaction de l'appareil de Warburg dans le milieu PBS (0,15M), en absence et en présence d'azide de sodium (1mM) et de 2,4-D (5mM), la gamme étalon a été établie (Fig.30).

La droite de régression est donnée selon l'équation suivante:

$$Y = 1,7307 X + 0,0009; r = 0,993.$$

La fiabilité de la technique du dosage de Pi a été donnée par le rendement (%) qui est déterminée par le rapport de la valeur théorique sur la valeur expérimentale et qui est égale à  $(7,5 / 7,66) \times 100 = 97,9\%$ .

Le phosphate consommé est déterminé à partir du phosphate restant dans les fioles après la réaction (la respiration a été arrêtée dans les différentes fioles après 60 minutes d'incubation). La détermination du phosphate inorganique à partir d'une aliquote de 50 $\mu\text{l}$  de suspension de la levure, mais a révélé une quantité assez faible, en présence d'azide de sodium (1mM) est de l'ordre de 0,2 $\mu\text{M}$ /fiole, cette valeur est négligeable par



apport à la quantité de phosphate apportée par le tampon. Par contre en présence de 2,4-D (5mM), cette quantité est significativement différente ( $P < 0,001$  ;  $\bar{X} = 6,28 \pm 0,58$ ).



# *Discussion*



*S.cerevisiae* est un organisme anaérobie facultatif, qui est selon le type et la concentration de la source de carbone dans le milieu, la levure obtient l'énergie pour leur croissance (respiration ou fermentation).

La mitochondrie assure principalement la respiration cellulaire qui est un processus créateur d'ATP au cours duquel un composé inorganique (tel que l'O<sub>2</sub>) sert d'accepteur ultime d'électrons. Elle utilise l'énergie libérée par le catabolisme des glucides, des protéines et des lipides pour produire, par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire et de l'ATP-synthétase, l'ATP. La membrane interne est le site de la phosphorylation oxydative et du transport d'électrons impliqués dans la production d'ATP.

Les inhibiteurs spécifiques quand ils existent sont de bons outils. Ils ont été largement employés pour étudier le contrôle des oxydations phosphorylantes. La respiration mitochondriale peut être inhibée par l'inhibition de la chaîne respiratoire, plusieurs inhibiteurs du transfert d'électrons spécifiques sont connus utilisés pour déterminer l'ordre des composants de la chaîne respiratoire.

Dans notre travail, les mesures de la consommation d'oxygène à l'aide des manomètres de Warburg dans le milieu PBS ou PBS-glucose (5%) en présence du KCN (0.5mM) montre une forte inhibition de la consommation d'oxygène par la suspension de levures, ceci est confirmé par les travaux de Zimmer *et al.*, (1997) qui ont utilisé le KCN (0.25mM) comme un inhibiteur de la chaîne respiratoire par son ion cyanure, il inhibe la cytochrome oxydase ou complexe IV donc arrête l'utilisation par ce complexe de l'oxygène, accepteur d'hydrogène, et du cytochrome *c*, donneur d'électrons. Le ralentissement de la réoxydation du cytochrome *c* privera le complexe III de son coenzyme accepteur d'électrons ce qui va entraîner une inhibition de l'activité de cette enzyme et par suite, de l'utilisation du coenzyme *QH*<sub>2</sub>. Le manque de coenzyme *Q* oxydé va priver les complexes I et III de leur coenzyme receveur d'hydrogène et par suite, ces enzymes utiliseront moins de NADH et de succinate. Les complexes I, III et IV étant moins actifs, le pompage des protons est ralenti, d'où le ralentissement de la respiration et l'inhibition de la synthèse d'ATP à partir de l'ADP. La formation d'adénosine triphosphate (ATP) étant bloquée, il y a déviation vers la glycolyse anaérobie et production d'acide lactique. Par ailleurs, le cyanure est un inhibiteur non



spécifique de nombreuses enzymes comme: les catalases, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et la superoxydase dismutase (Boukhira *et al.*, 2007).

Dixon et Elliott (1929) a publié une communication sur l'effet du cyanure sur la respiration des tissus animaux, et déclaré que l'inhibition maximale de la respiration des tissus animaux (rein, foie, rate) par le cyanure était seulement 30-90%, William Edward van Heyningen (1935) a montré que le taux d'inhibition par le cyanure augmente rapidement avec l'augmentation de la concentration de cyanure, jusqu'à  $10^{-3}$ M. A ce stade, le taux d'inhibition varie de 75 à 85%, alors qu'à  $10^{-2}$  M ce taux d'inhibition varie en fonction de différents tissus et différents substrats de 80 à 90%. Une exception est vue dans le cas des reins du porc de guinée ou l'inhibition avec HCN  $10^{-2}$  M, n'est seulement que de 46%.

L'azide de sodium, un inhibiteur bien connu du cytochrome oxydase, bloque la chaîne respiratoire mitochondriale entre les cytochromes *a* et *a<sub>3</sub>*, de sorte que le cytochrome *a* est réduit alors que le cytochrome *a<sub>3</sub>* est oxydé (Rikhvanov *et al.*, 2001), Rikhvanov *et al.*, 2002, ont été montré que 15mM de NaN<sub>3</sub> inhibe complètement la respiration chez *S. cerevisiae* et a exercé diverses actions sur la thermotolérance de la levure selon que le métabolisme a été oxydatif ou fermentatif, en effet, le sodium azide (1mM) inhibe la consommation d'oxygène par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ceci est confirmé par les travaux de Burcham *et al.*, (1984), qui ont montré que le NaN<sub>3</sub> (2mM) bloque la consommation d'oxygène par les tissus chez *Modiolus demissus*.

La roténone et l'amytal inhibent le transport d'électrons au niveau d'une NADH déshydrogénase et empêchent une oxydation du NADH, mais oxydation du FADH<sub>2</sub> peut encore se dérouler, puisque celle-ci fournit ses électrons qui sont transportés dans la chaîne au CoQ (Hames *et al.*, 2002).

