



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

Master : EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Option : BIOCHIMIE

Thème

Effets de la supplémentation de l' α -tocophérol à différentes doses sur l'activité de la catalase et sur l'histologie du tissu hépatique chez les souris

Présenté par :

MADA Radhia et TEFFAHI Ihssan

Soutenu le : 09 juillet 2019

Membres de jury :

M ^{me} EDDAIKRA A.	Maitre Conférences "B"	USDB1	Présidente
M ^{me} TOBAL S.	Maitre de Conférences "B"	USDB1	Examinatrice
M ^{me} ROUAKI F.	Maitre de Conférences "B"	USDB1	Promotrice
M ^{me} SLAMANI R.	Maitre de Conférences "B"	USDB1	Co-promotrice

Année Universitaire : 2018 / 2019



Dédicaces

Je dédie ce travail à ma famille TEFFAHI et aux personnes les plus

Chères au monde mes chers parents ;

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon cher père

Mon exemple éternel, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être

A ma chère grand-mère

Qui m'a accompagné par ses prières, que Dieu le tout-puissant t'accorde meilleure santé et longue vie

A mon cher frère et mes chères sœurs

Pour votre soutien et encouragements, vous occuper une place particulière dans mon cœur.

Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussite.

A mes adorables nièces « Lina, Malek et Nihal »

A mes petits neveux « Moncef, Amir, Islem et Achraf »

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur, puisse Dieu vous garder

A mon binôme pour sa patience avec moi durant toute cette période

A tous ceux qui me sont chers de près et de loin

IHSSAN



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes étoiles filantes, qui m'ont donné la vie, ceux qui m'ont éclaircie les chemins et qui exaucent mes rêves, ceux qui m'ont planté l'art de la réussite, pour leurs prières pour moi tout au long de mes études, rien que pour vous « papa et maman » que tous les mots ne suffiront de vous remercier.

À mes chères sœurs surtout ma très cher Yasmine pour son aide toute au long de ma vie

À Mon très cher frère : que dieu le protège de tout mal

À mes tantes et oncles, cousins et cousines

À mes très chères amies Athlem et Wided

À ma chère amie et binôme Lhssan ainsi qu'à toute sa famille.

Àinsi qu'aux professeurs qui nous ont accompagné tout au long de ce beau parcours.



Remerciements

Avant tout, nous remercions Allah tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens à fin d'accomplir ce modeste travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice «M^{me} Rouaki F», Maître de conférences "B" à l'université de Blida 1, qui nous a encadré et dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nos accordés nos on permet de réaliser ce travail.

Nous tenons aussi à remercier «M^{me} Slamani. R », maitre de conférences "B", chercheuse à l'institut national de la recherche à Baraki-Alger, pour avoir mis à notre disposition les moyens nécessaire à la réalisation de cette étude.

Nous voudrions remercier très chaleureusement «M^{me} Eddaikra. A », maitre de conférences "B" pour le grand honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre examinatrice« Mme Tobal S», maitre de conférences "B", pour ses précieuse remarques.

Nous tenons à exprimer notre profond remerciement à « Dr Boudour. H » Médecin pathologiste au niveau de l'hôpital Fares Yahia de Koléa pour son aide lors de la lecture des lames histologiques.

Nous remercions également « M^{me} Amroussi. M » chef de service du laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital Fares Yahia de kolea ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire.

Nous adressons notre remerciement à « M^{me} Belkadi. A », responsable de l'animalerie du laboratoire CRD (SAIDAL/ Gué de Constantine) pour sa précieuse aide ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire.

Un très grand merci à « M^{me} khaldoun », maitre de conférences "B", pour son aide.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de cette étude. Veuillez recevoir ce modeste travail comme un début de récompense de tous vos efforts.

Résumé

L'objectif de notre travail est de déterminer l'effet de la supplémentation en alpha-tocophérol (α -T) à différentes doses (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' α -T /Kg d'aliment), sur la teneur en protéines, le taux en malondialdéhyde (MDA) et l'activité enzymatique antioxydante de la catalase (CAT) du foie, ainsi que sur l'histologie hépatique chez les souris NMRI

Au terme de cette étude expérimentale, les principaux résultats obtenus montrent une diminution significative de la teneur en protéines, accompagnées d'une diminution significative de l'activité de la CAT et une augmentation significative du taux en MDA des lots supplémentés en (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' α -T / kg d'aliments) et ceci par rapport au lot témoin, ce qui montre qu'il y a eu un déséquilibre de la balance oxydante / antioxydant dû au fait que l' α -T à de telles doses n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais plutôt en tant que pro-oxydant. Enfin, l'étude histologique du foie n'a fait que confirmer l'ensemble de nos résultats.

Mots clés : alpha-tocophérol, pro-oxydant, antioxydant, foie, souris.

Abstract

The objective of our work is to determine the effect of supplementation with alpha-tocopherol (α -T) at different doses (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, and 1200 mg of α -T / kg feed), on liver protein content, the rate of malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzyme catalase activity (CAT), as well as liver histology of NMRI mice.

After this trial period, the main results show a significant decrease in the protein content, accompanied by a significant decrease in CAT activity and an increase in the MDA level of the batches supplemented with (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 and 1200 mg of α -T / kg feed) and this compared to the control group, what shows that it there with have an imbalance of the oxidizing/antioxidant balance due to the fact that l' α -T with such amounts does not have acts as an antioxidant but rather as a pro-oxidant. Finally, the histological study of the liver confirms all of our results.

Key words: alpha-tocopherol, pro-oxidant, antioxidant, liver, mice

الملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير مكملات الالفاتوكوفيرول α -T بجرعات مختلفة (700، 900، 1000، 1050، 1100، 1150، 1200 مغ \ كغ من الغذاء) على نسبة البروتينات، انزيم مضاد للأكسدة كتلاز (CAT)، و معدل المالونديالديهيد (MDA) في الكبد و كذلك الفحص النسيجي لأنسجة كبد فئران NMRI بعد هذه الفترة التجريبية، أظهرت النتائج المتحصل عليها على: انخفاض معتبر في نسبة البروتين، يرافقه انخفاض في نشاط انزيم CAT، مع ارتفاع في معدل ال MDA، وهذا عند إضافة الجرعات التالية (700، 900، 1000، 1050، 1100، 1150، و 1200 مغ من ال α -T \ كغ من الغذاء)، مما يدل على انه كان هناك خلل في توازن المؤكسد \ مضاد للأكسدة لأن ال α -T في هذه الجرعات لم يتصرف كمضاد للأكسدة ولكن كدافع للأكسدة.

وفي الأخير كانت نتائج المقاطع النسيجية للكبد مؤكدة للنتائج السابقة.

الكلمات المفتاحية: ألفا توكوفيرول، مضاد للأكسدة، دافع للأكسدة، كبد، فأر.

Glossaire

Maladie d'Alzheimer : est une pathologie neurodégénérative liée à l'âge qui se caractérise par des pertes des fonctions cognitives avec au premier plan une atteinte mnésique (Martin et *al.*, 2019).

Maladie de parkinson : est une maladie neurodégénérative la deuxième la plus courante après la maladie d'Alzheimer qui se manifeste essentiellement par des troubles moteurs s'aggravant au cours du temps, elle s'accompagne d'une raréfaction des neurones dopaminergiques dans les ganglions de base (Jeancolas et *al.*, 2016)

Fibromyalgie : est une maladie qui se caractérise par des douleurs diffuses sur une durée d'au moins trois mois et localisées dans les quatre quadrants du corps ainsi que la colonne vertébrale, une fatigue intense ou un sommeil non réparateur ou les deux, des douleurs au niveau d'au moins 11 points sur 18 points de corps surtout aux endroits d'insertion de tendons (grosses et petites articulations, région dorsale et épaules et le cou) (Goetz, 2015).

Maladie de Wilson : est une maladie génétique autosomique récessive caractérisée par une accumulation toxique de cuivre essentiellement dans le foie et le système nerveux central (Duclos-Vallée et *al.*, 2006).

Hémochromatose : est une surcharge chronique en fer d'origine génétique qui peut aller du simple excès tissulaire sans conséquences cliniques jusqu'aux situations de surcharge massive susceptibles d'affecter des organes divers et d'engager le pronostic vital. L'affection est liée, dans la majorité des cas, à une mutation du gène HFE, et beaucoup plus rarement à la mutation d'autres gènes (Guggenbuhl et *al.*, 2010).

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : Stress oxydatif

I.1. Définition4

I.2. Les radicaux libres et les espèces réactives oxydantes.....4

I.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène5

I.2.2. Les espèces réactives de l'azote.....6

I.3. Sources des radicaux libres6

I.3.1. Source endogène.....6

I.3.2. Source exogène.....7

I.4. Dommages oxydatifs des macromolécules7

I.4.1. Lipides.....8

I.4.2. Protéines.....9

I.4.3. L'acide désoxyribonucléique9

I.5. Implication du stress oxydant dans les pathologies.....11

Chapitre II : Les systèmes de défense antioxydants

II.1. Les systèmes antioxydants enzymatique..... 11

II.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques..... 13

II.3. Source des antioxydants15

Chapitre III : La vitamine E

III.1. Généralités16

III.2. Propriétés physico-chimiques.....17

III.3. Source de la vitamine E.....	17
III.4. Rôle de la vitamine E.....	17
III.5. Métabolisme de la vitamine E.....	18
III.6. Régénération de la vitamine E.....	19
III.7. Effet anti et pro oxydant de la vitamine E	19
III.7.1. L' α -tocophérol en tant qu'antioxydant.....	19
III.7.2. L' α -tocophérol en tant que prooxydant	21

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel.....	23
I.1.1. Matériel non biologique.....	23
I.1.2. Matériel biologique.....	23
I.1.2.1. Animaux étudiés.....	23
I.1.2.2. Expérimentation.....	24
I.1.2.3. Supplémentation de l'aliment.....	25
I.1.2.4. Sacrifice et prélèvement.....	26
I.2. Méthodes.....	26
I.2.1. Dosage des protéines (Lowry,1951).....	26
I.2.2. Dosage du malondialdéhyde (Draper,1993).....	28
I.2.3. Dosage de la catalase (Aebi, 1984).....	29
I.3. Etude histologique.....	30
I.4. Etude statistique.....	32

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Modification physiologique	33
II.1.1. Symptomatologie.....	33
II.1.2. Effets de la supplémentation d'un régime en α -tocophérol sur les paramètres pondéraux.....	33

II.1.2.1. Variation du poids corporel.....	33
II.1.2.2. Variation du poids du tissu hépatique.....	35
II.2. Effets de la supplémentation d'un régime en α -T sur quelques paramètres biochimiques du stress oxydant.....	36
II.3. Effet de la supplémentation d'un régime en α -T à différentes doses sur l'histologie du tissu hépatique chez les souris.....	40
Conclusion et perspectives.....	46
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

- AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés.
- ABCA1** : ATP binding cassettes de la famille A1
- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- α -T** : α - Tocophérol.
- α -T°** : Radical α -Tocophéroxyl.
- BSA** : Sérum Albumine bovine.
- BHT** : butyl-hydroxytoluène
- CAT** : Catalase.
- DO** : densité optique
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène.
- ERA** : Espèces Réactives de l'Azotes.
- EROA** : Espèces Réactives Oxygénées et Azotées.
- GPx** : Glutathion Peroxydase.
- GSH** : Glutathion.
- GSSG** : Glutathion-Disulfure.
- GR** : Glutathion Réductase.
- GS°** : Radical Thiols.
- H₂O₂** : Peroxyde D'hydrogène
- HOCl** : Acide Hypochloreux.
- H⁺** : Ion Hydrogène.
- HDL** : Lipoprotéines de haute densité.
- L°** : Radical lipidique
- LOO°** : Radical Pyroxyle.
- LOOH** : Hydroperoxydes.
- LDL** : Lipoprotéines de baisse densité.
- MDA** : Malondialdehyde.

MTP : Microsomal Triglycérides Transfert Protéine.

MMO : monoxygénasecytochrome P450

MPO : Myelopéroxydase

Mn⁺ : Ions Métalliques

NO° : Monoxyde d'azote.

NO₂ : Nitrique Dioxyde.

NOS : Nitrique Oxyde Synthase.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène.

NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NaCl : Chlorure de Sodium

O₂^{°-} : Anion Superoxyde.

OH° : Radical Hydroxyl.

¹O₂[°] : Oxygène Singlet.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

O₂ : Oxygène Moléculaire.

O₂^{°-} : Radical Superoxyde.

OH⁻ : Anion Hydroxyde.

ONAB : Office National des Aliments de Bétail.

ONOO° : Peroxynitrite.

8-OH-G : 8- hydroxy-guanine

8-OH-dG : 8 hydroxy-2' désoxyguanosine

Q 10 : Coenzyme 10

ROS : Reactive oxygen species

R° : radical initiateur

RO° : Radical Alkoxy.

ROO° : Radical Peroxyl

RL : Radical libre

RS : Régime Standard.

RSE₇₀₀ : Régime Standard supplémenté en 700 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

RSE₉₀₀ : Régime Standard supplémenté en 900 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

RSE₁₀₀₀ : Régime Standard supplémenté en 1000 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

RSE₁₀₅₀ : Régime Standard supplémenté en 1050 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment

RSE₁₁₀₀ : Régime Standard supplémenté en 1100 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment

RSE₁₁₅₀ : Régime Standard supplémenté en 1150 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment

RSE₁₂₀₀ : Régime Standard supplémenté en 1200 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment

Se : Sélénium

TBA : Acide Thiobarbiturique.

TCA : acide tétrachloroacétique

VLDL : Lipoprotéines de très basse densité.

Zn : Zinc

Liste des figures

Figure 01 : Les principales sources de génération de radicaux libres et leur catabolisme.....	4
Figure 02 : Les dommages oxydatifs provoquer par les ROS.....	7
Figure 03 : Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique.....	8
Figure 04 : Les différentes pathologies du stress oxydatif.....	10
Figure 05 : Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant.....	11
Figure 06 : Les principales enzymes antioxydantes.....	12
Figure 07 : Coopération entre les systèmes non enzymatiques et enzymatiques.....	13
Figure 08 : Structure chimique des isoformes de tocophérol et tocotrienol.....	16
Figure 09 : Métabolisme de la vitamine E.....	19
Figure 10 : Activité antioxydante de l' α -tocophérol.....	20
Figure 11 : Expérimentation animal (photo original).....	23
Figure 12 : Aliment fourni aux souris sous forme de poudre (photo original).....	25
Figure 13 : Vitamine E commercial (photo original).....	25
Figure 14 : Automate de traitement des tissus (photo original).....	30
Figure 15 : Appareil à inclusion (photo original).....	31
Figure 16 : Automate de coloration (photo original).....	32
Figure 17 : Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, et 1200 mg/kg d'aliment) sur le poids corporel des souris.....	34
Figure 18 : Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, et 1200 mg/kg d'aliment) sur le poids du tissu hépatique chez les souris.....	35

Figure 19 (A, B et C) : Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg/ kg d'aliment) sur la teneur en protéine(A), le taux en MDA (B) et l'activité de la catalase(C) chez les souris.....	37
Figure 20 : Micrographie du foie des souris des lots RS et RSE ₇₀₀ (40x, H&E) montrant : une architecture normale chez le lot RS, une désorganisation de l'architecture du foie chez le lot RSE ₇₀₀ (VCL : veine centro-lobulaire, H : hépatocyte C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides).....	42
Figure 21 : Micrographie du foie des souris de lot RSE ₉₀₀ (40x, H&E) montrant une désorganisation de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, O : œdème).....	42
Figure 22 : Micrographie du foie des souris des lots RSE ₁₀₀₀ et RSE ₁₀₅₀ et (40x, H&E) montrant une désorganisation plus importante de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, L : lyse hépatocytaire, Il : infiltration lymphocytaire).....	43
Figure 23 : Micrographie du foie des souris de lot RSE ₁₁₀₀ (40x, H&E) montrant une désorganisation plus importante de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, Il : infiltration lymphocytaire, O : œdème).....	43
Figure 24 : Micrographie du foie des souris des lots RSE ₁₁₅₀ et RSE ₁₂₀₀ (40x, H&E) montrant une désorganisation plus importante de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, L : lyse hépatocytaire, Il : infiltration lymphocytaire).....	44

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées....	15
Tableau II : La répartition des lots expérimentaux.....	24
Tableau III : Les différentes concentrations de BSA servent à préparer la courbe d'étalon pour le dosage des protéines.....	27
Tableau IV : Concentrations et quantités de réactifs nécessaires au dosage de l'activité de la catalase.....	29

Introduction

Introduction

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets délétères dans l'organisme *via* la formation des radicaux libres et d'espèces oxygénées activées. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir des globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase, capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des espèces oxygénées activées. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants.

Dans les circonstances quotidiennes normales, les espèces réactives oxydantes sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces conditions, on dit que la balance prooxydants/antioxydants est en équilibre. Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système prooxydant et est alors à l'origine d'un stress oxydant (Favier, 2003)

L'organisme dispose d'un vaste réseau d'antioxydants ou de défense qui constitué d'une part, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes qui assurent la réparation des éventuels dommages oxydatifs au niveau des lipides, protéines ou de l'ADN, d'autre part une multitude d'antioxydants proprement dits sont synthétisés par l'organisme ou le plus souvent apportés par notre alimentation. Ainsi des antioxydants comme la vitamine C ou la vitamine E se transforment eux-mêmes en radicaux libres lors de la neutralisation de certains dérivés toxiques de l'oxygène. En effet, la vitamine E seule peut, dans certaines conditions, induire la peroxydation d'acides gras ou de lipoprotéines alors que, normalement, elle prévient l'oxydation de ces mêmes lipides, ce phénomène apparemment paradoxal est lié à la formation du radical tocophéroxyl (Defraigne et Pincemail, 2008).

De nombreuses études réalisées *in vitro* ont montré qu'une supplémentation élevée en α -T a une activité prooxydative, mais très peu d'études ont examiné cet effet *in vivo*. C'est la raison pour laquelle nous avons axé notre recherche, dont l'objectif est d'étudier l'effet de la supplémentation d' α -T à différentes doses (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg/kg

d'aliments) sur quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif et sur l'histologie du tissu hépatique chez les souris albinos de souche NMRI .

Le présent travail est subdivisé en deux parties essentielles, la première partie présente une synthèse bibliographique dans laquelle nous apportons un premier chapitre qui consiste à étudier des généralités sur le stress oxydant, un second chapitre concerne les systèmes de défense antioxydants et le dernier qui est consacré à l'étude de vitamine E. La deuxième partie, la partie expérimentale, répartie en deux chapitres : le premier chapitre, matériel et méthode qui inclut les différents matériaux et les techniques utilisées, le second chapitre, résultats et discussion qui inclut les résultats obtenus et leurs discussions. Et à la fin une conclusion qui résume l'ensemble des résultats obtenus en ouvrant sur quelques perspectives.

Partie I :

Etude

bibliographique

Chapitre I : le stress oxydatif

I.1.Définition

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants – antioxydants » en faveur des oxydants (Sergent et *al.*, 2001). Ce déséquilibre endommage des macromolécules, des cellules, des tissus, des organes et l'organisme dans l'ensemble. Une fois qu'il y a des altérations à ces macromolécules, leurs fonctions essentielles dans le métabolisme cellulaire sont changées aboutissant à la manifestation de beaucoup de pathologies (Kumar et *al.*, 2017).

I.2. Les radicaux libres et les espèces réactives oxydantes

Un radical libre (RL) peut être défini comme toute espèce moléculaire instable et très réactive, qui contient un ou plusieurs électrons non appariés dans l'orbitale externe (Lobo et *al.*, 2010).

Selon Tsumbu et *al.*, (2012), il existe deux sortes de radicaux libres : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel que (O_2^- ; H_2O_2 ; $HOCl$; $OH\cdot$; 1O_2 ) et les espèces réactives de l'azote (ERN) tel que ($NO\cdot$; $ONOO^-$...) qui dérivent tous de l' O_2 (Figure 01).

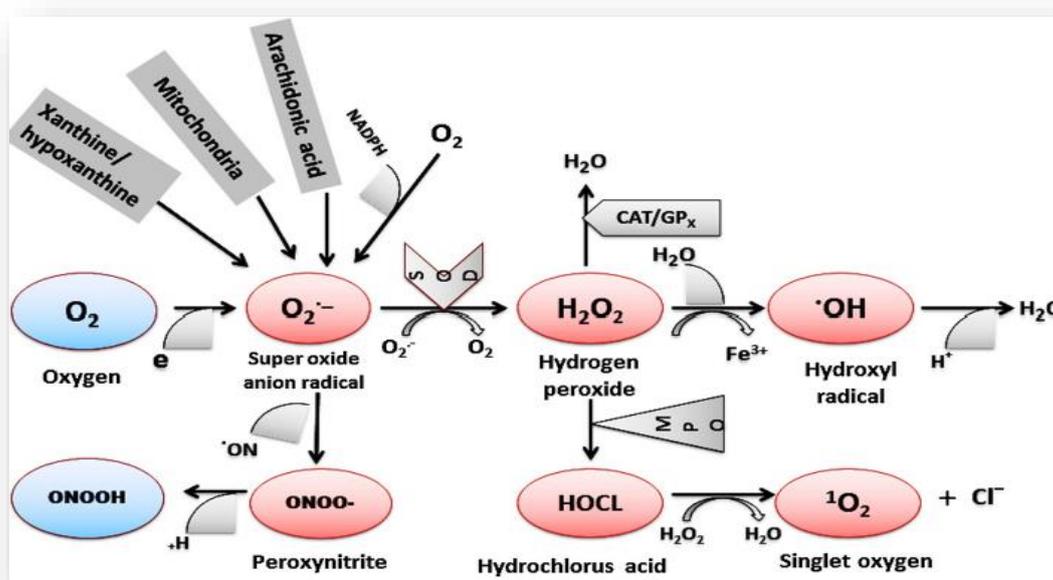


Figure 01 : Les principales sources de génération de radicaux libres et leur catabolisme (Shah et *al.*, 2014).

I.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ont été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène (Migdal et Serres, 2011). Elles peuvent être des radicaux libres, porteurs d'un électron célibataire et donc très réactifs (par exemple : les radicaux superoxydes et surtout hydroxyles), ou des espèces oxydantes non radicalaires (peroxyde d'hydrogène, acide hypochloreux, ...etc) (Gardès-Albert et *al.*, 2003). Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants (Valko et *al.*, 2007 ; Santo et *al.*, 2016).

a. Radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) : il est le principal précurseur de la plupart des ROS, généré par l'addition d'un électron à l' O_2 selon la réaction (1) : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$ (1)

Il est produit principalement dans les mitochondries, en raison d'une fuite d'électrons de la chaîne respiratoire et aussi par les réactions d'oxydations (Santo et *al.*, 2016).

b. Radical hydroxyle (OH^\bullet) : il est extrêmement puissant et réagit indifféremment avec tous les macromolécules (Van helden et *al.*, 2009). Ce radical peut oxyder un substrat selon trois modes d'action : l'arrachement d'un électron, l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique ou l'addition sur une double liaison (Migdal et Serres, 2011).

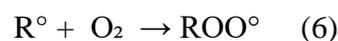
Selon Santo et *al.*, (2016), l' $O_2^{\bullet-}$ génère d'autres espèces radicalaires secondaires, en participant à la réaction d'Haber-Weiss, pour former un radical OH^\bullet et un anion hydroxylé (OH^-) selon la réaction (2) : $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + OH^\bullet + OH^-$ (2)

c. Oxygène singulet (1O_2) : il représente la forme excitée de l'oxygène moléculaire, souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Beaudeau et *al.*, 2005). Il a une demi-vie très courte (Powers et Jackson, 2008).

d. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) : est un radical libre modérément réactif. Il est formé lorsque l' $O_2^{\bullet-}$ subit à la fois la réduction univalente, comme la montre la réaction (3) (Das et Roychoudhury, 2014) : $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (3)

e. Les radicaux alcoyle (RO^\bullet) /peroxyde (ROO^\bullet) : sont des radicaux organiques formés de réactions de peroxydation lipidique. Ils ne sont pas stables, ils réagissent facilement avec l'oxygène moléculaire, créant ainsi un radical d'acide gras ROO^\bullet ou RO^\bullet (Mandelker, 2008).

La partie « R » correspond à un acide gras polyinsaturé, leur formation comprend 2 étapes principales : la première (réaction 5) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical OH° , et la seconde (réaction 6) à la liaison avec une molécule d'oxygène (McMichael, 2007 ; Powers et Jackson, 2008) .



f. L'acide hypochloreux (HClO) : est produit par les cellules phagocytaires activées principalement par les neutrophiles grâce à l'action de myéloperoxydase (MPO). Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène selon la réaction (7). Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant (Powers et Jackson, 2008) : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \rightarrow \text{HClO} + \text{HO}^-$ (7).

I.2.2. Les espèces réactives de l'azote : (EAA ou RNS : Réactive Nitrogen Species) ont été définies comme un sous-groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (Piechota-Polanczyk et Fichna, 2014).

a. L'oxyde nitrique (NO°) : est le principal dérivé réactif d'azote, il constitue la source principale pour générer d'autres RNS (Ali et *al.*, 2013). Il est synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine (Haleng et *al.*, 2007).

b. Le peroxyde nitrite (OONO^-) : est un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques. Il est formé par la réaction entre $\text{O}_2^{\circ-}$ et NO° (Haleng et *al.*, 2007).

I.3. Source des radicaux libres

I.3.1. Source endogène

Les différentes sources endogènes sont :

- ✓ produites dans la mitochondrie par la chaîne respiratoire (Phaniendra et *al.*, 2014).
- ✓ à partir de source non-mitochondrial incluant des enzymes du métabolisme (Dubois, 2015).
- ✓ Les cellules phagocytaires sont une autre source importante d'oxydants, elles libèrent des produits toxiques, qui incluent le NO° , H_2O_2 et $\text{O}_2^{\circ-}$ (Baskaran et *al.*, 2017).
- ✓ Le système microsomal monooxygénase cytochrome P450 dépendant (MMO) est l'un des principales sources des ROS dans le réticulum endoplasmique, notamment le H_2O_2 (Di Méo et *al.*, 2016 ; Zeeshan, 2016).

I.3.2. Source exogène

Il existe de nombreuses sources exogènes :

- ✓ Les rayonnements UV (ultra-violet) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres, et les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et *al.*, 2007).
- ✓ Les ions de métaux lourds, tels que le fer, le cuivre peuvent induire la génération de radicaux réactifs et provoquent des lésions cellulaires (Birben et *al.*, 2012).
- ✓ Certains médicaments comme des antibiotiques anticancéreux tels que l'anthracyclines, sont également capables de générer des RL (Valko et *al.*, 2006).
- ✓ Les antioxydants naturels comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols, sont souvent prétendus être bénéfiques pour la santé. Cependant, à des doses plus élevées ils peuvent exercer des activités pro-oxydantes toxiques (Rietjens et *al.*, 2002).

I.4. Dommages oxydatif des macromolécules

Les ROS, peuvent endommager les macromolécules comme L'ADN, les protéines et les lipides quand ils sont présents en concentrations élevées (figure 02), menant aux menaces de santé graves (Moukette et *al.*, 2015).

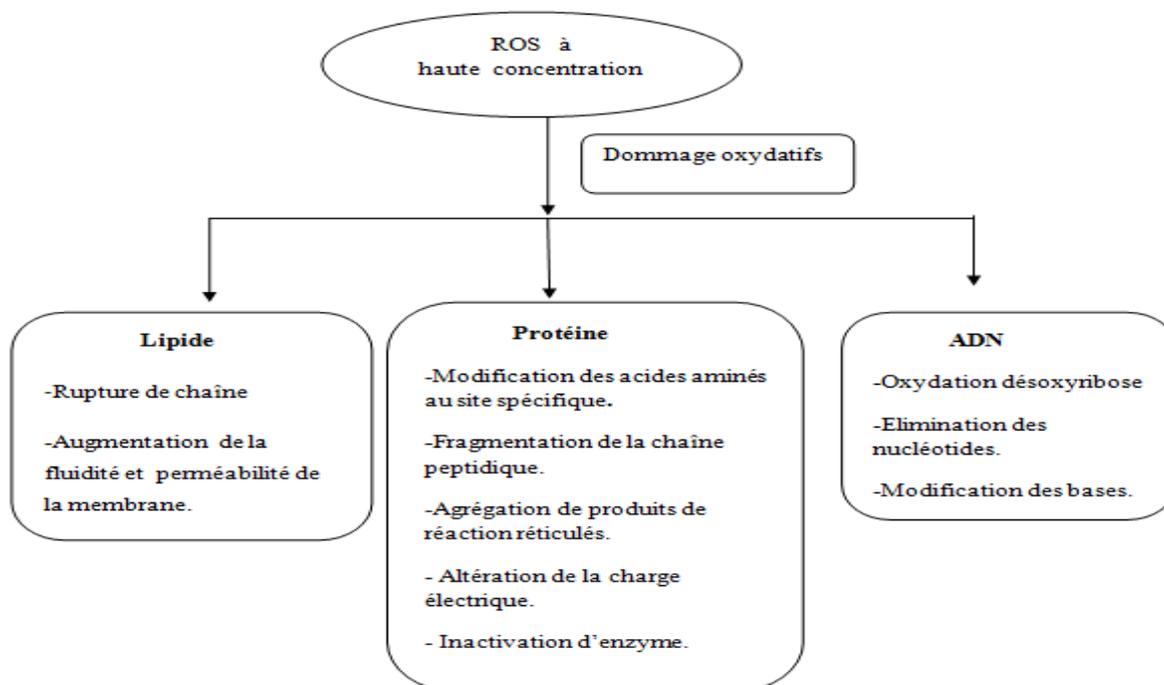


Figure 02 : Les dommages oxydatifs provoquer par les ROS (Sharma et *al.*, 2012)

I.4.1. Lipides

L'oxydation non enzymatique des lipides (*via* les ERO), appelée « peroxydation lipidique », est un processus complexe allant de la formation des produits primaires (hydroperoxydes) jusqu'à celle des produits terminaux (aldéhydes, isoprostanes). Ce processus peut créer des altérations de la membrane telles que la modification de sa fluidité, mais aussi l'inactivation de récepteurs ou d'enzymes (Michel et *al.*, 2008). Il comprend trois étapes (Figure 03): l'initiation, propagation et terminaison (Santo et *al.*, 2016)

a. Phase d'initiation : elle consiste en la rupture homolytique occasionner par un initiateur radicalaire, d'une liaison C-H de la chaine d'un acides gras, ce qui en fait un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène et qui va donc se transformer en radical ROO° (Hannebelle et *al.*, 2004).

b. Phase de propagation : au cours de cette phase le radical ROO° va arracher un hydrogène à un autre acide gras créant un nouveau radical, et entraînant ainsi une création en chaine, pour transformer en hydroperoxyde, ce dernier finira par se dégrader en aldéhyde volatiles, expliquant l'odeur nauséabonde (Hannebelle et *al.*, 2004).

c. Phase de terminaison : elle est entraînée par la création de deux radicaux pour donner une espèce moléculaire ou par intervention d'un composé antioxydant (Hannebelle et *al.*, 2004).

Les produits de peroxydation lipidique, en particulier les produits terminaux stables, tels que des aldéhydes α,β -insaturés (malondialdéhyde ou MDA, 4-hydroxynonéal ou HNE) ou les isoprostanes, peuvent être mesurés dans le plasma et les urines en tant que marqueurs du stress oxydant (Michel et *al.*, 2008).

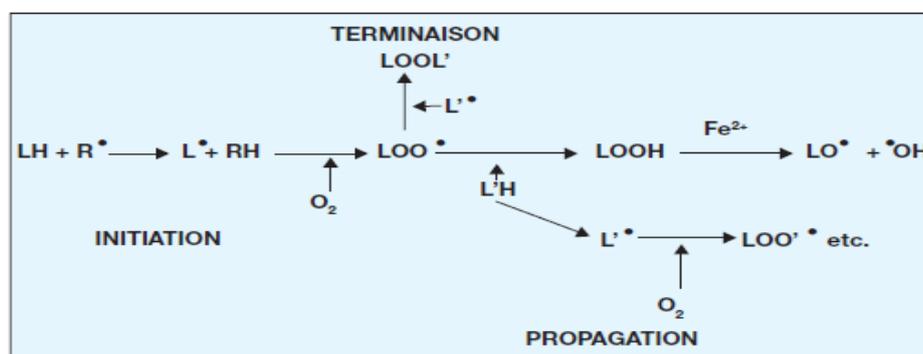


Figure 03 : Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique. (Michel et *al.*, 2008).

I.4.2. Protéines

La protéine subit différents types de modifications, qui peuvent être soit direct ou indirects. Lors des modifications directes, l'activité de la protéine est modifiée en raison de diverses modifications chimiques, telles que la nitrosation, la carboxylation, la formation de liaisons disulfures. La modification indirecte des protéines peut survenir à la suite d'une interaction avec les produits de la lipoperoxydation (Das et Roychoudhury, 2014).

Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (formation de protéines carbonylées) (Fetoui et *al.*, 2010).

Selon Sies et *al.*, (2017), les ERO peuvent oxyder les acides aminés présents dans les protéines et généralement les acides aminés aromatiques entraînant leur modification, fragmentation de la chaîne peptidique, agrégation de produits d'interaction protéines-ERO, modification des charges électriques, perte des fonctions enzymatiques, modifications de la structure protéique, et des interactions protéine- protéine .

I.4.3. L'acide désoxyribonucléique

Les ROS peuvent causer des dégâts oxydatifs à l'ADN nucléaire, l'attaque sur l'ADN aboutit à l'oxydation de désoxyribose (Sharma et *al.*, 2012).

Les ERS, et plus particulièrement le HO°, peuvent induire des cassures de l'ADN, des mutations ponctuelles (simple ou double brins) ou bien altérer les systèmes de réparation.

Les ERO peuvent induire notamment des oxydations, des nitrations ou des méthylations des bases. Parmi les oxydations des bases, la guanine peut être oxydée par le radical hydroxyle en 8-hydroxy-Guanosine (8-OH-G) aboutissant à la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) (Valko et *al.*, 2006). Un taux élevé de 8-OH-dG est l'un des principaux marqueurs d'agression oxydante dans l'ADN (Tsumbu et *al.*, 2012). Ces modifications vont ainsi perturber la transcription et la traduction par la suite, aboutissant à la formation d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ces altérations sont souvent à l'origine des phénomènes de mutagenèse, carcinogénèse ou encore de vieillissement prématuré (Valko et *al.*, 2006).

I.5. Implication du stress oxydant dans les pathologies

Un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au

développement de pathologies diverses (Defraigne et pincemail, 2008).

En fait, Plusieurs recherches, tant épidémiologiques que clinique, confirment que le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, le diabète, le vieillissement accéléré, l'asthme, l'hépatite, les dermatites, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome de détresse pulmonaire aigu, l'œdème pulmonaire (Favier, 2003 ; Favier, 2006 ; Valko *et al.*, 2007). Il est aussi un facteur de genèse de maladies plurifactorielles telles la maladie d'Alzheimer, Parkinson, les infections gastro-intestinales, ulcères, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Montagnier *et al.*, 1997).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant (figure 04) apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Sohal et Mockett, 2002).



Figure 04 : Les différentes pathologies du stress oxydatif (Rahman *et al.*, 2012).

Chapitre II : Les systèmes de défense antioxydants

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO et d'ERA. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 2014).

Les cellules utilisent ainsi de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'ERO. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Dans le système de défense antioxydant de notre organisme, on distingue des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques (figure 05) (Pincemail et *al.*, 2012).