La consommation d'oxygène est inhibée en présence de la roténone 5mM dans le milieu PBS ou PBS-glc par une suspension de levure *Saccharomyces cerevisiae*, notre résultat a été confirmé par Lindahl et Oberg, (1961) dont ces derniers ont montré que la roténone inhibe l'absorption de l'oxygène en présence du pyruvate et du glutamate, mais pas en présence du succinate comme substrat, des résultats similaires ont été signalés par Fukami (1954); et Fukami et Tomizawa (1956).

la roténone inhibe la NADH-coenzyme *Q* oxidoréductase ou complexe I, ralentit l'utilisation par ce complexe du NADH, donneur d'hydrogène, et du coenzyme *Q*, receveur d'hydrogène, le ralentissement de la réduction du coenzyme *Q* privera le



complexe III de son coenzyme donneur d'hydrogène, ce qui va entraîner une inhibition de la réduction du cytochrome *c* ferrique en cytochrome *c* ferreux. Les hydrogènes apportés par le complexe II seront les seuls à parvenir au complexe III dans cette circonstance, le manque de cytochrome *c* réduit va priver la cytochrome oxydase de son coenzyme donneur d'électrons, et par suite cette enzyme utilisera moins d'oxygène, d'où le ralentissement de la respiration, les complexes I, III et IV étant moins actifs, le pompage des protons est ralenti, puisque ce transport est couplé aux réactions d'oxydation. En conséquence, le complexe  $F_0-F_1$  qui trouve l'énergie de son activité dans ce gradient de protons transmembranaire, ne pourra plus effectuer la synthèse de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique (Raisonnier, 2005.).

L'ilicicolin inhibe la respiration mitochondriale par inhibition du complexe cytochrome *bc1* et l'activité de l'ubiquinol-cytochrome *C* réductase du complexe *bc1* de la levure (Gutierrez-Cirlos *et al.*, 2004). L'oligomycine inhibe l'ATPase ou complexe  $F_0-F_1$ , arrête la phosphorylation par ce complexe de l'ADP, grâce à l'énergie fournie par le gradient de protons transmembranaire, l'atractylate inhibe la translocase qui permet la sortie de l'ATP vers l'espace intermembranaire entraîne une accumulation d'ATP dans la matrice et l'augmentation de l'ATP dans la matrice inhibe l'activité de l'ATPase, et diminue l'utilisation de l'énergie fournie par le gradient de protons transmembranaire (Raisonnier, 2005.).

Il n'est pas étonnant, si, comme on s'y attend, le paraquat (5mM) inhibe la consommation d'oxygène par les levures, que la stimulation de la respiration observée dans le milieu PBS en l'absence et en présence du glucose. Gage (1968) a montré que le paraquat n'affecte pas l'activité déshydrogénase mitochondriale à moins que la membrane mitochondriale est endommagé, bien que le paraquat est un stimulant de la consommation d'oxygène par la NADPH oxydase microsomale (Bus *et al.*, 1974). Le paraquat accepte un électron du NADPH par l'intermédiaire de la NADPH cytochrome *P450* réductase, cet électron est ensuite transféré à l'oxygène moléculaire pour engendrer le radical superoxyde, le paraquat réoxydé est alors capable d'accepter un nouvel électron pour le transférer à l'oxygène moléculaire. Donc, les transferts d'électrons se traduisent par la consommation d'oxygène.

Lorsque la capacité des fragments mitochondriaux de respirer en présence de NADH ou  $\beta$ -hydroxybutirate est inhibée par l'antimycine A, l'ajout de paraquat stimule





fortement la consommation d'oxygène, mais aucun effet n'est observé avec le succinate comme substrat (Gage, 1968). Comme on peut expliquer cette stimulation de la consommation d'O<sub>2</sub> peut être prise en évidence par la présence de l'effet découplant de ce pesticide.

Le 2,4-D et le  $\delta$ -HCH sont des molécules hydrophobes, insoluble dans le milieu aqueux (PBS), s'ils doivent traverser une membrane, il faut tenir compte de sa répartition de part et d'autre de la membrane. Cet effet nécessite cependant, pour être perçu, un prétraitement des levures en présence de 2,4-D ou de  $\delta$ -HCH dissous dans un solvant organique (DMSO à 5%) avant l'exploration de la respiration, on a réalisé ce traitement et observé une forte inhibition de la consommation d'O<sub>2</sub> en présence de 2,4-D et de  $\delta$ -HCH dans le milieu PBS en l'absence et en présence du glc (5%). Les travaux de Hiltibrant (1969) montrent une modification dans la consommation d'oxygène par les mitochondries et par conséquent son inhibition.

Les flavonoïdes sont aussi capable d'empêcher une large gamme d'enzymes, y compris phosphodiesterases (Havsteen, 1983), ATP ase (Middleton, 1984; Stenlid, 1970) succinoxidase mitochondrial et des activités NADH-oxydase (William *et al.* 1985). Les flavonoïdes comme la quercétine et la rutine sont des molécules hydrophobes, insolubles dans le milieu aqueux (PBS), préalablement, on réalise un prétraitement des levures en présence de la quercétine ou de la rutine dissoutes dans un solvant organique (DMSO à 5%) avant l'exploration de la respiration.

Les résultats de cette étude indiquent que la quercétine (5mM) et la rutine (5mM) peut induire l'inhibition de la consommation d'oxygène par la suspension de levure dans le milieu PBS en absence et en présence du glc (5%) et ce résultat à été confirmé par Ortega et Garcia (2009) qui ont montré que la quercétine peut stimuler l'inhibition de la respiration à des concentrations supérieures à 30 $\mu$ M. Le taux d'inhibition de l'activité de l'adénine translocase est de 46% en présence de la quercétine à 50 $\mu$ M.

Le processus de la phosphorylation est intimement corrélé avec la consommation d'O<sub>2</sub> selon le taux d'inhibition. (Raa and Goksøyr, 1965). cependant, il paraît que l'effet primaire de 2,4-D sur la phosphorylation oxydative des mitochondries affecte le métabolisme de l'O<sub>2</sub>. En conséquence, le 2,4-D agit comme un poison découplant typique, en provoquant l'inhibition spécifique de la phosphorylation oxydative.