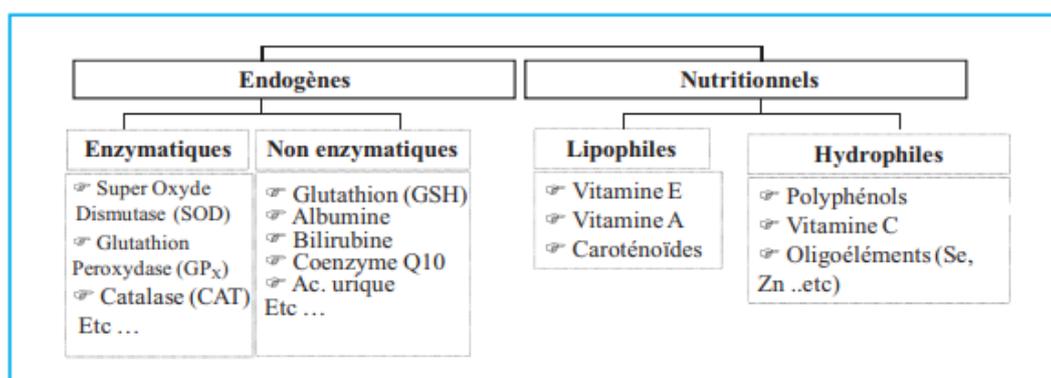


Figure 05 : Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant (Durand et *al.*, 2013).

II.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO (Ozden et *al.*, 2012) (Figure 06).

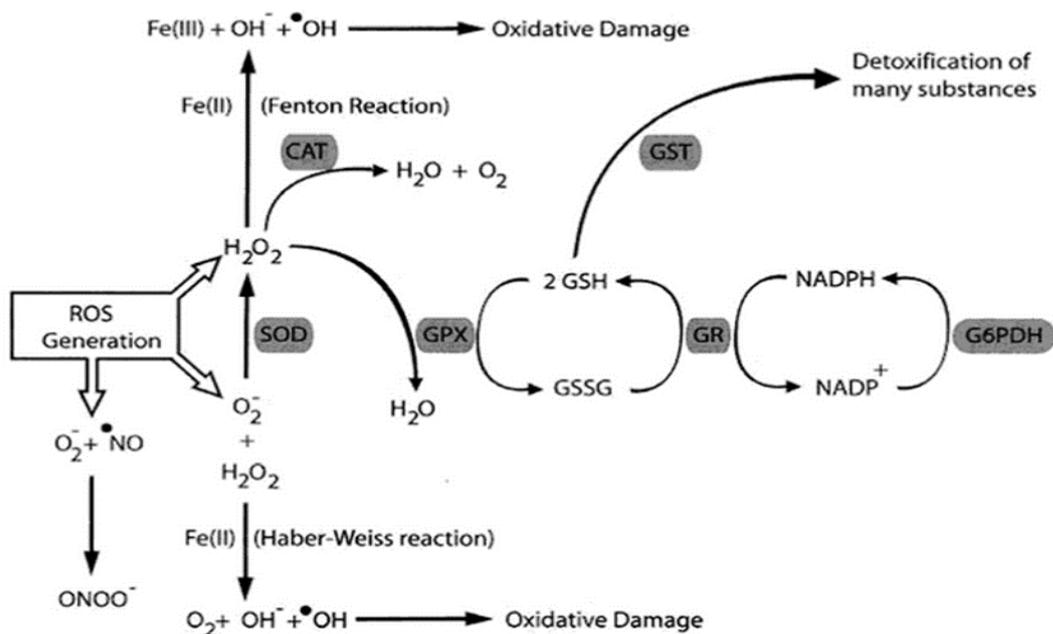
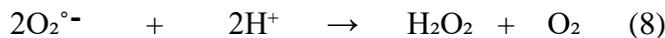


Figure 06 : Les principales enzymes antioxydantes (Hermes-Lima, 2004).

A. Superoxyde dismutase

La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en dioxygène et H_2O_2 selon la réaction (8) (Afonso et *al.*, 2007) :



Elle constitue une première ligne de défense très efficace en empêchant l'accumulation cellulaire d'anion $O_2^{\bullet-}$. Il existe trois isoformes de SOD qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique. Il s'agit de : la Cu/Zn-SOD1, associée aux ions cuivre et zinc, localisée dans le cytosol et la membrane mitochondriale ; la Mn-SOD2, associée au manganèse, localisée dans la mitochondrie et la Cu/Zn-SOD3, de localisation extracellulaire (Sentman et *al.*, 2006).

B. Catalase

La CAT est composé de quatre sous unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec le Fe^{3+} lié au site actif. (Bonfont- Rousselot et *al.*, 2003), elle est contenue dans les peroxysomes et dans le cytosol et agit en synergie avec le SOD puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction (9) (Feierabend, 2005) :



C. Glutathion peroxydase

La (GPx) est une enzyme dépendante du sélénium qui a une forte affinité pour le H₂O₂ et permet son élimination, même présent à faible concentration selon la réaction (10). Le maintien de l'activité de la GPx nécessite la régénération du glutathion (GSH) assurée par la glutathion réductase (Bédane, 2008) : $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ (10)

D. La glutathion réductase

La glutathion réductase (GR) est une flavoprotéine oxydoréductase qui utilise NADPH en tant que réducteur pour réduire le GSSG en GSH selon la réaction (11) (Das et Roychoudhury, 2014) : $\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$ (11)

II.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme les oligoéléments (Zn, Cu,...etc.), les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Kinsky, 1989).

A. La Vitamine E (tocophérol)

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, en raison de sa longue chaîne aliphatique comportant 16 atomes de carbone, ce qui le différencie nettement de l'ascorbate qui, lui est hydrosoluble. L' α -tocophérol est donc localisé parmi les chaînes d'acides gras des phospholipides constituant les membranes et les lipoprotéines (Surai, 2002) où il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande (Annahazi et *al.*, 2007).

B. La vitamine C (acide ascorbique)

C'est un antioxydant puissant agit comme un piègeur de ROS pour empêcher, ou au moins atténuer les effets délétères causés par les ROS. Elle agit en synergie avec la vitamine E pour éliminer les radicaux libres et régénère également la forme réduite de la vitamine E (Figure 07) (Foyer et Noctor, 2005).

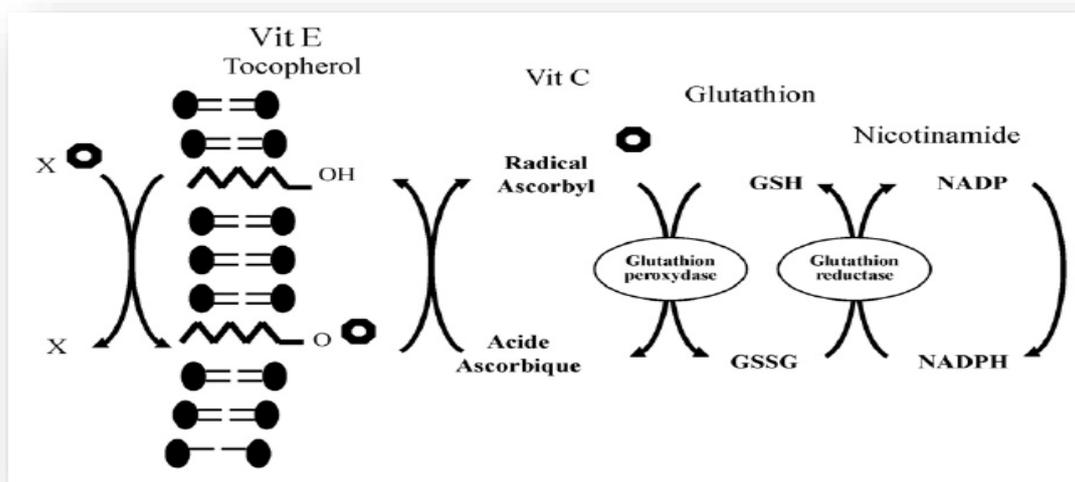


Figure 07 : Coopération entre les systèmes non enzymatiques et enzymatiques (Leverve, 2009).

C. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules dont la structure chimique est constituée de 40 carbones qui agissent en tant qu'antioxydant en bloquant les radicaux libres (Collins, 2001). Ils sont capables de réagir avec les radicaux libres de trois manières : par le transfert d'électron, d'hydrogène ou par la liaison avec le radical. Ils sont également capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Hermes-Lima, 2004).

Il existe plusieurs membres dans le groupe des caroténoïdes, mais le caroténoïde le plus connu et étudié est le β -carotène, qui est un puissant antioxydant capable d'étancher rapidement l' 1O_2 (Fusco et al., 2007).

D. Les ubiquinones et cytochrome c

Le coenzyme Q10 ou ubiquinol est un transporteur d'électrons présent dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipoperoxydation (Powers et Jackson, 2008).

E. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires grâce à la réaction catalysée par la GPx. Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de deux vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C (Powers et Jackson, 2008).

F. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ils ne sont pas eux-mêmes des antioxydants, mais toutes les enzymes antioxydantes requièrent l'un de ces oligoéléments en tant que cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse ; la SOD cytosolique de Cu et de Zn ; la catalase du fer et la GPx de sélénium (Buldak et *al.*, 2014).

G. Acide urique/ urate

L'acide urique est issu du catabolisme des bases puriques. Comme pour tout couple acido-basique l'une ou l'autre des formes est prépondérante selon le pH du milieu : au pH physiologique la forme ionisée, l'urate est prépondérant. Il agit comme un donneur d'électrons capable ainsi de stabiliser les radicaux HO°, ROO°, et 1O₂° (Powers et Jackson, 2008)

H. Bilirubine

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes (ex : hémoglobine), ses propriétés anti oxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux ROO° et contre le H₂O₂ (Powers et Jackson, 2008).

II.3. Sources des antioxydants

Les différentes sources d'antioxydants sont portées dans Tableau I :

Tableau I : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
β-Carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huitres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de la cystéine, glutathion	Caséine, lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou, Œufs, poissons, viandes

(Koechlin-Ramonatxo, 2006)

Chapitre III : la vitamine E

III.1. Généralités

La vitamine E est un groupe d'antioxydants, solubles dans les lipides, trouvés dans toutes les membranes cellulaires (Grimm et *al.*, 2016). Elle est capable d'empêcher la peroxydation lipidique (Duncan et *al.*, 2017). La vitamine E existe sous multiples formes naturelles (figure 08), qui comprennent : l' α -tocophérol (α -T), le β -tocophérol, le γ -tocophérol, et de δ -tocophérol ainsi que les formes de tocotriénols de chacun d'entre eux (Cook-Mills et *al.*, 2010), elle est composé d'un anneau cyclique 6-chromanol et d'une chaîne latérale de 16-carbone. Cette chaîne est saturée pour les tocophérols et insaturée avec trois doubles liaisons pour les tocotriénols (les carbones 3, 7 et 11). La différence entre les deux structures est la position des substituant méthyle (Suárez-Jiménez et *al.*, 2016). Le groupe hydroxyle dans la position 6 de l'anneau du chromanol est le site actif impliqué dans la donation d'atome H, tandis que la chaîne latérale est impliquée dans l'amarrage des isomères dans la structure des lipides membranaires (Amrogini et *al.*, 2016).

L' α -T est la forme prédominante de la vitamine E dans les tissus et le plasma humain, elle est considérée comme l'antioxydant le plus effectif (Sánchez-Sevilla et *al.*, 2016).

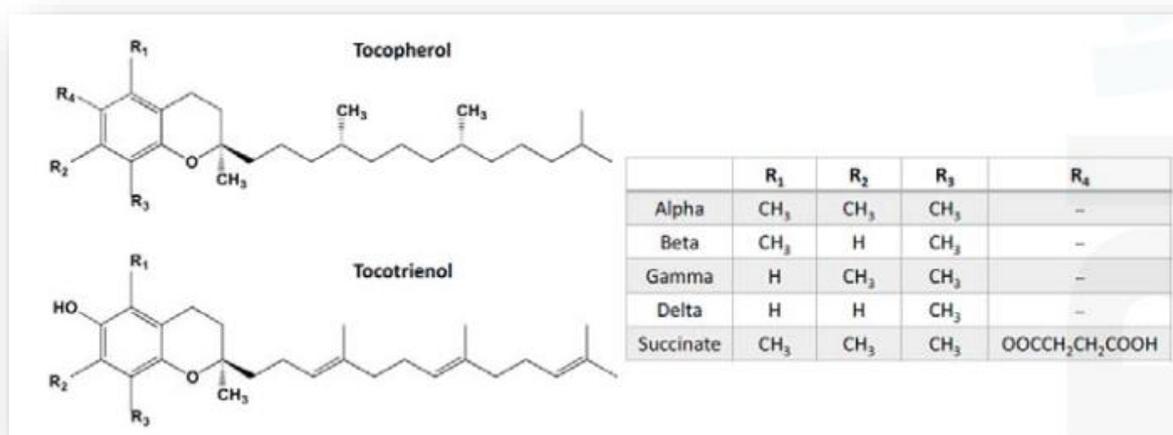


Figure 08: Structure chimique des isoformes de tocophérol et tocotriénol (nukala et *al.*, 2018).

III .2. Propriétés physico-chimique

Toutes les huit formes de la vitamine E se présentent, à la température ambiante, sous la forme d'une huile visqueuse d'une couleur jaune pâle, elles sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques). Elles sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases. Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de l' α -T sont relativement stables (Bourgeois, 2003).

III.3. Source de la vitamine E

La vitamine E, qui consiste en un mélange de tocophérols et de tocotriénols, est disponible dans un certain nombre d'aliments et de plantes, allant des huiles alimentaires aux noix (Sheppard et *al.*, 1993 ; Ramaswamy et *al.*, 2012).

Kodak et *al.*, (2018) présentent les résultats d'une des espèces de noix les plus importantes au monde, l'amandier. Les amandes présentent les taux les plus élevés de tocophérols parmi toutes les noix, en fonction du génotype et de l'environnement. Les autres sources comprennent le seigle, l'amarante, la noix, la noisette, le pavot, le carthame, le maïs et les pépins de raisin et de citrouille. La vitamine E dérivative a également été détectée dans le lait maternel (Kobayachi et *al.*, 1975) les dattes de palme, le son de riz et l'huile d'annatto (Nehdi et *al.*, 2010).

III.4. Rôle de la vitamine E

Le rôle essentiel de la vitamine E dans le système de défense a été réévalué par le Comité Européenne D'experts de la Sécurité (CEES), qui a conclu que le comité scientifique indique que «la vitamine E contribue à la protection des constituants cellulaires des dommages oxydatifs *in vivo* et *in vitro* » (Raederstorff et *al.*, 2015).

Il est reconnu que la vitamine E est le principal antioxydant brisant les chaînes liposoluble présent dans le corps humain. Outre ses propriétés antioxydantes, les molécules de la famille de la vitamine E exercent une activité antiathérogène et anti-inflammatoire (El hadi et *al.*, 2017)

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer dans les membranes biologiques riches en acide gras polyinsaturé (AGPI), ou elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les ROS. (Landrier, 2011).

La vitamine E joue un rôle central dans la modulation de l'activité des enzymes, la multiplication cellulaire, la réponse inflammatoire, la transduction du signal et l'expression des gènes. (Qu et *al.*, 2016).

Une autre fonction antioxydante de la vitamine E est d'inhiber l'agrégation plaquettaire (Suárez-Jiménez et al, 2016), et elle est utilisée dans la prévention du cancer et du diabète (Lippmann et *al.*, 2009 ; Suksomboon et *al.*, 2011).

III.5. Métabolisme de la vitamine E

La vitamine E n'est pas dégradée dans le haut du tube digestif humain. Seule une partie de la vitamine E contenue dans les aliments est absorbée. La digestion de la vitamine E suit celle des lipides alimentaires. Elle est incorporée dans les micelles mixtes issues de la digestion des lipides et est absorbée dans le duodénum. Il est admis que la vitamine E est incorporée sous forme libre dans les chylomicrons, ce processus implique la MTP (microsomal triglycérides transfert protein). En cas de faible apport alimentaire des lipides ne permettant pas la sécrétion de chylomicrons, une partie de la vitamine E semble être excrétée dans les HDL d'origine intestinale par un transporteur de la famille des ATP binding cassettes de la famille A1 (ABCA1) (Anwar et *al.*, 2007). La vitamine E restant dans les chylomicrons résiduels, c'est à dire celle qui n'a pas échangée avec d'autres lipoprotéines ou distribuée aux tissus périphériques lors de la lipolyse par les lipases endothéliales, est captée par le foie (figure 09) (Lindsay et Astley, 2002).

L'a-T est incorporée dans les lipoprotéines à plus faible densité (Very Low Density Lipoprotéine : VLDL), selon un mécanisme non élucidé, ce qui va permettre sa distribution aux tissus périphériques (Lindsay et Astley, 2002).

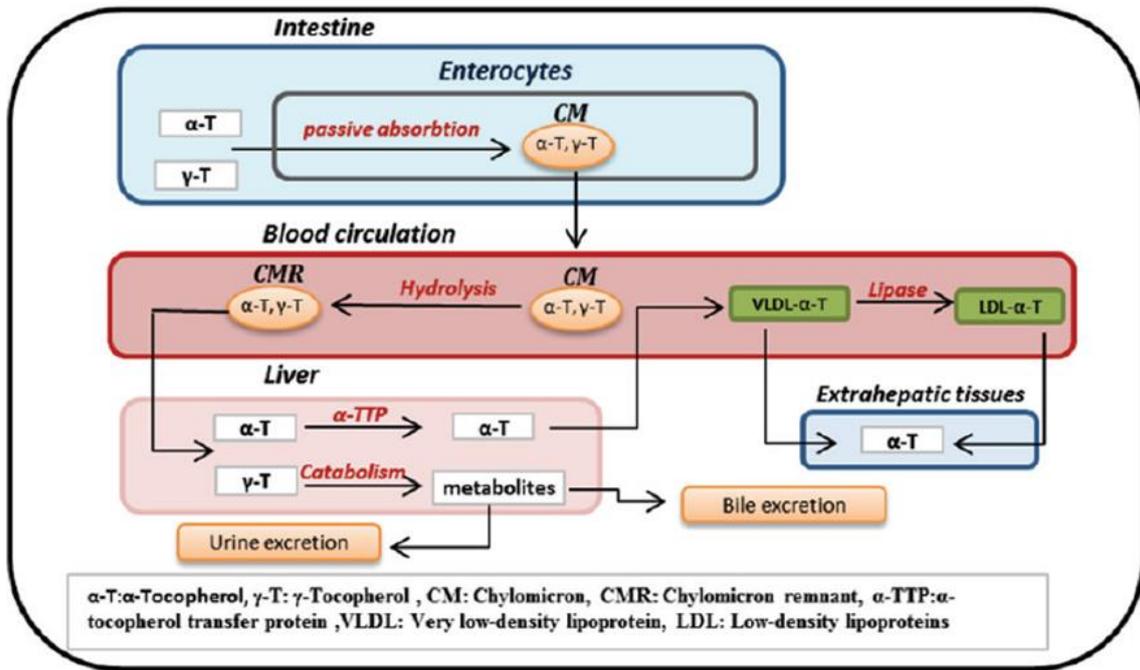


Figure 09 : Métabolisme de la vitamine E (Albahrani et Greaves, 2016).

III.6. La régénération de la vitamine E

Le ROO° va se combiner avec les acides gras de la queue de la vitamine E arrêtant ainsi de retirer les électrons d'acides gras des membranes. Donc, la vitamine E, par suite à ses caractéristiques structurales, agit comme l'interrupteur de chaîne (Miguel et *al.*, 2017).

La vitamine E radicalaire est régénérée par la vitamine C à l'interface cytosolique de la membrane, et l'interaction entre l'acrobate et le radical tocophéroxyl ($\alpha\text{-T}^\bullet$) serait facilitée par le positionnement d'un noyau chromanoxyle à proximité de la surface de la membrane, la queue du tocopérol est bien ancrée dans la double couche lipidique et le noyau chromanol « flotte » comme un cerf-volant au contact de l'interface phase aqueuse/phase lipidique afin de rendre accessible à l'acrobate (Guilland, 2011).

III.7. Effet anti et prooxydant de la vitamine E

III.7.1. L' α-tocophérol en tant qu'antioxydant

La vitamine E est largement reconnue comme l'un des antioxydants les plus puissants de la nature (Peh et *al.*, 2016). La réaction de base d'un antioxydant n'est pas l'élimination de

l'oxygène, mais l'interception du processus radicalaire antioxydant qui n'est pas perpétué par l'oxygène mais par l'acide gras. L' α -T réagit avec le radical ROO° d'acides gras, principaux produits de la peroxydation des lipides, et intercepte la réaction en chaîne (Burton et Ingold, 1981). Ce qui fait de l' α -T un antioxydant très efficace :

-Il réagit avec le radical ROO° extrêmement vite, beaucoup plus rapidement que de permettre au radical ROO° de faire toute autre réaction ;

-Il enlève le caractère radical à l'acide gras oxydant et l'empêche de provoquer de nouvelles réactions radicalaires ;

-Dans la réaction antioxydante, l' α -T est transformé en un radical relativement stable.

Dans des circonstances normales, il réagit radicalement avec un autre radical (soit un radical photoperoxyle, soit un radical ROO° d'acide gras) pour former des produits stables non radicalaires. Dans ce contexte, l' α -T est la substance la plus connue, et ce n'est que récemment que de nouveaux antioxydants synthétiques ont été mis au point sur la capacité antioxydante -sur-tocophérol (Wijtmans et *al.*, 2003)

L'activité antioxydante de l' α -T (figure 10) a laissé espérer qu'une supplémentation alimentaire en vitamine E pourrait apporter une solution bénéfique à la survenue d'une réaction d'autooxydation pathologique majeur dans les sociétés occidentales, à l'oxydation des LDL et à la pathogénèse de l'athérosclérose (Esterbauer et *al.*, 1991 ; Jessup et *al.*, 2004).

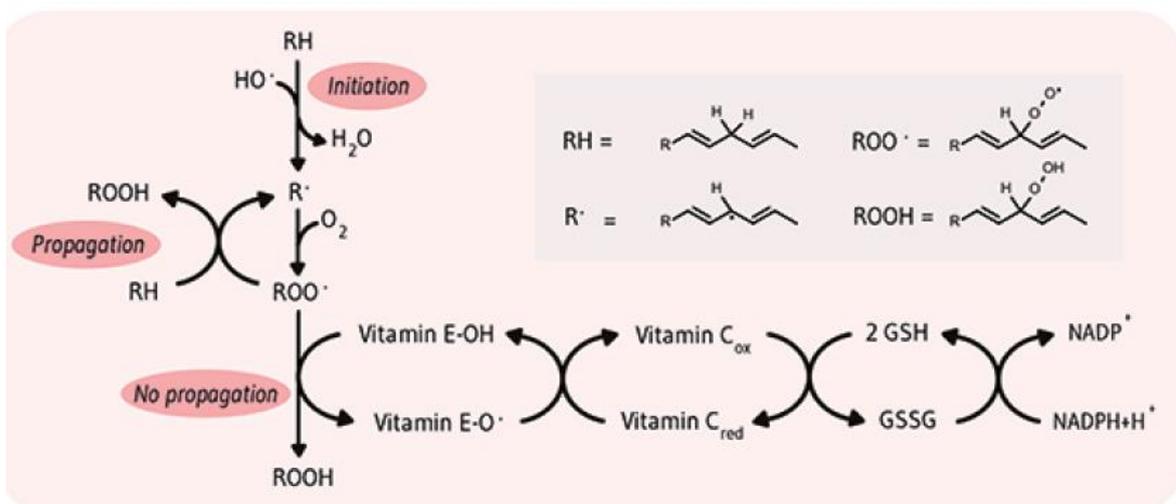


Figure 10 : Activité antioxydante de l' α -tocophérol (Traber, 2012).

III.7.2. L' α -tocophérol en tant que pro-oxydant

L'oxydation de l' α -T conduit à un radical α -T $^{\circ}$, qui peut être régénéré en présence de la vitamine C ou d'autres réducteurs dont les thiols comme le glutathion. En l'absence de ces derniers, l' α -T pourrait présenter des effets prooxydants démontrés *in vitro* (Landrier et *al.*, 2010).

En supposant qu'un radical ROO $^{\circ}$ frappe une particule de LDL et qu'il soit incorporé, il va probablement réagir avec l' α -T pour donner un hydroperoxyde et le radical α -T $^{\circ}$. Le radical α -T $^{\circ}$ est maintenant le seul radical et il passera une fraction considérable de sa durée de vie dans la région du cœur lipidique des LDL, à l'abri de la rencontre avec un radical ROO $^{\circ}$ dans la phase aqueuse externe (Alessi et *al.*, 2002). Cette durée de vie (estimée à environ 12. -5s) est suffisamment longue pour qu'il puisse finalement extraire un hydrogène à partir d'acide linoléique ou arachidonique, créant ainsi un radical d'acide gras puis un radical ROO $^{\circ}$, qui déclenchera une nouvelle réaction en chaîne par autooxydation (Ingold et *al.*, 1993). Ce phénomène est connu sous le nom de peroxydation médié par le tocophérol (TMP). La TMP ne se produit pas dans l'autooxydation en phase solution normale, car le radical α -T $^{\circ}$ réagira avec tout autre radical avant d'effectuer une soustraction d'hydrogène (Schneider, 2005).

La découverte du phénomène de la TMP a conduit les chercheurs à émettre l'hypothèse que la particule de LDL serait en fait parfaitement protégée de l'autooxydation si elle ne contenait pas le tocophérol «antioxydant» (Ingold et *al.*, 1993). Conformément à cette idée, il a été démontré que le taux d'autooxydation des LDL diminue une fois que tout l' α -T est épuisé (Calberson et *al.*, 2001).

Il existe également une possibilité par laquelle l' α -T peut exercer une activité prooxydante, cela provient de sa capacité à réduire les ions de métaux de transition à leurs états d'oxydation inférieurs, par exemple Fe $^{2+}$ et Cu $^{+}$. Les ions métalliques réduits ont un taux de réaction plus élevé avec l'hydroperoxyde et le peroxyde d'hydrogène que les formes oxydées (Niki et Noguchi, 2004). Les réactions peuvent entraîner un clivage homolytique des hydroperoxydes et conduire à la génération de radical RO $^{\circ}$ réactif (Schneider, 2005).

Partie II :
Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

Notre étude qui s'est étalée entre le mois de février et le mois de juin et qui consiste à réaliser une expérimentation animale au niveau de l'animalerie du Centre de recherche et du développement (Saidal / Gué de Constantine, Alger), une étude histologique au niveau du laboratoire d'Anatomie pathologique de l'hôpital professeur Fares Yahia (Koléa- Tipaza) et un dosage biochimique au niveau du laboratoire de la station expérimentale à l'université Saad Dahleb Blida 1 (USDB 1), afin de mettre en évidence les effets de la supplémentation de l' α -T à différentes doses sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase. Ainsi que sur l'histologie du tissu hépatique chez les souris.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel non biologique (Annexe 2).

I.1.2. Matériel biologique

I.1.2.1. Animaux étudiés

L'expérimentation a été réalisée sur 40 souris mâles albinos de souches NMRI âgées de vingt et un (21) jours (post sevrage) avec un poids corporel qui varie entre 7 et 14 g, fournis par le centre de recherche et du développement (Saidal / Gué de Constantine à Alger).

Les souris sont mises dans des cages en polyéthylène tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois et munies d'une porte-étiquette où est mentionné le nom du lot, le traitement subi et les dates des expérimentations (Figure11). Les cages sont nettoyées et la litière changée une fois tous les trois jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. L'eau de boisson est donnée *ad libitum* dans des biberons adaptés aux cages.



Figure 11 : Expérimentation animal (photo original).

La température de l'animalerie était de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, avec un cycle lumière /obscurité de 12h/12h et une hygrométrie de 35 %.

Les souris ont été soumises à une phase d'adaptation d'une semaine, durant laquelle elles ont été nourries avec un régime standard sous forme de poudre. Une pesée régulière a été faite chaque trois (03) jour.

I.1.2.2. Expérimentation

La vitamine E (α -T) a été administrée pendant 05 semaines à huit lots de cinq souris pour chacun (Tableau II).

Tableau II : la répartition des lots expérimentaux

Lot	La supplémentation en aliment
Lot 1	Régime standard (RS)
Lot 2	Régime standard supplémenté en 700mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE ₇₀₀)
Lot 3	Régime standard supplémenté en 900mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE ₉₀₀)
Lot 4	Régime standard supplémenté en 1000mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE ₁₀₀₀)
Lot 5	Régime standard supplémenté en 1050mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE ₁₀₅₀)
Lot 6	Régime standard supplémenté en 1100mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE ₁₁₀₀)
Lot 7	Régime standard supplémenté en 1150mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE ₁₁₅₀)
Lot 8	Régime standard supplémenté en 1200mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE ₁₂₀₀)

I.1.2.3. Supplémentation de l'aliment

La nourriture a été fournie par l'Office National des Aliments de Bétail (ONAB) / Bouzareah, est apportée aux animaux sous forme de poudre dans des boîtes de Pétries à raison de 25g d'aliments /jour/ 5 souris (Annexe 1) (Figure 12).

L' α -T est acheté en pharmacie sous le nom commercial "API E" et sous forme des comprimés de 100 mg (Figure 13).



Figure 12 : Aliments fournis aux souris sous forme de poudre (photo original).



Figure13 : Vitamine E commerciale (photo original).

I.1.2.4. Sacrifice et prélèvement

Après les six (06) semaines (une semaine d'adaptation et cinq semaines d'expérimentation), les souris sont anesthésiées à l'éther puis disséquées, le foie est rapidement prélevé, rincé avec de l'eau physiologique 0.9%, pesé puis coupé en plusieurs fragments, les uns sont destinés au dosage de quelques paramètres biochimiques (protéine, CAT et MDA) et conservé à une température de -20°C, et les autres fragments sont mis dans du formol dilué à 10 % pour la réalisation des coupes histologiques.

I.2. Méthodes

I.2.1. Dosage des protéines

A. Principe

Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry et *al*, (1951). C'est une mesure colorimétrique, basée sur l'obtention d'un composé chromogène par réaction d'oxydoréduction, qui a lieu entre des groupements de la protéine notamment les groupements phénoliques du tryptophane, de la tyrosine, et le réactif de folin ciocalteu dont l'acide phosphomolybdo-tungstique est le constituant actif. Cette réaction donne un complexe coloré : le bleu de molybdène dont l'intensité est mesurée à 750nm. Ainsi les DO obtenues à cette longueur d'onde permettent de déterminer les concentrations des échantillons analysés en faisant une projection sur une courbe d'étalonnage $DO = f(C)$ (Solution d'albumine à 1 mg/ml) (Annexe 3).

B. Mode opératoire

a) Extraction des protéines

- 9 ml d'une solution de triton X-100 (0.5%) sont mis dans un tube Potter en présence de 100 mg de l'échantillon du foie,
- l'échantillon est broyé par un broyeur homogénéisateur de Potter Thomas pendant 30 s,
- 1ml de TCA à 1% est mis dans un tube en verre contenant 100 µl de l'homogénat,
- centrifugation à 4000 tr/min pendant 15 min,
- le surnageant est éliminé, et le culot est repris dans 1ml de TCA à 1% et centrifugé à 4000 tr/min pendant 15min,

- le surnageant est éliminé une deuxième fois, les bords supérieurs des tubes sont séchés par la suite avec du papier filtre,
- le culot est repris dans un mélange d'alcool/éther (v/v) et centrifugé à 4000 tr/min pendant 5min,
- le surnageant est jeté, les bords supérieurs des tubes sont séchés par la suite avec du papier filtre,
- lavage avec 1ml d'éther éthylique, et centrifugation à 4000 tr/min pendant 5min,
- le culot parfaitement séché à l'air chaud, est repris dans 1 ml de NaOH (1M).

b) Dosages

- 1ml de la solution A (Annexe 4.1) est ajouté à 200 µl d'homogénat, l'ensemble est agité au vortex,
- l'échantillon est incubé 10 minutes à température ambiante,
- le mélange est alors mis en présence de 100 µl de réactif de la solution B (Annexe 4.2),
- après 45 minutes, la densité optique à 750 nm est mesurée au spectrophotomètre contre l'eau bi-distillée (blanc).

c) Préparation de la courbe étalon

En parallèle des échantillons à doser, une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution protéique BSA à 1 mg/ml dans huit tubes contenant des volumes croissants de solution BSA (0-200µl), complétés avec de l'eau distillée (Tableau III).

Tableau III : Les différentes concentrations de BSA servent à préparer la courbe d'étalon pour le dosage des protéines.

Les tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (mg/ml)	0	10	25	50	75	100	150	200
H2O (1ml)	200	190	175	150	125	100	50	0
BSA (1ml)	0	10	25	50	75	100	150	200

I.2.2. Dosage du Malondialdéhyde

A. Principe

La peroxydation lipidique est mesurée par la méthode de Draper (1993), qui est basée sur la formation d'un complexe chromogène de couleur rose absorbant à 532 nm entre une molécule de malondialdéhyde (MDA) produite lors de la peroxydation lipidique et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) avec l'élimination de deux molécules d'eau.

B. Mode Opérateur

La procédure expérimentale du dosage du MDA, est la suivante :

- 1ml de TCA à 10 % est mis dans un tube à essai, contenant 200 µl d'homogénat,
- les 100 µl de Butyle-hydroxotoluène (BHT) à 500 ppm sont ajoutés au mélange,
- le mélange est mis à ébullition dans un bain-marie à 100°C pendant 30 min,
- après refroidissement, le mélange est centrifugé à 4000 tr/min pendant 10 min,
- un volume du surnageant est récupéré, auquel est ajouté un même volume d'une solution aqueuse de TBA saturée,
- Ce mélange est mis à ébullition dans un bain-marie à 100°C pendant 30 min,
- après refroidissement, la densité optique est mesurée à 532 nm.

C. Expression des résultats

La concentration du MDA est calculée comme suit :

$$[\text{MDA}] = \text{DO. } 22 / [\text{Protéine}].$$

[MDA] : la concentration en MDA (µmol/min/mg de protéines).

DO : absorbance à 532 nm.

22 : facteur calculé à partir d'une courbe étalon.

[Protéine] : la concentration en protéines (mg).

I.2.3. Dosage de l'activité de la catalase

A. Principe

Le dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) a été appliqué selon la méthode d'Aebi, (1984). Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



B. Mode Opérateur

- a) Préparation des solutions de dosage (Annexe 5)
- b) Lecture de la Densité Optique

L'activité de CAT a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Tableau IV : Concentrations et quantités de réactifs nécessaires au dosage de l'activité de la catalase.

	Blanc	Essai
Tampon phosphate (50mM ; pH=7)	1000µl	970µl
H ₂ O ₂ (30mM)	1000µl	1000µl
Homogénat	/	30µl

c) Expression des résultats

Activité de la catalase (µl/min/ mg prot) = $[V/v \times (2,3/\Delta t) \times \log (A_1/A_2)] / X$

- V : volume de l'échantillon,
- v : volume total,
- Δt : temps de décomposition du H₂O₂ (**15s**)
- A₁ : absorbance à t₀
- A₂ : absorbance à t=**15s**
- X : quantité des protéines mg/ml

I.3. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été traitées au niveau du laboratoire d'Anatomie pathologique de l'hôpital professeur Fares Yahia (Koléa-Tipaza).

La technique suivie par le laboratoire est celle de Martoja et Martoja (1967) qui consiste en la préparation d'un fragment d'organe pour l'examen au microscope. Elle requiert plusieurs étapes successives : Fixation, Déshydratation et clarification, inclusion et mise en bloc, confection des coupes et collage des rubans, Déparaffinage et Coloration, Montage et observation.