L'azide de sodium et le cyanure de sodium inhibent le flux d'électrons du substrat vers l'oxygène et, le taux du phosphate par conséquent augmente dans le milieu, en indiquant que le phosphate inorganique se libère du phosphate tissulaire. Ceci peut être expliqué par l'effet du 2,4-D sur l'inhibition de la consommation d'O<sub>2</sub> avec un effet minime de la présence du phosphate inorganique dans le milieu réactionnel (Hiltibrane, 1969).



# *Conclusion*



## Conclusion

La levure *saccharomyces cerevisiae* est un organisme de référence dans la biologie cellulaire et moléculaire pour sa grande utilisation sur le plan industriel et à sa croissance rapide dans les conditions contrôlées du laboratoire.

Le fonctionnement cellulaire nécessite un apport continu d'énergie, cette dernière produite par les oxydations du métabolisme intermédiaire, est stockée sous forme d'acide adénosine triphosphorique (ATP) et distribuée aux réactions utilisatrices, par exemple les réactions en biosynthèse. Ce mécanisme a fait l'objet de nombreux travaux principalement chez les animaux et les plantes, par contre on possède peu d'information sur les champignons.

Lorsque nous sommes dans le cadre d'amélioration des ressources végétales, il faut estimer des produits qui n'affectent pas les plantes dans tous les systèmes: respiration, nutrition, photosynthèses,... et pour distinguer quelques produits concernant la mitochondrie et la chaîne respiratoire, on a choisi les pesticides et les flavonoïdes et on les a examinés sur un système expérimental levurien, *saccharomyces cerevisiae*.

L'utilisation des pesticides comme le 2,4-D et le  $\delta$ -HCH, les flavonoïdes comme la quercétine et la rutine montrent une grande inhibition de la chaîne respiratoire, alors que le paraquat favorise la consommation d'oxygène, donc on peut conclure que le 2,4-D, le  $\delta$ -HCH et les flavonoïdes ne peuvent pas être utilisés dans le cadre phytosanitaire contrairement au paraquat. Par conséquent, pour améliorer le rendement agricole en sélectionnant les produits qui n'affectent pas les plantes.

Notre étude est réalisée sur les inhibiteurs de transfert d'électrons ou des découplants de la phosphorylation oxydative, s'accordent en général sur les faits suivants:

- L'inhibition est intensifiée lorsqu'il s'agit du: KCN, la roténone, le 2,4-D, la quercétine, du  $\delta$ -HCH et la rutine.
- L'inhibition est atténuée lorsqu'il s'agit du  $\text{NaN}_3$ .

Par contre le paraquat a un léger effet stimulant apparemment sur la respiration, qui peut être expliqué par l'activité résiduelle dans les conditions anaérobies due à la



glycolyse, comme on peut expliquer que cette stimulation de la consommation d'O<sub>2</sub> provoqué par le paraquat peut être prise en évidence par la présence de l'effet découplant de ce pesticide.

Finalement, nous souhaitons approfondir notre étude en ayant recours à d'autres méthodes techniques plus fiables que la méthode de Warburg comme l'électrode de Clark où on utilise des cellules de l'oxygraphe, ou utiliser d'autres systèmes comme la photosynthèse pour agrandir les catégories des pesticides utilisables dans l'agriculture et donc améliorer les ressources végétales.



# Références bibliographiques



- Ahlers J. Cascorbi I. Forêt M. et al. (1991).** Interaction with functional membrane proteins – A common mechanism of toxicity for lipophilic environmental chemicals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 1-2, 111-113.
- Arnaud A. and Guiraud J.-P. (1993).** Le métabolisme microbien, in *Biotechnologie*, 4ème édition. *Lavoisier. Tec & Doc.* Paris. 59-180.
- Ballatori N. and Villalobos A. R. (2002).** Defining the Molecular and Cellular Basis of Toxicity Using Comparative Models. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 183, 207-220.
- Balzan R. Agius D. R. and Bannister W. H. (1999).** Cloned Prokaryotic Iron Superoxide Dismutase Protects Yeast Cells against Oxidative Stress Depending on Mitochondrial Location. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256, 63-67.
- Belin J. M. (1996).** Les levures, in *Microbiologie alimentaire tome 2, Aliments fermentés et fermentations alimentaires*, *Lavoisier, Tec & Doc*, Paris, 35-52.
- Benijts-claus C. and Persoone G. (1975).** La toxicité de trois herbicides sur l'écosystème aquatique. Centre belge d'Etude et de documentation des Eaux N° 383.
- Bizeau C. Le Quere J. M. Michel A. and Drilleau J.F. (1992).** Possibilité de modéliser la fermentation du cidre. *Cahier scientifique et technique*, 109, 15-21.
- Bocquet J. (1993).** Généralités sur les microorganismes, in *Biotechnologie*, 4ème édition, *Lavoisier, Tec & Doc*, Paris, 15-58.
- Bonvallet N. and Dor F. (2004).** Identification des dangers et valeurs toxicologiques de référence (VTR). Institut de Veille Sanitaire; p.12.
- Bonaly R. (1991).** Ultrastructure des levures, in *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris, 97-170.
- Botton B. (1991).** La physiologie des levures, in *Biotechnologie des levures*, Masson, Paris, 97-170.
- Bouix M. and Leveau J.-Y. 1993.** Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. *Tec & Doc- Lavoisier*, Paris, 2-93.
- Boukhira A. Fortin J.L. Waroux S. et al. (2007).** Tentative d'autolyse par un sel de cyanure : à propos d'un cas. *Médecine et Armées* 35 (2): 185-189.
- Brookes P.S. Digerness S.B. Parks D.A. and Darley-Usmar V. (2002).** *Free Rad. Biol. Med.* 32:1220–1228, (cite par: Ortega R. and García N. 2009).
- Brown W.M. George M. and Wilson A.C. (1979).** Rapid evolution of animal mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 76:1967-1971.
- Buchenauer H. (1987).** Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds, in *Modern selective fungicides*, Longman scientific & technical, New York, 205-232.



- Burcham J.M. Ritchie A. And Bishop S.H. (1984).** Preparation and some respiratory properties of coupled mitochondria from ribbed mussel (*Modiolus demissus*) gill tissue. *J Exp Biol* 229: 55-67.
- Bus J.S. Aust S.D. and Gibson J.E. (1974).** Superoxide -and singlet oxygen- catalysed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 58, 749-755.
- Chan M.M. Mattiacci J.A. Hwang H.S. et al. (2000).** Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem Pharmacol*; 60: 1539–1548.
- Charpentier C. (1993).** Les arrêts de fermentation : rôle de l'éthanol, résistance de la levure. *Revue française d'œnologie*, 140, 49-52.
- Colombini M. (1979).** A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature*. 279, 5714, 643-645.
- Delia-Dupuy M.L. and Strehaiano P. (1996).** La fermentation alcoolique en vinification: observations cinétiques et physiologie. *Revue française d'œnologie*, 159, 19-23.
- Dixon and Elliott. (1929).** *Biochem. J.* 23.812, (cite par: William E. van H. 1935).
- Dolinski K. and Botstein D. (2006).** Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. *Génome research*, 15, 12, 1611-1619.
- Dorta D.J. Pigoso A.A. Mingatto F.E. et al. (2005).** *Chem. Biol. Interact.* 152:67–78, (**Ortega R. and García N. 2009**).
- Dosselin R.E. Smith R.P. and Hodge H.C. (1984).** *Clinical toxicology of commercial product.* 5<sup>e</sup> edition. Williams, Baltimore M.D.
- Dreisenbach R.H. and Robertson W.O. (1987).** *Handbook of poisoning: prevention, diagnosis and treatment.* 12<sup>e</sup> edition. Appleton and Lange, Norwalk, CT.
- Drilleau J. F. (1996).** La cidrerie, in *Microbiologie alimentaire tome 2, Aliments fermentés et fermentations alimentaires, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 137-149.*
- Dueñas M. Irastorza A. Fernandez K. et al. 1994.** Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of food sciences*, 59, 5, 1060-1064.
- EdelahiD M.C. (2004).** Contribution à l'étude de dégradation in situ des pesticides par procédés d'oxydation avancés faisant intervenir le fer. Application aux herbicides phénylurées. Thèse (docteur de l'Université de Marne la Vallée). Chapitre 1 (p22-25).
- Ellenhorn M.J. and Barceloux D.G. (1988).** *Medical toxicology. Diagnosis and treatment of human poisoning.* Elsevier Science Publishing Company, New York, NY.





- Erlund I. Kosonen T. Alfthan G. et al. (2000).** Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*; 56: 545–553.
- Fang j. and Beattie D. (2003).** External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxyde. *Free Radical Biology & Medicine*. 34, 4, 478-488.
- Fdil F. (2004).** Etude de la dégradation des herbicides chlorophénoxyalcanoïques par des procédés photochimique et électrochimique. Applications environnementales. Thèse (Docteur de l'Université de Marne-La-Vallée). Chapitre 1 (p 8-25).
- Filipe P. Haigle J. Silva J.N. et al. (2004).** Anti- and pro-oxidant effects of quercetin in copper-induced low density lipoprotein oxidation. Quercetin as an effective antioxidant against pro-oxidant effects of urate. *Eur J Biochem*; 271: 1991–1999.
- Formica J.V. and Regelson W. (1995).** Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*; 33: 1061–1080.
- Franco J.L. Braga H.C. Stringari J. et al. (2007).** *Chem Res Toxicol*. 20:1919–1926, (cite par: Ortega R. and García N. 2009).
- Fukami J. (1954).** The effect of roténone on the succinic oxidase system in the muscle of the cockroach. Japanese Contribution to the Study of the Insecticide-Resistance Problem, p.190. World Health Organisation, 1957. Originally published in Japan. *J. Appl. Zool*. 119:29-37.
- Fukami J. and Tomizawa C. (1956).** Effects of roténone on the 1-glutamic oxidase system in the insects. Japanese Contribution to the study of the Insecticide-Resistance Problem, pp. 212-216. World Health Organisation, 1957. Originally published in Boytu Kagaku 21:129-133.
- Gage J. C. (1968).** The Action of Paraquat and Diquat on the Respiration of Liver Cell Fractions, Imperial Chemical Industries Ltd., Industrial Hygiene Research Laboratory, Alderley Park, Cheshire. *Biochem. J.* (1968) 109, 757.
- Gao Z. Xu H. Chen X. and Chen H. (2003).** Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. *Life Sci*. 73: 1599-607.
- Goin C. J. and Mayer V. W. (1995).** Induction of chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M by selected benzimidazole compounds. *Mutation Research*, 343, 185-199.
- Gonnet J.F. (1999).** Color effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited- 2. A colorimetric look at the solutions of cyanid co-pigmented by rutin using the CIELAB scale. *Food Chem*. 66:387-94.



- Gutierrz-Cirlos E.B. Merbitz-Zahradnik T. and Trumpower B.L. (2004).** Inhibition of the yeast cytochrome *bc1* complex ilicicolin H, a novel inhibitor that acts at the Qn site of the *bc1* Complex. *J Biol Chem* 279 (10): 8708-8714.
- Hadi M. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. p.22.
- Hames B.D. Houper N.M. and Houghton J.D. (2002).** L'essentiel en biochimie. Port Royal Livres, *Berti Editions*, Paris, pp. 420.
- Hargreaves J. A. Keon J. P. R. and Croxen R. 1996.** Molecular genetics of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis*, in *Modern fungicides and antifungal compounds*, Intercept U.K. 117-125.
- Havsteen B. (1983).** *Biochem. Pharmac.* 32. 1141, (cite par: William F. Hodnick. France S. and Kung. 1985).
- Hittibran R.C. (1969).** Oxygen and phosphate metabolism of bluegill liver mitochondria in the presence of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid derivates. *Trans Ill Acad Sci* 62:175-180.
- Hiraga K. Yamamoto S. Fukuda H. et al. (2005).** Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328, 1119-1125.
- Holasova M. Fiedlerova V. Smrcinova H. et al. (2002).** Buckwheat-the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res Int.* 35:207-11.
- Holland D.J. (1983).** Cyanide poisoning: an uncommon encounter. *J. Emerg. Nurs.* 9(3) : 138.
- Hwang G. W. Furuoya Y. Hiroshima A. et al. (2005).** Over expression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1, and Msn2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330, 378-385.
- Jackson R. S. (1994).** Wine science, principles and applications, Academic press, San Diego, California, 235-276.
- Jawiche D. (2006).** Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. (Docteur de l'institut national Polytechnique de Toulouse). Chapitre I (p 22-43).
- Kreger-van Rij N. J. W. (1984).** The yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam
- Kuntz D. (1996).** Maladies métaboliques osseuses de l'adulte : métabolisme du phosphore. Paris: Flammarion, pp. 128-138.