▪ Fixation

Afin de conserver le tissu prélevé dans un état proche du vivant, il est fixé tout de suite après le prélèvement à l'aide d'un liquide fixateur il s'agit du formol 10%. La durée de fixation et le volume du fixateur utilisé varient selon le volume des prélèvements.

▪ Déshydratation et clarification

Les tissus doivent être préalablement déshydratés par des passages successifs dans des bains d'alcool de concentration croissante (70% 80% 95% 100%), puis dans un solvant dans lequel la paraffine est miscible comme le xylène. À ce stade, le prélèvement devient transparent, c'est la clarification.

À la fin de l'étape les prélèvements sont plongés dans des bains de paraffine liquide qui occupera tous les espaces vides dans le tissu. Toutes ses étapes sont effectuées à l'aide d'un automate de traitement des tissus (figure 14).



Figure 14 : Automate de traitement des tissus (photo original).

▪ Inclusion et mise en bloc

Les échantillons étant maintenus et imbibé de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils "dits à inclusion " (Figure 15) refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.



Figure 15 : Appareil à inclusion (photo original)

▪ Confection des coupes et collage des rubans

Les blocs de paraffine sont faits à l'aide d'un microtome du type Leica avec. Les rubans sont étalés dans un bain- marie (42°C) puis récupérés et déposés sur des lames en verre et ensuite séchés dans l'étuve réglée à 80°C pendant 20 à 30min.

▪ Déparaffinage et Coloration

Ces étapes sont réalisées dans un automate spécial pour coloration (figure 16), tout d'abord les coupes sont déparaffinées dans un bain de Xylène pendant 20 min puis hydratés dans trois bains d'alcool décroissant : 100° ; 95° ; 70° pendant 1min ,30s,30s successifs ensuite elles sont passées dans un bain d'eau pour pouvoir être colorées. Pour la coloration, on a utilisé la technique de l'Héματοxyline-Eosine (ou Hématéine Eosine)

Les coupes sont immergées dans un bain de Héματοxyline pendant 2 min. Après le rinçage à l'eau courante pendant cinq (5) minutes, elles sont passées dans un bain d'ammoniac pendant 15s puis dans un bain d'Eosine pendant cinq (5) min ensuite sont

rincées une deuxième fois à l'eau courante pendant dix (10) min. et Enfin elles sont passées dans les deux derniers bains : un bain d'alcool à 90% pendant 30s et un bain de xylène pendant 20 min.

- Cette coloration est la technique de contraste fondamentale pour tout examen microscopique histologique.
- L'hématoxyline est un colorant basique, qui se fixe aux acides nucléiques et colore ainsi les noyaux cellulaires et le réticulum endoplasmique rugueux en violet. Au contraire, l'éosine est un colorant acide, qui se fixe aux protéines et donc colore le cytoplasme et les fibres en rose.



Figure 16 : Automate de coloration (photo original).

▪ Montage et observation

La mise en contact lame-lamelle est appliquée par un eukitt, les lames sont ensuite observées à l'aide d'un microscope optique (Grossissement 40x).

I.4. Etude statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée par le test de t-student en utilisant le logiciel XLSTAT. Ce test à permet de comparer les moyennes des différents lots expérimentaux. Les résultats sont exprimés comme : moyenne plus au moins l'écartype et sont considérés comme :

- Significative lorsque ($P \leq 0,05$),
- Très significative lorsque ($P \leq 0,01$),
- Hautement significative lorsque ($P \leq 0,001$).
- Non significative lorsque ($P > 0,05$)

Avec (P) : seuil de signification.

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Modifications physiologiques

II.1.1. Symptomatologie

Nous avons observé chez les souris soumis à un régime standard supplémenté avec des doses croissantes en vitamine E (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' α -T/ kg d'aliments) des diarrhées, une inappétence et une réduction de la prise alimentaire, ces résultats corroborent avec ceux de Abdo et *al.*, (1986) qui ont observé les mêmes symptômes que les nôtres lors de l'administration d'une dose importante de vitamine E (2000mg/ kg d'aliment) à des rats mâles. En effet, en 1981, Roberts a montré également qu'une forte dose de vitamine E est associée à une variété d'effets secondaires graves, y compris la diarrhée.

D'autres études ont montré l'absence de ses symptômes. En 1948, Levy et Boas ont signalé des symptômes non spécifiques tels que des maux de tête, des douleurs intestinales, des crampes, des étourdissements et une légère constipation chez les patients cardiaques qui ont reçu d'une dose de 3200 UI (2000mg/kg d'aliments) de vitamine E/jour. Farrel et Bieri (1975), n'ont signalé aucun effet toxique chez des sujets adultes en bonne santé qui ont reçu quotidiennement des mégas doses de vitamine E. L'absence d'une réaction de toxicité a été aussi signalé par Hank en 1986 lors de l'administration des doses élevées en vitamine E (2000mg/kg chez le lapin, 5000 mg/kg chez le rat et 50000 mg/kg chez les souris).

II.1.2. Effets de la supplémentation d'un régime en α -tocophérol sur les paramètres pondéraux

II.1.2.1. Variation du poids corporel

Le suivi du poids corporel des différents lots de souris soumis à un régime standard supplémenté en α -T est représenté figure 17.

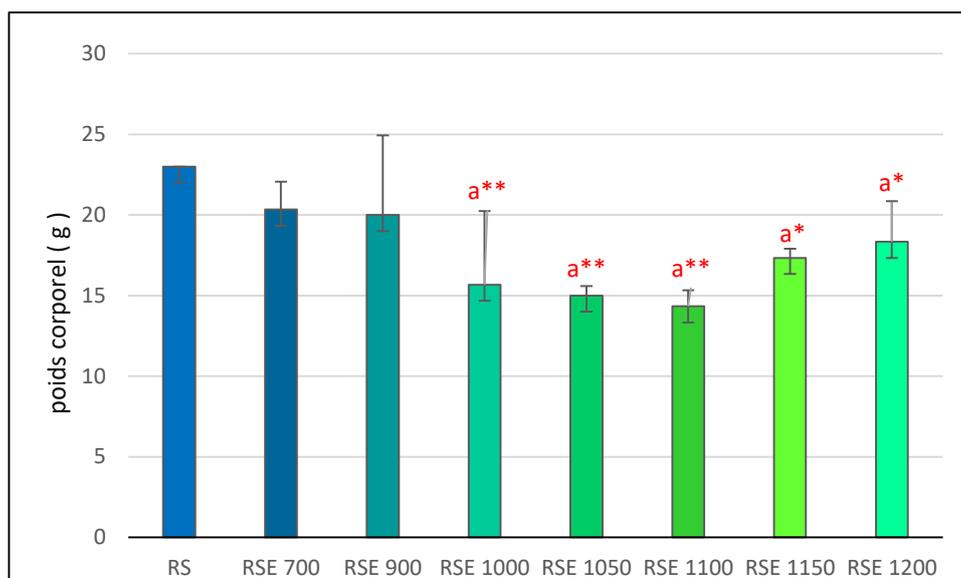


Figure 17 : Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg/kg d'aliments) sur le poids corporel des souris. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités, **a** : comparaison avec le lot RS).

Les résultats que nous avons obtenu lors du suivi du poids corporel des souris montrent une diminution non significative de la croissance chez les lots traités avec une dose de 700 et 900 mg d' α -T/kg d'aliments. Nous supposons que de telles doses, n'a eu aucun effet sur le poids corporel. Par contre, une diminution très significative ($p < 0.01$) a été obtenue chez les lots traités avec des doses de 1000, 1050 et 1100, et une diminution significative ($p < 0.05$) chez les lots traités avec 1150 et 1200 mg d' α -T/ kg d'aliments, de ces résultats on peut déduire que ces doses d' α -T ont eu un effet néfaste sur la croissance corporelle. En 1985, Nielsen et *al.*, expliquent clairement que la baisse de croissance est due au fait que de les acides aminés réagissent avec les produits primaires et secondaires des lipides oxydés ce qui diminue l'utilisation digestive des protéines, des acides aminés et des graisses. Notons que Dahdouh et *al.*, en 2014 ont obtenu une diminution significative du poids corporel chez des souris suisses adultes de souche albinos âgées de 60 jours, traitées avec une dose de 2.7 g de Nickel supplémenté à 1g d' α -T/ kg de régime

Cependant, l'étude réalisée en 1983 par Wheldon *et al.*, a montré que pendant deux ans, un régime alimentaire quotidien supplémenté à 1000mg α -T/kg d'aliments chez des rats Charles River n'affecte pas leurs croissances comparativement aux témoins.

Egalement, Abdo *et al.*, en 1986 ont montré que la croissance des rats au niveau plus élevé de la vitamine E testé (2000mg/ kg) ne diffère pas significativement de celle des témoins. D'autres auteurs comme Eder *et al.*, (2002) ont confirmés que la croissance n'a pas été affecté chez des rats mâles Sprague- Dawley en croissance nourrie avec des régimes supplémentés en 1000 mg α -T/kg d'aliment pendant huit semaines. En 2004, Kiron *et al.* , n'ont eux aussi obtenu aucune différence du poids corporel chez des poissons alimentés avec des régimes supplémentés en 1500 mg α -T/ kg d'aliments.

II.1.2.2 .Variation du poids du tissu hépatique

La variation du poids du tissu hépatique des souris témoins et traitées par différentes doses d' α -T est représentée dans la figure 18.

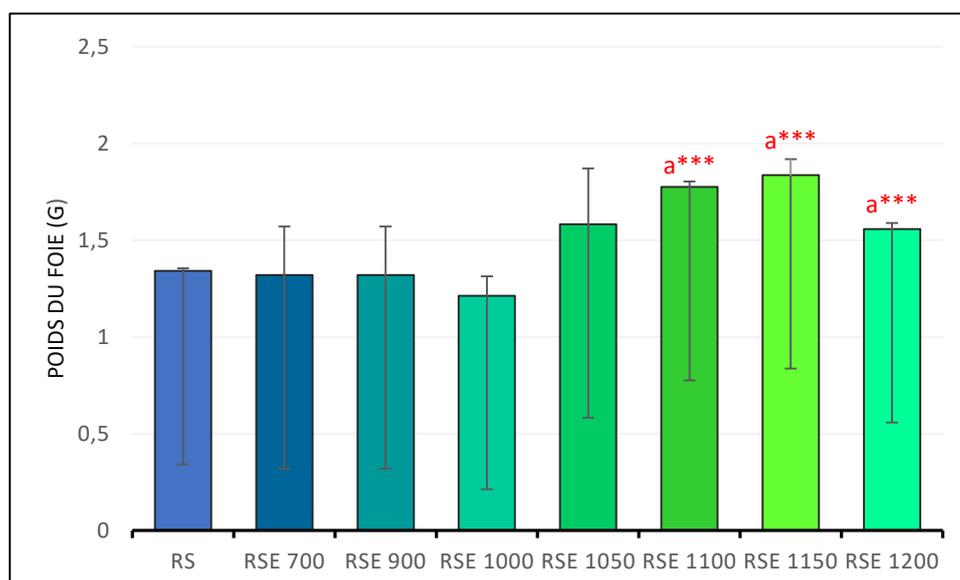


Figure 18 : Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg/kg d'aliment) sur le poids du tissu hépatique chez les souris. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités, a : comparaison avec le lot RS).

L'étude du poids du foie révèle une variation non significative chez les lots RSE₇₀₀, RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀ et RSE₁₀₅₀, nous constatons que ces doses n'ont pas affecté le poids hépatique. Par contre les résultats obtenus chez les lots RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀ montrent une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) du poids du foie. Cette augmentation peut être expliquée par l'accumulation du radical $\alpha\text{-T}^\circ$ et des ERO dans le foie conduisant à l'hypertrophie hépatique. Ainsi nous avons observé chez les lots RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀ une couleur foncée du foie par rapport au témoin (RS). Notons que nos résultats corroborent avec ceux de Abdo et *al.*, (1986) qui ont observé une hypertrophie du foie chez rats nourris avec un régime supplémenté en 2000mg d' $\alpha\text{-T}$ / kg d'aliments. D'autres étude réalisée par Wheldon et *al.*, en 1983 ont obtenu une augmentation du poids du foie de rats mâles soumis à un régime alimentaire supplémenté en 1000 mg d' α -acétate de tocophéryl /kg de poids corporel / jour.

En 2014, Dahdouh et *al.*, ont obtenu une augmentation du poids du foie chez des souris suisses albinos âgées de 60 jours supplémentées en (2.7g de sulfate du Nickel + 1g d' α /kg de régime).

Cependant, nos résultats ne corroborent pas avec ceux du Yang et Dessai, (1977) qui ont obtenu une diminution significative du poids du cœur et de la rate pendant 8 mois avec une forte dose de vitamine E 2500UI (1677mg d' $\alpha\text{-T}$ /kg d'aliment).

II.2. Effets de la supplémentation d'un régime en $\alpha\text{-T}$ sur quelques paramètres biochimiques du stress oxydant.

Dans le présent travail, nous avons mesuré quelques paramètres du stress oxydatif (la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la CAT) afin d'évaluer les effets d'une supplémentation à dose croissante d' $\alpha\text{-T}$ (Figure 18 : A, B et C).

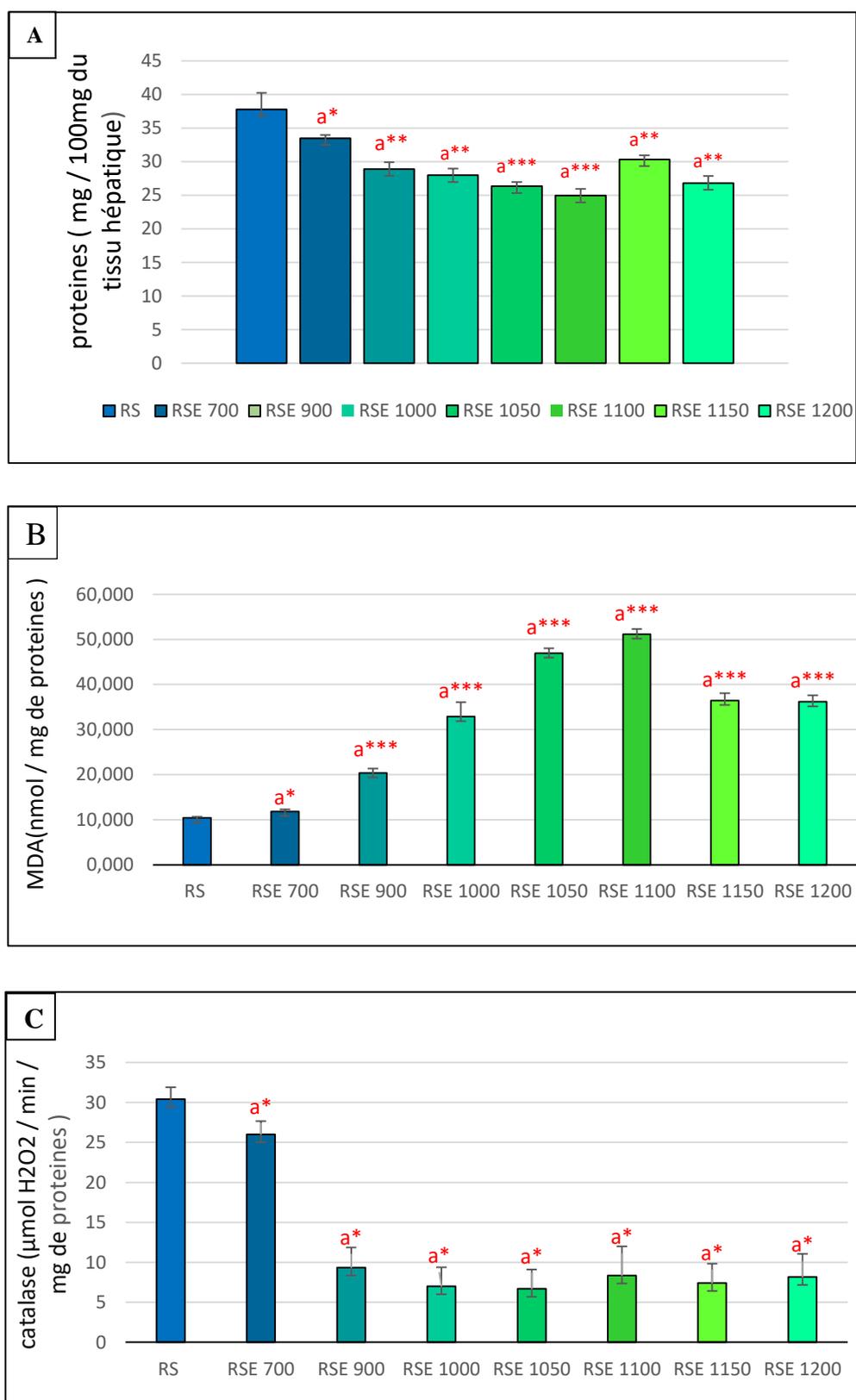


Figure 19 (A, B et C) : Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg/ kg d'aliment) sur la teneur en protéine(A), le taux en MDA (B) et l'activité de la catalase(C) chez les souris. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités, a : comparaison avec le lot RS).