- Lacour T. and Dumas B. (1996).** A gene encoding a yeast equivalent of mammalian NADPH adrenodoxin oxidoreductases. *Gene*, 174, 289-292.
- Landgraf M.D. Silva S.C. and Rezende M.O. (1998).** Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid simples from peat and vermicompost. *Analytica Chimica Acta*. 368, p 155-164.
- Lardy H.A. and Ferguson M. (1969).** Oxidative phosphorylation in mitochondria. *Ann Rev Biochem* 38: 991-1034.
- Lee J. S. Huh W. K. Lee B. H. et al. (2001).** Mitochondrial NADH-cytochrome b5 reductase plays a crucial role in the reduction of Derythroascorbyl free radical in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527, 31-38.
- Lindahl P.E. and Oberg K.B. (1961).** The effect of roténone on respiration and its point of attack. *Exp. Cel. Res.* 23:228-237.
- Marozzi F.J. J.r. Kocalski A.B. and Malone M.H. (1970).** Studies on the antihistaminic effects of thymoquinone, thymohydroquinone and quercetin. *Arzneimittelforschung*; 20: 1574–1577.
- Michel A. Bizeau C. and Drilleau J. F. (1990).** Relations métaboliques entre levures impliquées dans la fermentation du cidre. *Belgian journal of food chemistry and biotechnology*, 45, 3, 98-104.
- Mitchell P. and Moyle J. (1967).** Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*; 213(72):137-139.
- Middleton E. (1984).** *Trends pharmacy*; Sci. 5. 335, (William F. Hodnick. France S. and Kung. 1985).
- Mousard C. (2002).** Biochimie structural et métabolique; médecine; pharmacie; science. *De Boeck & larcier s.a.* Boeck Université-Bruxelles, 2<sup>e</sup> édition, p. 221-224.
- Mu M.M. Chakravortty D. Sugiyama T. et al. (2001).** The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res*; 7: 431–438.
- Murray B. P. and Correia M. A. (2001).** Ubiquitin-Dependent 26S Proteasomal Pathway: A Role in the Degradation of Native Human Liver CYP3A4 Expressed in *Saccharomyces Cerevisiae*?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393, 1, 106-116.



- Nevière R. (2008).** Physiopathologie mitochondriale et syndrome septique Mitochondrial. *Réanimation* 17, 185—191
- Ng TB. Liu F. and Wang ZT. (2000).** Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci*; 66:709-23.
- Nuengchamng N. Hermans-Lokkerbol A. and Ingkaninan K. (2004).** Separation and Detection of the Antioxidant Flavonoids, Rutin and Quercetin, Using HPLC Coupled on-line With Colorimetric Detection of Antioxidant Activity, *Naresuan University*; 12(2): 25-37.
- Ohgiya S. Goda T. Hoshino T. at al. (1997).** Establishment of a Novel Host, High-Red Yeast That Stably Expresses Hamster NADPH-Cytochrome *P450* Oxidoreductase: Usefulness for Examination of the Function of Mammalian Cytochrome *P450*. *Archives of biochemistry and Biophysics*, 343, 2, 215-224.
- O'rouke B. Cortassa S. and Aon M. A. (2005).** Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)*, 20, 303-315.
- Ortega R. and García N. (2009).** The flavonoid quercetin induces changes in mitochondrial permeability by inhibiting adenine nucleotide translocase, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología. *J Bioenerg Biomembr* (2009) 41:41–47.
- Ottawa. (1987).** Environnement Canada/Agriculture Canada. Pesticide Registrant Survey. Rapport de 1986. Direction générale des produits chimiques commerciaux, Environnement Canada.
- Palmer H. Ohta M. Watanabe M. and Suzuki T. (2002).** Oxidative stress-induced cellular damage caused by UV and methyl viologen in *Euglena gracilis* and its suppression with rutin. *J Photochem Photobiol B*; 67:116-29.
- Panon G. (1997).** Cultures mixtes et séquentielles de levures cidricoles : *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*, *Hanseniaspora valbyensis* et *Metschnikowia pulcherrima*. Rôle de l'oxygène et suivi des paramètres de fermentation en milieu modèle. *Sciences des aliments*, 17, 193-217.
- Parsell D.A. and Lindquist S. (1993).** The Function of Heat- Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins, *Annu. Rev. Genet.*, vol. 27, pp. 437–49636.
- Perrin R. and Scharff J.P. (1997).** Chimie industrielle. 2ème édition, Paris. Chapitre 7 (p 873-897).



- Raa J. and Goksøyr J. (1965).** Studies on the effects of heartwood toxin  $\beta$ -thujaplicin on the metabolic of yeast. *Physiol. Plant.*, 18; 159-176.
- Raisonnier A. (2005).** Objectifs au cours de Révisions Biochimie PCEM2. Révisions Biochimie Métabolique. Univ. Paris-VI; p: 93, 95, 63-78.
- Regnault-Roger C. Philogène B. J.R. and Vincent C. (2002).** Biopesticides d'origine végétale. Edition *Tec & Doc, Lavoisier, Lander-Paris-NewYork* ; p.5, 6.
- Rikhvanov E.G. Varakina N.N. Rusaleva T.M. et al. (2001).** The effect of sodium Azide on the termotolerance of the yeasts *Saccharomyces cereviciae* and *candida albicans*. *Microbiology*, Vol.71, No.6, 2002, pp.662-665.
- Robert C. and Hiltibran. (1972).** Effects of the chlorogroups of phenoxy compounds on the oxidative phosphorylation. The transaction of the Illinois State Academy of Science. Vol.65, Nos.3 and 4.
- Rodriguez C. E. Shinyashiki M. Froines J. et al. (2004).** An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxicology*, 201,185-196.
- Saks V. and Pison C. (2009).** La bioénergétique systémique moléculaire des cellules musculaires Mécanismes de régulation de la respiration mitochondriale *in vivo* – importance des propriétés au niveau du système. Univ. Grenoble I – Joseph Fourier; p.22,23.
- Schägger H. (2002).** Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1555, 154-159.
- Shenouda N. S. Zhou C. Browning J. D. et al. (2004).** Phytoestrogens in common herbs regulate prostate cancer cell growth in vitro. *Nutr Cancer*; 49: 200–208.
- Sohn H. Y. Kwon C. S. Kwon G. S. et al. (2004).** Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicology Letters*, 151, 357-365.
- Stenlid G. (1970).** *Photochemistry*; 9, 225, (William F. Hodnick. France S. and Kung. 1985).
- Trumbeckaite S. Bernatoniene J. Majiene D. et al. (2006).** *Biomed. Pharmacother.* 60:245–248, (cite par: Ortega R. and García N. 2009).



- Van den Brink H. J. M. Van Gorcom R. F. M. Van den Hondel C. A. M. J. J. and Punt P. J. (1998).** Cytochrome *P450* Enzyme Systems in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 23, 1-17.
- Vasserot Y. (1996).** La fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae* : aspects biochimiques et physiologiques. *Revue française d'œnologie*, 159, 13-16.
- Vendelin M. Beraud N. Guerrero K. et al. (2005).** Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, 3, C757-767.
- Venturin C. Boze H. and Fahrasmane. (1994).** Influence de la concentration en glucose et en oxygène sur la capacité fermentaire de la souche *Hanseniaspora uvarum* K5. *Sciences des aliments*, 14, 321-333.
- Vigouroux-Villard A. (2006).** Niveaux d'imprégnation de la population générale aux pesticides : sélection des substances à mesurer en priorité. Rapport de stage (université de Paris), p11-14.
- Wang X. Yin C. and Wang L. (2002).** Structure–activity relationships and response–surface analysis of nitroaromatics toxicity to the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Chemosphere*, 46, 1045-1051.
- Wieser R. Adam G. and Wagner A. (1991).** Heat shock Factor-Independent Heat Control of transcription of the CTT1 Gene Encoding the cytosolic Catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, pp.12406-12411.
- William E. van H. (1935).** The inhibition of respiration by cyanide. The biochemical laboratory. Cambridge. 2036-2039.
- William F. Hodnick. France S. and Kung. (1985).** Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. *Biochem et pharmacologie*. Vol.35.No. 14.pp. 2345.2357.
- Winkel-Shirley B. (2002).** *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5:218–223, (cite par: Ortega R. and García N. 2009).
- Wright R. M. Simpson S. L. and Lanoil B. D. (1995).** pH and the cAMP-dependant protein kinase mediate growth phase induction of the cytochrome c oxidase subunit VI gene, COX6, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 214, 3, 1051- 1059.
- Yamamoto N. Moon J.H. Tsushida T. et al. (1999).** Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Arch Biochem Biophys*; 372: 347–354.



**Zimmer E. Blanchard S. Moulin G.et al. (1997).** Glucose metabolism in the yeast *Schwanniomyces castelli*: Role of phosphorylation site I and an alternative respiratory pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7): 2779-2784.



*Annexe*





**Tableau 01:** Effet du KCN, de la roténone et de l'azide de sodium sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS (0.15M) à 25°C (moyennes  $\pm$  S.D ; n = 12).

Temps (min.)	<u>Tampon phosphate 0.15 M (PBS)</u>					
	PBS	KCN (0.5 mM)	PBS	NaN <sub>3</sub> (1mM)	PBS	Roténone (5mM)
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	11,74 $\pm$ 4,53	1,89 $\pm$ 3,93	19,97 $\pm$ 18,12	8,24 $\pm$ 4,02	12,76 $\pm$ 4,57	3,57 $\pm$ 2,72
20	27,88 $\pm$ 5,60	2,29 $\pm$ 5,99	42,07 $\pm$ 32,15	16,71 $\pm$ 6,32	22,75 $\pm$ 6,35	5,30 $\pm$ 4,56
30	39,83 $\pm$ 6,36	1,62 $\pm$ 6,95	65,10 $\pm$ 43,13	14,05 $\pm$ 8,34	33,93 $\pm$ 9,45	6,43 $\pm$ 5,15
40	53,95 $\pm$ 9,56	0,33 $\pm$ 7,18	81,08 $\pm$ 54,67	25,06 $\pm$ 7,59	44,42 $\pm$ 12,85	7,48 $\pm$ 5,82
50	64,29 $\pm$ 11,12	1,25 $\pm$ 5,34	89,49 $\pm$ 59,15	27,96 $\pm$ 7,33	55,25 $\pm$ 15,21	9,77 $\pm$ 7,19
60	73,75 $\pm$ 11,17	2,26 $\pm$ 9,48	98,89 $\pm$ 20,65	34,00 $\pm$ 10,16	63,54 $\pm$ 18,45	8,60 $\pm$ 6,36

**Tableau 02:** Effet du KCN, de la roténone et de l'azide de sodium sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS-Glucose (5%) à 25°C (moyennes  $\pm$  S.D ; n = 12).