Concernant la teneur en protéines (figure18), nous avons obtenu une diminution significative ($p < 0.05$) pour le lot supplémenté en 700 mg d' α -T/kg d'aliment (lot RSE₇₀₀), cette diminution a également été obtenue de manière très significative pour les lots RSE 900 et RSE 1000 ($p < 0.01$), hautement significative ($p < 0.001$) pour les lots RSE₁₀₅₀ et RSE₁₁₀₀ et très significative ($p < 0.01$) pour les lots RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀. En parallèle nous avons obtenu une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux en MDA chez le lot RSE₇₀₀, ainsi qu'une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) pour les lots (RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀, RSE₁₀₅₀, RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀). Concernant l'activité enzymatique de la CAT, les résultats obtenus montrent une diminution significative ($p < 0.05$) pour l'ensemble des lots traités (RSE₇₀₀, RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀, RSE₁₀₅₀, RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀). Tous ces résultats révèlent qu'il y a un déséquilibre de la balance oxydante/ antioxydante due à la présence des ROS à une concentration importante au niveau du foie, ces ROS peuvent endommager les protéines et induire une diminution ou bien une inactivation de certaines enzymes antioxydantes. Les résultats de l'ensemble des paramètres dosés confirment que l' α -T à fortes doses n'a pas agi en tant que piègeur des radicaux libres (effet antioxydant) mais a eu plutôt tendance à agir en tant que pro-oxydant. L'effet prooxydant de la vitamine E serait en particulier lié au radical tocophéroxyl, il pourrait oxyder directement les lipides membranaires vu que la concentration en acide ascorbique n'était pas suffisante pour régénérer l' α -T et de même rompre la chaîne de propagation de la lipoperoxydation. Ces hypothèses sont confirmées par l'augmentation du taux en MDA, qui est le marqueur principal de la peroxydation lipidique, les diminutions de la teneur en protéines et de l'activité de la CAT. Notons que nos résultats corroborent avec ceux de Rietjens et *al.*, (2002) qui ont énoncé que les antioxydants naturels comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols, sont souvent prétendus être bénéfiques pour la santé. Par contre, à des doses élevées, ils peuvent exercer des activités prooxydantes toxiques. Egalement Azzi, (2007) a montré que la vitamine E et plus particulièrement l' α T possède d'autres propriétés significatives non antioxydantes.

En 2002, Eder et *al.*, ont étudié l'effet de la supplémentation de 1000mg d' α -T/kg d'aliments l' α -T chez des rats et ceci pendant 8 semaines. Ils ont obtenu une baisse des activités de la CAT de la GPx. Ils concluent qu'une forte dose de vitamine E peut affecter les enzymes antioxydantes.

Selon Williams et Carlucci, (2006) une supplémentation avec dix fois les apports recommandés en vitamine E administrées le matin par voie orale ne réduit pas les marqueurs de stress oxydatif, comme le MDA, selon Stocker et Keane, (2004) le MDA lorsqu'il est

présent en excès dans un tissu peut se combiner aux groupements amines libres des protéines (essentiellement les résidus lysines), conduisant à la formation de produits d'additions susceptibles d'altérer les propriétés biologiques des protéines concernées. Une étude réalisée par Hajiani *et al.*, (2008) a montré une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes à savoir la SOD, CAT et la GPx accompagnée d'une augmentation du taux en MDA, lors de l'administration d'une forte dose de vitamine E et pendant des périodes assez longues chez des rats mâles adultes de souche Sprague – Dawley.

En 1975, Dymysza et Park ont obtenu une baisse significative de la teneur en protéines chez les rats traités avec un régime supplémenté en 35000 mg d' α -T/ kg d'aliment pendant huit semaines. Selon Favier (2003) la baisse de protéines peut être expliquée par le fait de leur sensibilité aux attaques radicalaires.

.De nombreux auteurs ont déjà avancé l'hypothèse de l'activité prooxydante de l' α -T sans toute fois réaliser des études précises sur cet effet.

En effet, en 1977, Neuzil *et al.*, ont déduit que l'activité pro-oxydante des vitamines se produit lorsque les co-antioxydants, tels que l'ubiquinol-10 et la vitamine C, ne sont pas disponibles pour interagir avec le radical vitaminé. D'après Landrier *et al.*, (2010), l'oxydation de l' α -T conduit à un radical α -T \cdot , qui peut être régénéré en présence de la vitamine C ou d'autres réducteurs.

En 1996, Kontush *et al.*, ont montré lors d'une oxydation modérée et en absence d'autres co-antioxydants tels que l'ascorbate, que l' α -T se comportait comme un pro-oxydant en favorisant le taux de peroxydation des lipides dans le plasma humain et l'oxydation des LDL *in vitro*. Ainsi en 2000, Azzi suggère que le radical α -T \cdot propage la peroxydation dans les particules de lipoprotéines en absence de la vitamine C.

Selon Pastre et Priymenko (2007), le radical α -T \cdot peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono et poly insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique. Ce rôle pro oxydant de l' α -T en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -T \cdot est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération.

II.3. Effets de la supplémentation d'un régime en α -T à différentes doses sur l'histologie du tissu hépatique chez les souris

L'histologie du foie des lots traités par des doses importantes en vitamine E (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg /kg d'aliment) ont révélé des altérations histologiques. Nous supposons que ces altérations peuvent affecter la fonction hépatique et contribuer à un dysfonctionnement de cet organe, ceci n'a pas été observé dans notre cas, peut-être à cause de la durée du traitement qui n'était pas assez longue.

Le tissu hépatique du lot témoin présentait une apparence histologique normale montrant une structure des hépatocytes arrondis regroupés en lobules, ces derniers sont considérés comme l'unité fonctionnelle du foie. À la périphérie du lobule on trouve les sinusoides qui cheminent entre les lames hépatocytaires et convergent vers la veine centro-lobulaire (Figure 20 a). Des congestions et des dilatations de la veine Centro-lobulaire avec des congestions sinusoidales et une vacuolisation cytoplasmique causer soit par l'accumulation des triglycérides ou par l'accumulation et l'hyperhémie due à la vitamine E sont apparus dans les lots traités avec 700 et 900mg d' α -T/ kg d'aliment (RSE₇₀₀ et RSE₉₀₀) (Figure 20, Figure 21).

Le foie des lots traités par des doses de 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' α -T / kg d'aliment sont tous affectés de la même manière : une importante congestion de la veine centro-lobulaire et sinusoidale, micro et macro vacuolisation, infiltration lymphocytaire agencée parfois en amas, ainsi une lésion de la membrane hépatocytaire a été observé chez les lots RSE₁₀₀₀ et RSE₁₁₅₀ et également des œdèmes chez les lots RSE₉₀₀ et RSE₁₁₀₀ (Figure 22, 23, 24).

Nos résultats corroborent à ceux de Ferreira et *al.*, (2010), qui eux ont travaillé sur le tissu cardiaque, ils ont observé une désorganisation de celui-ci chez des rats Wistar traités avec des doses variantes de 87.5 à 1000 mg d' α -T/rat/ jour pendant 7 semaines. Ils ont conclu que les doses non physiologiques administrées induisent une cardiotoxicité.

Cependant, une étude réalisée en 1986 par Abdo et *al.*, n'ont observé aucune altération histologique du foie des rats mâles nourris avec un régime supplémenté en 2000mg d' α -T/ kg d'aliment. Une autre étude plus récente réalisée par Dahdouh et *al.*, (2014), dont les résultats ne corroborent pas aux nôtres, n'ont également obtenu aucun changement à l'échelle tissulaire

du foie de souris âgées de 60 jours traité avec un régime équilibré et supplémenté en 1 g d' α -T.

La majorité des études montrant les effets histologiques du stress oxydant sont réalisées avec des composés autres que l' α -T, généralement elles utilisent des pesticides.

En effet, en 2012 Ozden et *al.*, ont observé des modifications dégénératives du tissu hépatique telle que la vacuolisation, la faible dilatation sinusoidales et l'accumulation des fibres de collagène dans le tissu conjonctif chez des rats mâles Wistar traités par le méthyl – carbamate. Egalement une étude réalisée par Bushan et *al.*, (2013) ont obtenu des changements histologiques du tissu hépatique des rats Wistar traités avec un pesticide, ces changements histologiques sont caractérisés par la présence d'une anomalie de la veine intralobulaire, vacuolisation cytoplasmique et nucléaire, et une dilatation sinusoidale.

En 2014, Araoud et *al.*, suggèrent que la méthamidophos (substance insecticide) induit plusieurs altérations histopathologies dans les tissus hépatiques des rats, ces modifications étaient fonction de la dose et plus graves chez les animaux traités par une dose importante, cependant l' α -T à une dose de 1000 mg/ kg d'aliment a réduit les lésions histopathologiques trouvées dans le tissu hépatique, et rétablit partiellement les dommages survenant dans le tissu.

En finalité, les résultats obtenus dans la présente étude à savoir l'étude de quelques paramètres biochimiques et l'étude histologique, ont montrés que les doses d' α -T qui ont servi à compléter le régime, ont toutes induit un stress oxydatif modéré à savoir un taux en MDA significativement élevé accompagnée des baisses significatives de la teneur en protéines et l'activité de la CAT. Lors d'un stress oxydatif modéré, la concentration des radicaux libres n'est pas importante au point où l'ensemble des radicaux tocophéroxyl produit lors du processus d'antioxydant puissent se combiner entre eux, c'est pour cela que la présence et la concentration de l'acide ascorbique est importante car c'est ce co-antioxydant qui va régénérer l' α -T, si la concentration de l'acide ascorbique est faible, il y a apparition de l'effet prooxydant de l' α -T car l' α -T° va arracher un électron au acides gras des phospholipides des membranes et donc propager la réaction en chaîne de la lipoperoxydation.

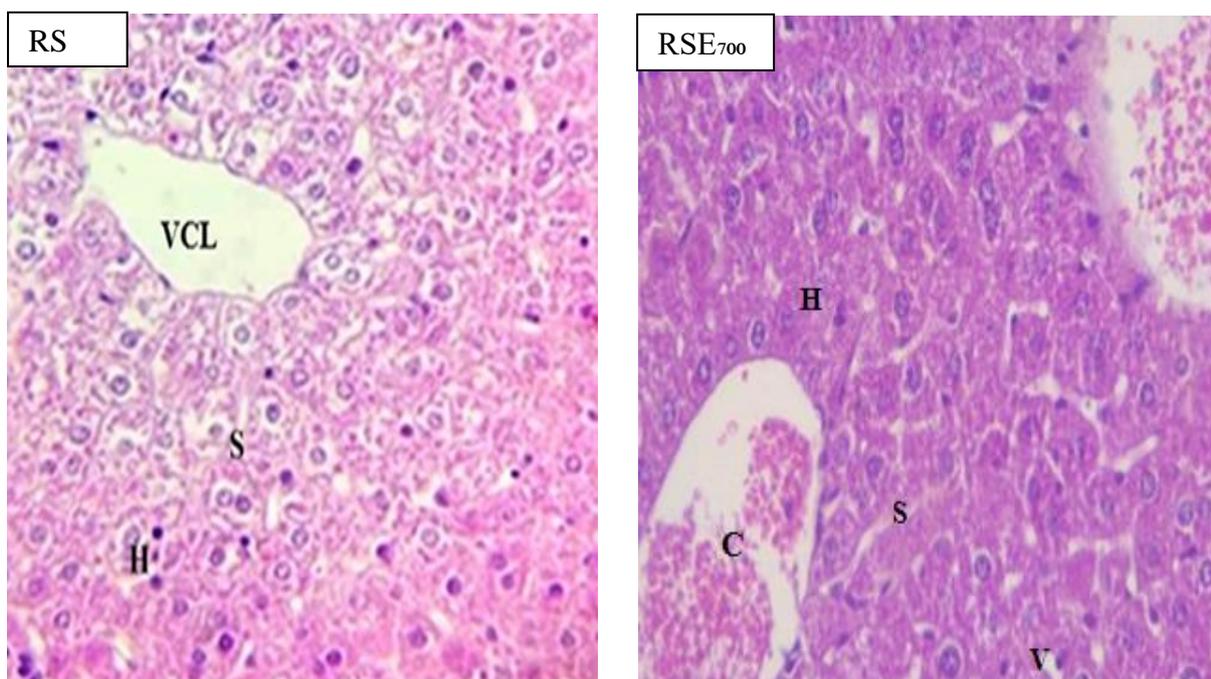


Figure 20 : Micrographie du foie des souris des lots RS et RSE₇₀₀ (40x, H&E) montrant : une architecture normale chez le lot RS, une désorganisation de l'architecture du foie chez le lot RSE₇₀₀ (VCL : veine centro-lobulaire, H : hépatocyte C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides)

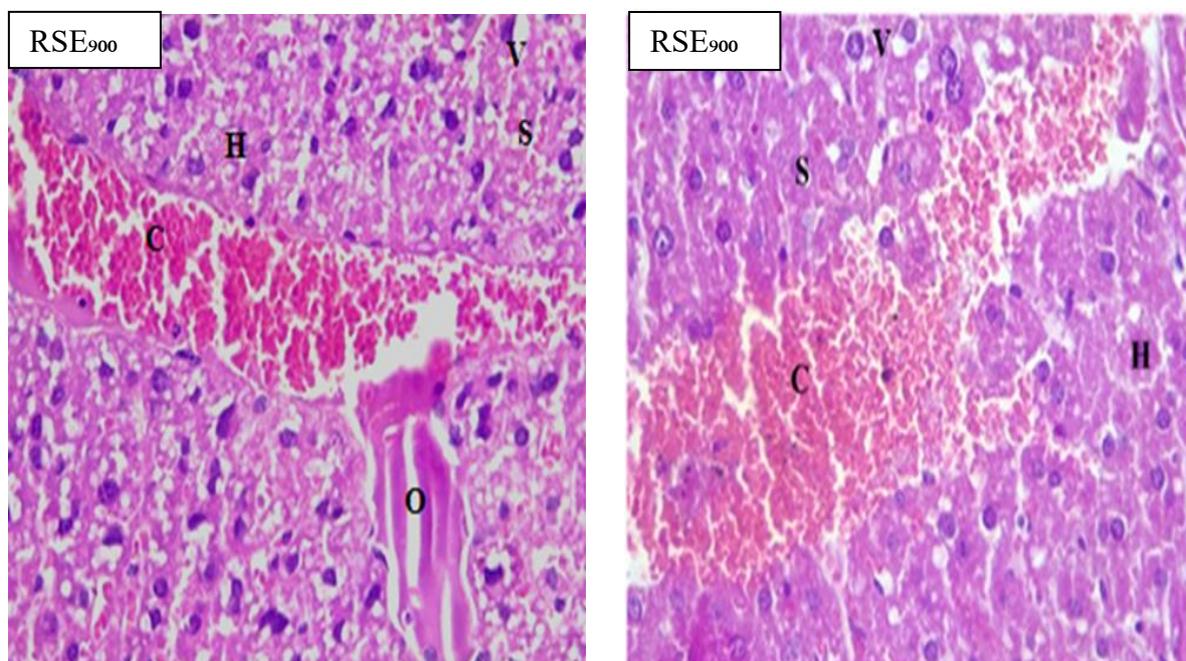


Figure 21 : Micrographie du foie des souris de lot RSE₉₀₀ (40x, H&E) montrant une désorganisation de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, O : œdème)

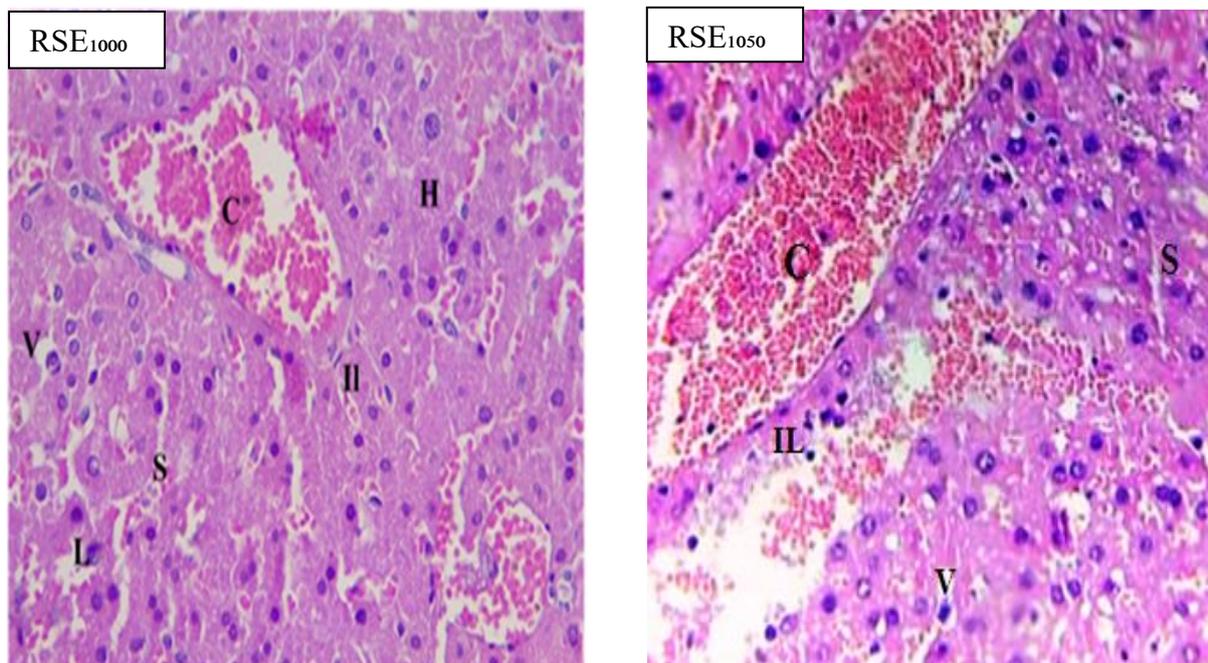


Figure 22 : Micrographie du foie des souris des lots RSE₁₀₀₀ et RSE₁₀₅₀ et (40x, H&E) montrant une désorganisation plus importante de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, L : lyse hépatocytaire, Il : infiltration lymphocytaire)