Temps (min.)	<u>Tampon phosphate 0.15 M (PBS) + Glucose 5%</u>					
	PBS	KCN (0.5 mM)	PBS	NaN <sub>3</sub> (1mM)	PBS	Roténone (5mM)
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	19,97 $\pm$ 4,82	2,29 $\pm$ 3,36	44,52 $\pm$ 11,61	6,86 $\pm$ 3,25	8,21 $\pm$ 3,67	3,91 $\pm$ 2,85
20	36,82 $\pm$ 6,66	1,25 $\pm$ 5,75	81,25 $\pm$ 20,30	13,90 $\pm$ 2,95	18,38 $\pm$ 7,84	6,48 $\pm$ 5,11
30	53,36 $\pm$ 8,65	2,13 $\pm$ 7,00	102,13 $\pm$ 21,49	22,22 $\pm$ 3,93	28,19 $\pm$ 14,67	6,84 $\pm$ 4,62
40	70,01 $\pm$ 11,62	3,64 $\pm$ 7,20	116,39 $\pm$ 18,81	27,06 $\pm$ 5,21	37,05 $\pm$ 13,84	6,60 $\pm$ 3,60
50	90,39 $\pm$ 13,57	6,54 $\pm$ 6,67	132,60 $\pm$ 20,97	31,67 $\pm$ 8,13	43,65 $\pm$ 16,51	7,22 $\pm$ 3,99
60	108,07 $\pm$ 17,25	10,66 $\pm$ 6,91	145,49 $\pm$ 21,17	38,63 $\pm$ 12,64	52,75 $\pm$ 20,79	8,53 $\pm$ 4,58



**Tableau 03:** Effet du paraquat, du  $\delta$ -HCH et de 2,4-D sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS (0.15M) à 25°C (moyennes  $\pm$  S.D ; n = 12).

Temps (min.)	<u>Tampon phosphate 0.15 M (PBS)</u>					
	PBS	Paraquat (5 Mm)	PBS	2,4-D (5mM)	PBS	$\delta$ -HCH (5mM)
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
10	30,72 $\pm$ 15,85	39,77 $\pm$ 4,96	26.89 $\pm$ 3.75	5.05 $\pm$ 1.72	20.57 $\pm$ 8.47	4.42 $\pm$ 1.96
20	63,63 $\pm$ 23,33	78,31 $\pm$ 7,64	58.32 $\pm$ 5.36	6.53 $\pm$ 2.92	40.83 $\pm$ 17.63	4.74 $\pm$ 3.64
30	94,70 $\pm$ 29,44	112,82 $\pm$ 6,24	88.51 $\pm$ 6.97	8.60 $\pm$ 3.09	66.68 $\pm$ 33.58	11.70 $\pm$ 15.68
40	117,39 $\pm$ 34,60	137,06 $\pm$ 9,98	109.51 $\pm$ 9.18	8.41 $\pm$ 3.13	78.94 $\pm$ 35.74	7.09 $\pm$ 7.70
50	136,75 $\pm$ 40,22	158,39 $\pm$ 11,11	125.13 $\pm$ 8.22	8.16 $\pm$ 3.06	93.40 $\pm$ 37.89	7.46 $\pm$ 7.50
60	151,88 $\pm$ 41,50	177,61 $\pm$ 10,60	141.22 $\pm$ 10.83	9.11 $\pm$ 3.46	107.59 $\pm$ 43.78	9.35 $\pm$ 10.24

**Tableau 04:** Effet du paraquat, du  $\delta$ -HCH et de 2,4-D sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS-Glucose (5%) à 25°C (moyennes  $\pm$  S.D ; n = 12).

Temps (min.)	<u>Tampon phosphate 0.15 M (PBS) + Glucose 5%</u>					
	PBS	Paraquat (5 mM)	PBS	2,4-D (5 mM)	PBS	$\delta$ -HCH (5mM)
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
10	37,94 $\pm$ 5,88	43,61 $\pm$ 7,31	31.49 $\pm$ 5.70	6.20 $\pm$ 2.74	24.73 $\pm$ 5.79	6.29 $\pm$ 4.25
20	67,64 $\pm$ 5,19	76,29 $\pm$ 18,12	60.75 $\pm$ 5.78	8.93 $\pm$ 3.47	56.01 $\pm$ 10.28	10.16 $\pm$ 5.88
30	107,96 $\pm$ 10,84	124,69 $\pm$ 20,70	86.68 $\pm$ 12.12	8.15 $\pm$ 3.68	85.74 $\pm$ 10.67	10.96 $\pm$ 5.95
40	145,49 $\pm$ 13,75	165,41 $\pm$ 25,44	110.43 $\pm$ 12.00	7.09 $\pm$ 4.32	112.90 $\pm$ 10.19	10.89 $\pm$ 6.41
50	176,52 $\pm$ 8,83	196,51 $\pm$ 25,25	128.83 $\pm$ 13.37	7.45 $\pm$ 4.86	135.59 $\pm$ 14.47	10.71 $\pm$ 6.79
60	200,25 $\pm$ 13,81	222,74 $\pm$ 21,95	138.67 $\pm$ 15.57	7.72 $\pm$ 5.37	153.12 $\pm$ 14.71	11.00 $\pm$ 6.91



**Tableau 05:** Effets de la rutine et de la quercetine sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS (0.15 M) à 25°C (moyennes  $\pm$  S.D ; n = 12).

Temps (min.)	<u>Tampon phosphate 0.15 M (PBS)</u>			
	PBS	Rutine (5 mM)	PBS	Quercetine (5 mM)
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	32,67 $\pm$ 4,00	7,41 $\pm$ 4,57	36,04 $\pm$ 15,73	6,64 $\pm$ 5,14
20	64,06 $\pm$ 5,19	9,65 $\pm$ 6,22	67,76 $\pm$ 16,77	12,60 $\pm$ 4,71
30	98,47 $\pm$ 7,61	11,23 $\pm$ 6,65	93,46 $\pm$ 12,42	14,66 $\pm$ 5,13
40	126,32 $\pm$ 8,55	11,53 $\pm$ 6,35	112,62 $\pm$ 14,22	13,27 $\pm$ 6,30
50	147,68 $\pm$ 10,40	16,35 $\pm$ 9,62	128,70 $\pm$ 15,05	14,42 $\pm$ 7,76
60	165,15 $\pm$ 8,89	17,47 $\pm$ 10,88	140,90 $\pm$ 17,11	15,06 $\pm$ 7,11

**Tableau 06:** Effet de la rutine et de la quercetine sur la consommation périodique (10 minutes) d'oxygène en  $\mu\text{l}$  par les levures dans le milieu PBS-Glucose (5%) à 25°C (moyennes  $\pm$  S.D ; n = 12).