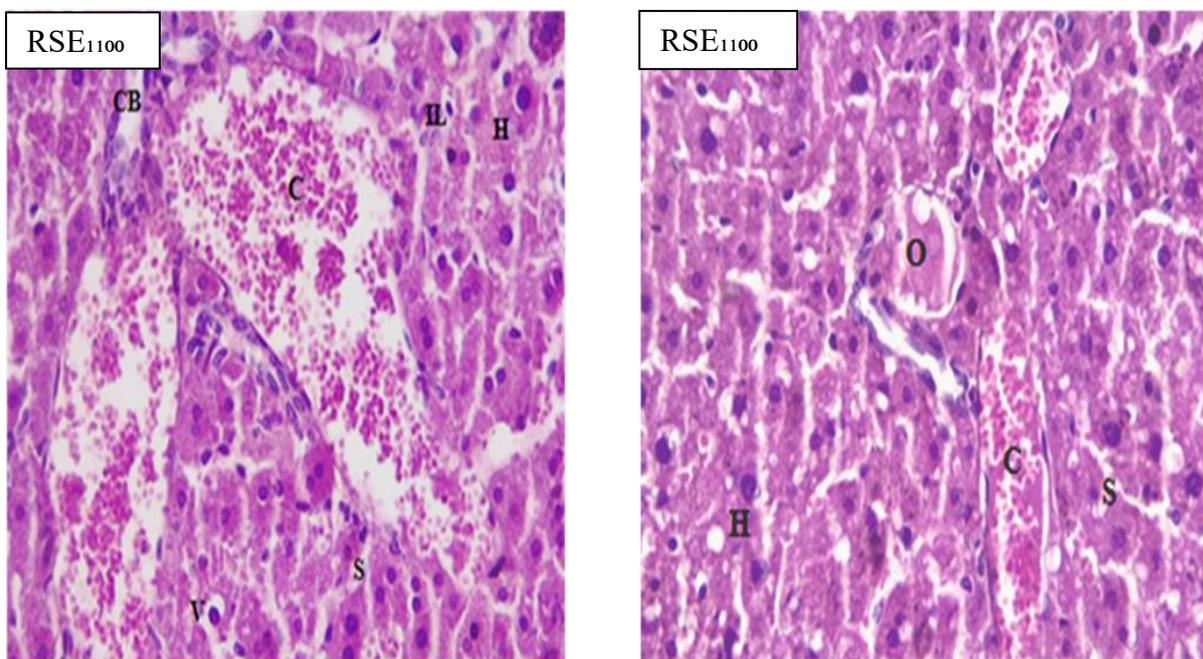


Figure 23 : Micrographie du foie des souris de lot RSE₁₁₀₀ (40x, H&E) montrant une désorganisation plus importante de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, Il : infiltration lymphocytaire, O : œdème)

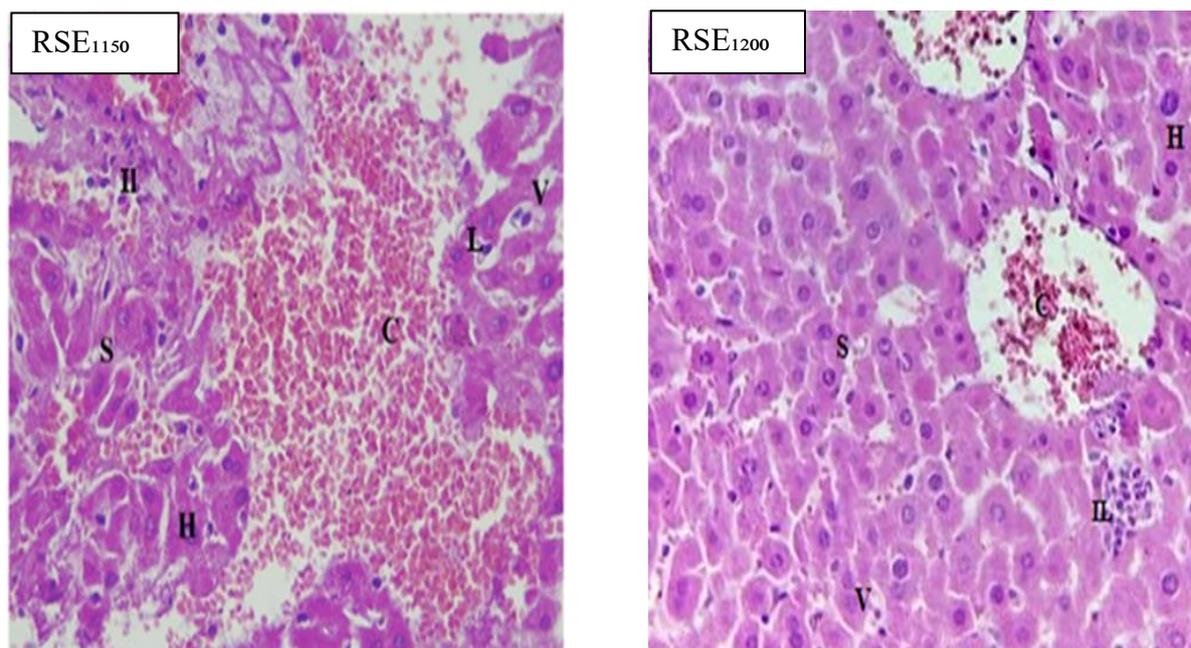


Figure 24 : Micrographie du foie des souris des lots RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀ (40x, H&E) montrant une désorganisation plus importante de l'architecture du foie (H : hépatocyte, C : congestion de la veine centro-lobulaire, S : congestion des sinusoides, V : vacuolisation, L : lyse hépatocytaire, II : infiltration lymphocytaire)

Conclusion
Et
Perspectives

Conclusion

La présente étude consistait à évaluer l'impact de la supplémentation de l' α -T à différentes doses (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg/kg d'aliments) sur la teneur en protéines, le taux en malondialdéhyde (MDA) et l'activité antioxydante de la catalase, ainsi que sur l'histologie du tissu hépatique chez les souris NMRI.

Au terme de cette étude, l'analyse de l'ensemble des résultats a montré :

Sur le plan de la croissance corporelle : une diminution non significative de la croissance des souris traitées par une dose de 700 et 900 mg d' α -T/ kg d'aliments, ces doses n'ont pas affecté le poids corporel des souris. Concernant les lots supplémentés en 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' α -T/ kg d'aliments, ont montré une diminution significative du poids corporel par rapport au lot témoin, ceci signifie que ces doses en α -T ont affecté le poids corporel, et la baisse de croissance pourrait être dû au fait que les acides aminés réagissent avec les produits primaires et secondaires des lipides oxydés ce qui diminue l'utilisation digestive des protéines, des acides aminés et des graisses (Nilsen et *al.*, 1985).

Sur le plan du poids du foie : les résultats montrent des variations non significatif du poids du tissu hépatique chez les lots supplémenté en 700, 900, 1000, 1050 mg d' α -T/ kg d'aliments, par contre nous avons obtenu une augmentation significative chez les lots supplémentés en 1100, 1150, et 1200 mg/ kg d'aliments, cette augmentation est due à une accumulation de l' α -T° et des ERO dans le foie conduisant à l'hypertrophie hépatique.

Sur le plan métabolique : une diminution significative de la teneur en protéines accompagnée d'une diminution significative de l'activité de la catalase, parallèlement nous avons enregistré une augmentation significative du taux en MDA, et ceci pour l'ensemble des lots supplémenté en α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200mg/ kg). La variation de ces paramètres biochimiques révèle un déséquilibre de la balance oxydante/ antioxydante qui résulte de l'effet toxique de l' α -T, ce dernier n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais plutôt a eu tendance à agir en tant que pro-oxydant en favorisant la peroxydation lipidique.

Sur le plan tissulaire : les coupe histologique du lot supplémenté en 700mg/ kg d'aliments révèle une congestion et une dilatation de la veine centro-lobulaire avec des congestions sinusoidales plus d'une vacuolisation a été remarqué dans les coupes histologique de lot supplémenté en 900 mg d' α -T/ kg d'aliments. Des altérations plus importantes sont

Observé chez les lots traités avec une dose de 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' α -T/kg d'aliment et représentés par une importante congestion de la veine centrale lobulaire et sinusoidale, micro et macro vacuolisation, des infiltrations lymphocytaires et des lésions de la membrane hépatocytaire. Ces résultats ont fait que confirmer les résultats du dosage biochimique à savoir que l' α -T n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais plutôt en tant que prooxydant.

En perspective, il serait intéressant de :

- déterminer la dose précise du passage de la vitamine E de l'effet antioxydant à l'effet prooxydant du fait que dans notre étude cette dose est inférieure à 700 mg/kg d'aliments n'a pas été déterminé
- mesurer d'autres marqueurs du stress oxydant comme (SOD, GPx, GSH, vitamine E, vitamine C).
- évaluer l'effet de telles doses de l' α -T sur d'autres organes.
- il serait également intéressant de mettre en évidence la présence de certains marqueurs tumorigènes tels que le suppresseur de tumeur (p53) et les anti-apoptotiques (famille Bcl2).

References
Bibliographies

Abdo, K. M., Rao, G., Montgomery, C. A., Dinowitz, M., & Kanagalingam, K. (1986).

Thirteen-week toxicity study of d- α -tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10-11), 1043-1050.

Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (1), 121-126.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7), 636-643.

Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Khaled, L., Najjar, M. F., Kenani, A., & Houas, Z. (2016). Toxic effects of methamidophos on paraoxonase 1 activity and on rat kidney and liver and ameliorating effects of alpha-tocopherol. *Environmental toxicology*, 31(7), 842-854.

Alessi, M., Paul, T., Scaiano, J. C., & Ingold, K. U. (2002). The Contrasting Kinetics of Peroxidation of Vitamin E-Containing Phospholipid Unilamellar Vesicles and Human Low-Density Lipoprotein1. *Journal of the American Chemical Society*, 124(24), 6957-6965.

Ali, A. A., Coulter, J. A., Ogle, C. H., Migaud, M. M., Hirst, D. G., Robson, T., & McCARTHY, H. O. (2013). The contribution of N₂O₃ to the cytotoxicity of the nitric oxide donor DETA/NO: an emerging role for S-nitrosylation. *Bioscience reports*, 33(2), e 00031

Albahrani, A. A., & Greaves, R. F. (2016). Fat-soluble vitamins: clinical indications and current challenges for chromatographic measurement. *The Clinical Biochemist Reviews*, 37(1), 27.

Ambrogini, P., Betti, M., Galati, C., Di Palma, M., Lattanzi, D., Savelli, D., & Minelli, A. (2016). α -Tocopherol and hippocampal neural plasticity in physiological and pathological conditions. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2107.

Annaházi, A., Mracskó, É., Süle, Z., Karg, E., Penke, B., Bari, F., & Farkas, E. (2007). Pre-treatment and post-treatment with α -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *European journal of pharmacology*, 571(2-3), 120-128.

Anwar, K., Iqbal, J., & Hussain, M.M. (2007). Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *J Lipid Res*, 48, 2028-38

Azzi, A., & Stocker, A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in lipid Research*, 39(3), 231-255.

Azzi, A. (2007). Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 16-21.

Pajaj, S., & Khan, A. (2012). Antioxidants and diabetes. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16(Suppl 2), S267.

Baskaran, A., Chua, K. H., Sabaratnam, V., Ram, M. R., & Kuppusamy, U. R. (2017). *Pleurotus giganteus* (Berk. Karun & Hyde), the giant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H₂O₂ stimulated RAW 264.7 cells via STAT 3 and COX-2 pathways. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 40.

Beaudeau, J. L., & Vasson, M. P. (2005). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris: Lavoisier, 45-86.

Bédane, C. (2008). Photodermatologie. Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie

Bhushan, B., Saxena, P. N., & Saxena, N. (2013). Biochemical and histological changes in rat liver caused by cypermethrin and beta-cyfluthrin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64(1), 57-67

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9.

Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., & Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. Médecine-Sciences, Flammarion

Boshtam M., Raffei M., Golshadi I.D., Ani M., Shirani Z., & Rostamshirazi M. (2005). Long term effects of oral vitamin E supplement in type II diabetic patients/*Int J Vitam Nutr Res*, 75(5):341-6

Bourgeois, C. (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires, pp 708.

Bułdak, Ł., Łabuzek, K., Bułdak, R. J., Kozłowski, M., Machnik, G., Liber, S., ...& Okopień, B. (2014). Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacological Reports*, 66(3), 418-429.

Burton, G., & Ingold, K. U. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, 103(21), 6472-6477.

Collins, A. R. (2001). Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 21-28.

Cook-Mills, J., & McCary, C. (2010). Isoforms of vitamin E differentially regulate inflammation. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 10(4), 348-366.

Culbertson, S. M., Vinqvist, M. R., Barclay, L. R. C., & Porter, N. A. (2001). Minimizing tocopherol-mediated radical phase transfer in low-density lipoprotein oxidation with an amphiphilic unsymmetrical azo initiator. *Journal of the American Chemical Society*, 123(37), 8951-8960.

Dahdouh, F., Djbar, M.R., Kechrid, Z. (2014). Vitamins C and E Combination Potentially Prevented Oxidative Stress Mediated Liver Injury in Nickel Intoxicated Mice. *Global veterinaria*, 13(6), 938-946.

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53

Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63, 10-19.

Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Draper, H. H., Squires, E. J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., & Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(4), 353-363.

Dubois, B. (2015). L'implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète: revue bibliographique (Doctoral dissertation).

Duclos-Vallée, J. C., Ichai, P., Chapuis, P., Misrahi, M., & Woimant, F. (2006). La maladie de Wilson. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 13(6), 451-458

Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5), 218-224.

Duncan, K., & Suzuki, Y. (2017). Vitamin E nicotinate. *Antioxidants*, 6(1), 20.

Dymysza, H. A., & Park, J. (1975). EXCESS DIETARY VITAMIN-E IN RATS. In *FEDERATION PROCEEDINGS*, 34(3), 912-912

Eder, K., Flader, D., Hirche, F., & Brandsch, C. (2002). Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidative enzymes in erythrocytes of rats fed salmon oil. *The Journal of nutrition*, 132(11), 3400-3404.

El Hadi, H., Vettor, R., & Rossato, M. (2017). Congenital Vitamin E deficiency. *Handbook of Famine, Starvation, and Nutrient Deprivation: From Biology to Policy*, 1-18.

Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G., & Waeg, G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *The American journal of clinical nutrition*, 53(1), 314S-321S.

Farrell, P. M., & Bieri, J. G. (1975). Megavitamin E supplementation in man. *The American journal of clinical nutrition*, 28(12), 1381-1386.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises*, 64(6), 390-396.

Feierabend, J. (2005). Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell, Oxford, 101-140.

Ferreira, A. L. A., Nascimento, M. C. M. O., Mastubara, B. B., Matsubara, L. S., Correa, C. R., Pereira, E. J., & Yeum, K. J. (2010). Pharmacological Dose of alpha-Tocopherol Induces Cardiotoxicity in Wistar Rats Determined by Echocardiography and Histology.

Fetoui, H., Makni, M., Garoui, E. M., & Zeghal, N. (2010). Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6), 593-599.

Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.

Fusco, D., Colloca, G., Monaco, M. R. L., & Cesari, M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical interventions in aging*, 2(3), 377.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003).

Espèces réactives de l'oxygène. L'actualité chimique, 91.

Gerschman, R. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. In *Glutathione* (pp. 288-291). Academic Press.

Goetz, P. (2015). Fibromyalgie. *Phytothérapie*, 13(5), 332-334.

Grimm, M., Mett, J., & Hartmann, T. (2016). The impact of vitamin E and other fat-soluble vitamins on Alzheimers disease. *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1785.

Guggenbuhl, P., Brissot, P., Chalès, G., & Loréal, O. (2010). L'hémochromatose: une maladie rhumatologique?. *La Lettre du rhumatologue*, (365), 10-20.

Guilland, J. C. (2011). Les interactions entre les vitamines A, D, E et K: synergie et/ou compétition. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(2), 59-67.

Hajiani, M., Golestani, A., Sharifabrizi, A., Rastegar, R., Payabvash, S., Hassanzadeh

Salmasi, A., ...& Pasalar, P. (2008). Dose-dependent modulation of systemic lipid peroxidation and activity of anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. *Redox report*, 13(2), 60-66.

Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (2014). Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, 186 (45), 1-85.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P.(2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.

Hanck, A. (1986). Sepktrum vitamin, vitamine E. In : *Arzeimitteltherapie heute band 42*,36-42.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*, 1, 319-66

Ingold, K. U., Bowry, V. W., Stocker, R., & Walling, C. (1993). Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(1), 45-49.

Jessup,W., Kritharides, L., & Stocker, R. (2004). Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochem. Soc. Trans*, 32(1), 134–138.

Jeancolas, L., Petrovska-Delacrétaz, D., Lehericy, S., Benali, H., & Benkelfat, B. E. (2016). L'analyse de la voix comme outil de diagnostic precoce de la maladie de Parkinson:

etat de l'art. CORESA 2016: 18e Edition COmpressions et REpresentation des Signaux Audiovisuels. Nancy: CNRS, 113-121.

Kinsky, N. (1989). Antioxydants function of carotenoides. Free Rad. Biol. Med, 7, 617.

Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S., & Watanabe, T. (2004). Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture*, 234(1-4), 361-379.

Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

kobayashi, H., Choemon, K., Kunio, Y., & Tomokichi, T. (1975). Identification of α -, β -, γ -and δ -tocopherols and their contents in human milk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 380(2), 282-290.

Kodad, O., & Alonso, J. (2018). Genotypic and environmental effects on tocopherol content in almond. *Antioxidants*, 7(1), 6.

Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschütter, A., & Beisiegel, U. (1996). Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low-density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 37(7), 1436-1448.

Kumar, R. S., Narasingappa, R. B., Joshi, C. G., Girish, T. K., Rao, U. J. P., & Danagoudar, A. (2017). Evaluation of *Cassia tora* Linn. Against oxidative stress-induced DNA and cell membrane damage. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 9(1), 33.

Landrier, J. F., Gouranton, E., Reboul, E., Cardinault, N., El Yazidi, C., Malezet-

Desmoulins, C., ...& Borel, P.(2010). Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(12), 1207-1213

Landrier, J. F. (2011). Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(2), 83-87.

Levy, H., & Boas, E. P. (1948). Vitamin E in heart disease. *Annals of internal medicine*, 28(6), 1117-1124.