Temps (min.)	<u>Tampon phosphate 0.15 M (PBS) + Glucose 5%</u>			
	PBS	Rutine (5 mM)	PBS	Quercetine (5 mM)
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	31,49 $\pm$ 7,19	6,41 $\pm$ 3,32	18,15 $\pm$ 10,88	6,25 $\pm$ 5,32
20	61,88 $\pm$ 5,49	10,35 $\pm$ 3,37	35,38 $\pm$ 20,34	9,79 $\pm$ 6,56
30	97,66 $\pm$ 8,74	12,60 $\pm$ 5,91	55,40 $\pm$ 30,11	9,17 $\pm$ 7,64
40	129,41 $\pm$ 7,85	14,04 $\pm$ 6,38	74,54 $\pm$ 38,82	11,81 $\pm$ 8,73
50	162,83 $\pm$ 9,81	14,58 $\pm$ 7,52	87,45 $\pm$ 42,65	13,16 $\pm$ 8,13
60	195,16 $\pm$ 10,33	16,14 $\pm$ 7,76	95,94 $\pm$ 43,41	12,75 $\pm$ 6,88



**Tableau 07:** Evaluation du phosphate inorganique en présence de 2,4-D (5mM) et d'azide de sodium (1mM) en milieu PBS (moyennes  $\pm$  S.D ; n = 12).

<b>P (mM)</b>		
<b>PBS (0,15M)</b>	<b>2.4-D (5mM)</b>	<b>Azide (1mM)</b>
<b>7,38<math>\pm</math>0,57</b>	<b>6,28<math>\pm</math>0,58; (P = &lt;0,001)</b>	<b>7,59<math>\pm</math>1,02</b>



## Résumé

La respiration cellulaire dépend d'un certain nombre de facteurs: métabolisme intense d'un substrat, chaîne respiratoire fonctionnelle, etc. Les processus métaboliques comprenant un échange gazeux peuvent être mesurés manométriquement par la méthode de Warburg. Pour tester l'influence de ces facteurs, la consommation d'oxygène par la levure *S.cerevisiae* sera mesurée en présence et en absence du glucose (glc) et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire.

La comparaison des consommations d'oxygène en présence et en absence du glc, montre une différence significative ( $P < 0,01$ ), donc on peut conclure que le glucose stimule la consommation d' $O_2$  par les levures. Nous avons noté que le KCN (0.5mM) inhibe fortement la consommation d' $O_2$  par la suspension de levure; que ce soit dans le milieu phosphate balance salt (PBS) ou PBS-glucose (5%) (96.9% et 90.1%,  $p < 0.01$ ), et également on observe cette inhibition en présence du roténone (5mM) dans le milieu PBS et PBS-glc (5%) (86.46%, 83.82%), alors que l'inhibition en présence de  $NaN_3$  (1mM) dans le milieu PBS et PBS-glc (5%) est à: 65.61% et 73.44% respectivement, en présence des pesticides on a observé une inhibition de la consommation d' $O_2$  dans le milieu PBS et PBS-glc (5%) pour une période d'incubation de 60 minutes à 25°C en présence de 2,4-D (5mM) (93.54% et 94.43%,  $p < 0.01$ ), et de  $\delta$ -HCH (5mM) (91.3% et 92.81%,  $P < 0.01$ ), par contre on a observé une stimulation de la consommation d' $O_2$  en présence du paraquat (5mM) (16.94%) dans le milieu PBS. On a noté aussi que les flavonoïdes ont un effet inhibiteur sur la consommation d' $O_2$ , dont en présence de la quercétine dans le milieu PBS et PBS-glc (5%) le taux d'inhibition est égale à 89.31% et 86.71% respectivement ( $P < 0.01$ ). Alors que ce taux est égal à 89.42% et 91.72% en présence de la rutine ( $P < 0.01$ ). Le taux du phosphate (Pi) dans la suspension de la levure en présence de 2,4-D (5mM) et azide de sodium (1mM) montre une différence très significative en présence du 2,4-D (5mM) ( $P < 0.001$ ).

**Mots clés:** *Saccharomyces cerevisiae*; Respiration; Flavonoïdes; Inhibiteurs; Pesticides

## Abstract

Cellular respiration depends on a certain number of factors: intense metabolism of a substrate, functional chains respiratory, etc. The metabolic processes including a gaseous exchange can be measured by the manometric method of Warburg. To test the influence of these factors, the oxygen uptake by *Saccharomyces cerevisiae* yeast will be measured in the absence and the presence of glucose and inhibitors of the respiratory chain.

The comparison of the oxygen uptakes in the absence and in the presence of glucose, shows a significant difference ( $p < 0.01$ ), therefore one can conclude that glucose supports the oxygen uptake by yeast. We noted that the KCN (0.5mM) inhibits strongly the oxygen uptake by the yeast suspension, that's in the phosphate balance salt (PBS) medium or in the PBS-glucose (5%) medium for 60 minutes of incubation at 25°C (96.93 vs. 90.14%;  $p < 0.01$ ), and also we observed this inhibition in the presence of roténone (5mM) in PBS medium and PBS-glc (5%) (86.46%, 83.82%), so that the inhibition in the presence of  $NaN_3$  (1mM) in the medium PBS and PBS-glc (5%) was 65.61% and 73.44%, respectively. In the presence of pesticides was observed an inhibition of  $O_2$  consumption in the medium PBS and PBS-glc (5%) for an incubation period of 60 minutes at 25°C in the presence of 2,4-D (5mM) (93.54% and 94.43%,  $p < 0.01$ ), and  $\delta$ -HCH (5mM), (91.3% and 92.81%,  $p < 0.01$ ). contrarily, we have observed a stimulation of the oxygen uptake (29.9%;  $p < 0.05$ ) in the presence of the paraquat (5mM), for 60 minutes of incubation at 25°C in PBS medium. It was also noted that flavonoids have an inhibitory effect on  $O_2$  consumption, which in the presence of quercetin in the PBS medium and PBS-glc (5%) the rate of inhibition is equal to 89.31% and 86.71% respectively ( $p < 0.01$ ) while this rate is equal to 89.42% and 91.72% in the presence of rutin ( $P < 0.01$ ). The rate of phosphate (Pi) in the suspension yeast in the presence of 2,4-D (5mM) and azide (1mM) showed a highly significant difference in the presence of 2,4-D (5mM) ( $P < 0.001$ ).

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*; Respiration; Flavonoids; Inhibitors; Pesticides