Lindsay, D. G., & Astley, S. B. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants-EUROFEDA. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1-3), 1-38.

Leverve, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants?. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 44(5), 219-224.

Lippman, S. M., Klein, E. A., Goodman, P. J., Lucia, M. S., Thompson, I. M., Ford, L. G., ...& Parsons, J. K. (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama*, 301(1), 39-51.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.(1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.

Mandelker, L. (2008). Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(1), 1-30.

Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale.

Martin, E., Kanellopoulos, J., Fontaine, B., Delatour, B., & Delarasse, C. (2019). Le récepteur P2X7, une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer. *médecine/sciences*, 35(2), 97-99.

McMichael, M. A. (2007). Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(5), 714-720.

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.

Miguel, F.M., Schemitt, E.G., Colares, J.R. , Hartmann, R.M., & Morgan-Martins, M.I. (2017). Action of vitamin e on experimental severe acute liver failure/Arq. Gastroenterol,

54(2),123-129.

Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., & Thérond, P.(2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 66, No. 6, pp. 605-620)

Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.

Montagnier, L., Olivier, R., & Pasquier, C. (1997). Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases. CRC Press.

Moukette, B. M., Pieme, C. A., Biapa, P. C. N., & Ngogang, J. Y.(2015). In vitro antioxidant and anti-lipoperoxidative activities of bark extracts of *Xylopiya aethiopyca* against ion-mediated toxicity on liver homogenates. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 12(3), 195-204.

Nehdi, I., Omri, S., Khalil, M. I., & Al-Resayes, S. I. (2010). Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 360-365.

Neužil, J., Thomas, S. R., & Stocker, R. (1997). Requirement for, promotion, or inhibition by α -tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2), 57-71.

Nielsen, H. K., Finot, P. A., & Hurrell, R. F. (1985). Reactions of proteins with oxidizing lipids. *British Journal of Nutrition*, 53(1), 75-86.

Nukala, U., Thakkar, S., Krager, K., Breen, P., Compadre, C., & Aykin-Burns, N. (2018). Antioxidant tocopherols as radiation countermeasures (Challenges to be addressed to use tocopherols as radiation countermeasures in humans). *Antioxidants*, 7(2), 33.

Niki, E., & Noguchi, N. (2004). Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Accounts of chemical research*, 37(1), 45-51.

Ozden, S., Catalgol, B., Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A., Bolkent, S., & Alpertunga, B. (2013). Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective

effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats. *Toxicology and industrial health*, 29(1), 60-71.

Pastre, J., & Priymenko, N. (2007). Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, 1(4), 180-189.

Peh, H. Y., Tan, W. D., Liao, W., & Wong, W. F.(2016). Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacology & Therapeutics*, 162, 152-169

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.

Piechota-Polanczyk, A., & Fichna, J. (2014). The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 387(7), 605-620.

Pincemail, J., Bonjean, k., Cayeux,K., & Defraigne, J.O.(2012). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(6), 233–239.

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4), 1243-1276.

Qu, Y.H., Fu, J.K., Liu, K., Zuo, Z.Y., & Jia, H.N. (2016). Screening of α -Tocopherol Transfer Protein Sensitive Genes in Human Hepatoma Cells (HepG2)/*Int. J. Mol. Sci*, 17(7), 1016.

Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. T., & Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(07), 997.

Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., & Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*, 114(8), 1113-1122.

Ramaswamy, k., Gupta, S. C., Kim, J. H., & Aggarwal, B. B. (2012). Tocotrienols fight cancer by targeting multiple cell signaling pathways. *Genes & nutrition*, 7(1), 43.

Rietjens, I. M., Boersma, M. G., de Haan, L., Spenklink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., ...& Koeman, J. H.(2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental toxicology and pharmacology*, 11(3-4), 321-333.

Roberts, H. J. (1981). Perspective on vitamin E as therapy. *JAMA*, 246(2), 129-131.

Santo, A., Zhu, H., & Li, Y. R. (2016). Free radicals: from health to disease. *Reactive Oxygen Species*, 2(4), 245-263.

Sánchez-Sevilla,L., Mendieta-Condado, E., & Hernández-Muñoz, R.(2016). Treatment reverses α -tocopherol-induced desynchronization of polyamine and retinoid metabolism during rat liverregeneration Lourdes/*Journal of Translational Medicine*, 14(1),307.

Sentman, M. L., Granström, M., Jakobson, H., Reaume, A., Basu, S., & Marklund, S. L. (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper-and zinc-containing superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 6904-6909.

Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., & Cillard, J. (2001).Alcool et stress oxydatif. *Pathologie Biologie*, 49(9), 689-695.

Shah, D., Mahajan, N., Sah, S., Nath, S. K., & Paudyal, B. (2014). Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedical science*, 21(1), 23.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular nutrition & food research*, 49(1), 7-30.

Sheppard, A. J. (1993). Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. *Vitamin E in health and disease*.

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.

Sohal, R. S., Mockett, R. J., & Orr, W. C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 575-586.

Stocker, R., & Keaney Jr, J. F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*, 84(4), 1381-1478.

Suksomboon, N., Poolsup, N., & Sinprasert, S. (2011). Effects of vitamin E supplementation on glycaemic control in type 2 diabetes: systematic review of randomized controlled trials. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 36(1), 53-63.

Surai, P. F. (2002). Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction (pp. 5-9). Nottingham: Nottingham University Press.

Suárez-Jiménez, G.M., López-Saiz, C.M., Ramírez-Guerra, H.E., Ezquerra-Brauer J.M., & Ruiz-Cruz S. (2016). Role of Endogenous and Exogenous Tocopherols in the Lipid Stability of Marine Oil Systems: A Review /*Int. J. Mol. Sei*, 17 (12), 1968.

Tsumbu, C. N., Deby-Dupont, G., Tits, M., Angenot, L., Frederich, M., Kohnen, S., ...& Franck, T. (2012). Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase. *International journal of molecular sciences*, 13(1), 628-650.

Traber , MG. (2012). Vitamin E. In: Erdman JWJ, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. Washington, D.C. Wiley- Blackwell, 214-229

Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M.(2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.

Valko,M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J.(2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84

Van Helden, Y. G., Keijer, J., Heil, S. G., Picó, C., Palou, A., Oliver, P., ...& Van Schooten, F. J.(2009). Beta-carotene affects oxidative stress-related DNA damage in lung epithelial cells and in ferret lung. *Carcinogenesis*, 30 (12), 2070-2076.

Williams, C. A., & Carlucci, S. A. (2006). Oral vitamin E supplementation on oxidative stress, vitamin and antioxidant status in intensely exercised horses. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 617-621.

Wijtmans, M., Pratt, D. A., Valgimigli, L., DiLabio, G. A., Pedulli, G. F., & Porter, N. A. (2003). 6-Amino-3-Pyridinols: Towards Diffusion-Controlled Chain-Breaking Antioxidants. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(36), 4370-4373.

Wheldon, G. H., Bhatt, A., Keller, P., & Hummler, H.(1983). d, 1-alpha-Tocopheryl acetate (vitamin E): a long term toxicity and carcinogenicity study in rats. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur Vitamin-und Ernahrungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 53(3), 287-296.

Yang, N. J., & Desai, I. D. (1977). Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat-soluble vitamins in rats. *The Journal of nutrition*, 107(8), 1418-142

Zeeshan, H., Lee, G., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2016). Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 327.

Annexes

Annexe 1 :**Tableau :** Constituant de régime alimentaire

Ingrédient (%)	RS	RSE ₇₀ 0	RSE ₉₀ 0	RSE ₁₀ 00	RSE ₁₀ 50	RSE ₁₁ 00	RSE ₁₁ 50	RSE ₁₂ 00
Mais	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8	52,8
Son	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80
Soja	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10
Calcaire	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50
Phosphate	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80
C.M.V(Complément Méniralo-Vitaminique)α-T	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00
α-T	0	0.07	0.09	0.10	0.105	0.110	0.115	0.120

- **Mélange minéral contenu dans 100 g d'aliment:** KH₂PO₄ 20,0 mg; CaCO₃ 34,6 mg; CaHPO₄ 26,55 mg; 13,70 mg de NaCl; 3,42 mg MgSO₄·7H₂O; CuSO₄·5H₂O 0,042 mg; MnSO₄·H₂O 0,27 mg; 7H₂O 1,02 mg FeSO₄; ZnSO₄·H₂O 0,15 mg; CaCO₃ 0,0008 mg; KI 0,0016 mg.

- **Mélange vitaminique contenu dans 100g d'aliment:** vitamine A 19.800 UI; D3 2.500 mg; B1 20 mg; B2 15 mg; B3 70 mg; B6 10 mg; B7 150 mg; B12 0,05 mg; C 800 mg; E (dl- α -tocophérol acétate) 170 mg; K3 40 mg; PP 100 mg; chlorure de choline 1.360 mg; acide folique 5 mg; AcPAB 50 mg; 0,3 mg de biotine.

**Figure :** aliment fournis aux souris sous forme de poudre

Annexe 2 : Matériel non biologique

Verrerie et autres :

- Tubes en verre
- Tubes à essai
- Becher de 100ml et de 250ml
- Eprouvette
- Erlenmeyer de 250ml
- Pipettes graduées (2ml, 5ml, 10ml)
- Flacons
- Entonnoir
- Lames et lamelles.
- Boîtes de Pétri.
- Eppendorf
- Portoirs
- Micropipettes (de 10 μ l à 1000 μ l)
- Embouts de contenance 1000 μ l
- Embouts de contenance 200 μ l
- Spatule
- Ciseaux
- Pince
- Lame de bistouri
- Cuve de chromatographies
- Cassettes d'inclusion
- Parafilm
- Papier absorbant
- Papier aluminium

- Pissettes
- Papier absorbant
- Cassettes inclusion.

Réactifs et solution

- Ether Ethylique.
- Triton X-100.
- Acide trichloracétique (TCA)
- Alcool. Hydroxyde de sodium NaOH.
- Tartrate de Na⁺ K⁺.
- Sulfate de cuivre CuSo₄.
- Sulfate de carbonate de sodium Na₂Co₃.
- Folin ciocalteu.
- Phosphate de potassium monobasique KH₂Po₄.
- Butyl-Hydroxtoluène (BHT).
- Phosphate disodique Na₂ HPo₄, 2H₂O.
- Peroxyde d'hydrogène H₂O₂.
- Eau distillée

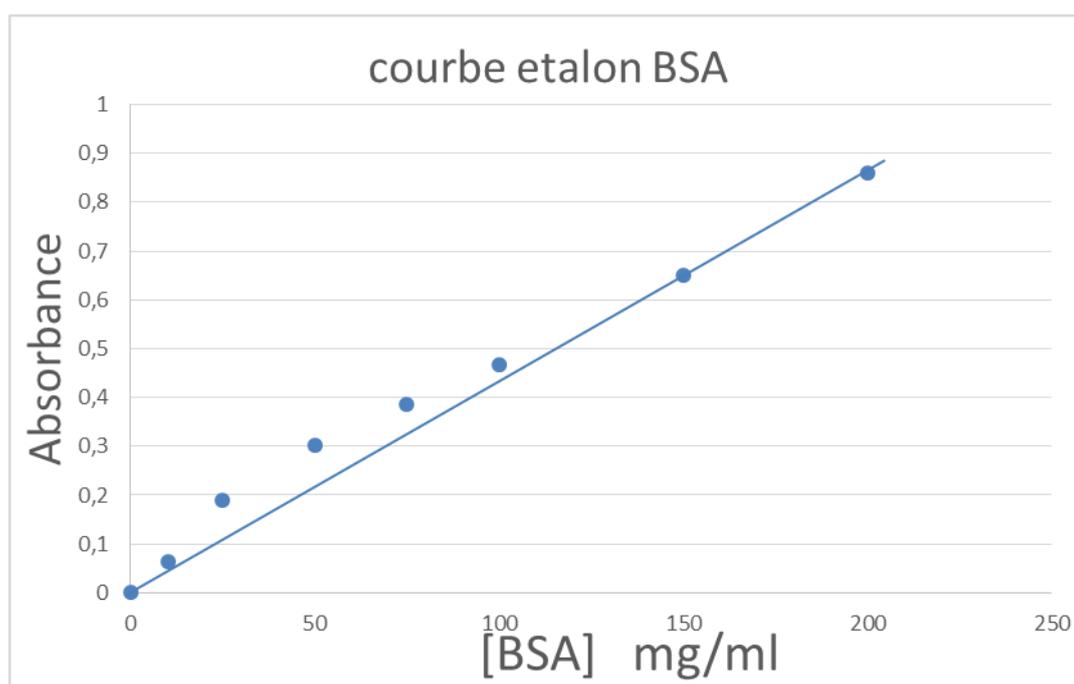
Appareillages :

- Homogénéisateur (Potter de Thomas).
- Balance de précision (KERN)
- Centrifugeuse (EBA 20)
- Spectrophotomètre UV-visible(SHIMATZU)
- Bain-marie (PRECISTERM)
- vortex (VWR)
- pH mètre

- Réfrigérateur
- Automates de traitement des tissus (Leica)
- Appareil de l'enrobage des tissus (SLEE)
- Module de refroidissement de paraffine (SLEE)
- Appareil de coloration de tissus (SLEE)
- Microtome (Leica).
- bain de flottaison de paillasse (SLEE)
- Appareil de coloration de tissus (SLEE)
- Plaque chauffante (Stuart)
- Etuve
- Distillateur.
- Microscope optique
- Appareil photo

Annexe 3 :

Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY (1951), l'albumine sérique bovine (BSA) est utilisé comme protéine de référence.



Annexe 4 :**Préparation de solution de dosage de protéine**

Solution A : préparée par mélange des trois solutions suivantes :

- 0,5 ml de la solution de tartrate de Na⁺ K⁺ à 2% (P/V)
- 0,5 ml de la solution de sulfate de cuivre CuSO₄ à 1%
- 50 ml de la solution de sulfate de carbonate de sodium Na₂CO₃ dans du NaOH (0.1M).

Solution B : folin ciocalteu 1N est préparé par dilution au un demi (1/2) dans l'eau distillée.

Annexe 5 :**Préparation des solutions de dosage de l'activité de la catalase**

Solution I : Tampon phosphate (50 mM ; pH=7)

- dissoudre 6,81 g de KH₂PO₄ dans de l'eau distillée est compléter à 1000ml (a),
- dissoudre 8,82 g de Na₂HPO₄, 2H₂O dans de l'eau distillée est compléter à 1000ml (b),
- mélanger 1 ml de la solution (a) avec 1,5 ml de la solution (b),
- ajuster le pH=7.

Solution II : Peroxyde d'hydrogène (30 mM)

- diluer 0,34 ml de H₂O₂ à 30% avec la solution I jusqu'à 100ml.

Annexe 06

Tableau: Variation du poids corporel et du poids du foie chez les souris en croissance des différents lots (RS: témoin , RSE₇₀₀ : supplémenté en 700 mgd' α -T /Kg d'aliment, RSE₉₀₀: supplémenté en 900mgd' α -T /Kg d'aliment, RSE₁₀₀₀: supplémenté en 1000mg d' α -T / Kg d'aliment, RSE₁₀₅₀: supplémenté en 1050mgd' α -T / Kg d'aliment, RSE₁₁₀₀: supplémenté en 1100mgd' α -T /Kg d'aliment, RSE₁₁₅₀: supplémenté en 1150mgd' α -T /Kg d'aliment et RSE₁₂₀₀ : supplémenté en 1200mg d' α -T /Kg d'aliment)

	Paramètre	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8
Moyenne	Poids corporel	23	20,33	20	15,66	15	14,33	17,33	18,33
	\pm	\pm 1,732	\pm 4,932	\pm 4,582	\pm 0,577	\pm 1	\pm 0,577	\pm 4,163	\pm 3,214
Ecartype	Poids du foie	1,342	1,32	1,32	1,125	1,582	1,775	1,836	1,35
	\pm	\pm 0,0122	\pm 0,249	\pm 0,249	\pm 0,192	\pm 0,288	\pm 0,027	\pm 0,082	\pm 0,360

Annexe 7 :

Tableau : la variation de la teneur en protéines, taux en malondialdéhyde (MDA) et l'activité de la catalase (CAT) chez les souris (RS: témoin, RSE₇₀₀ : supplémenté en 700 mg d' α -T /Kg d'aliment, RSE₉₀₀: supplémenté en 900mgd' α -T /Kg d'aliment, RSE₁₀₀₀: supplémenté en 1000mgd' α -T / Kg d'aliment, RSE₁₀₅₀: supplémenté en 1050mg d' α -T / Kg d'aliment, RSE₁₁₀₀: supplémenté en 1100mgd' α -T /Kg d'aliment, RSE₁₁₅₀: supplémenté en 1150mgd' α -T /Kg d'aliment et RSE₁₂₀₀ : supplémenté en 1200mgd' α -T /Kg d'aliment).

	Paramètre	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8
Moyenne ± Ecartype	Protéines [mg/ 100 g de tissu]	37,75 ± 2,466	34,49 ± 0,473	28,9 ± 1,02	27,97 ± 1,017	26,34 ± 0,614	24,94 ± 1,017	30,33 ± 0,585	26,8 ± 1,064
	MDA [n moles/ mg de protéines]	10,41 ± 0,271	10,84 ± 0,478	20,39 ± 0,923	32,87 ± 3,156	46,93 ± 1,094	51,15 ± 1,159	36,456 ± 1,601	36,17 ± 1,433
	Catalase [μ mol H ₂ O ₂ /min/mg Protéines]	30,42 ± 1,479	26 ± 1,683	9,35 ± 2,50	6,99 ± 2,39	6,69 ± 2,406	8,32 ± 3,657	7,4 ± 2,418	8,16 ± 2,901

Annexe 8 :

Tableau : les altérations histologiques apparus dans le tissu hépatique

Altération histologique	Lot 1 RS	Lot 2 RSE₇₀₀	Lot 3 RSE₉₀₀	Lot 4 RSE₁₀₀₀	Lot 5 RSE₁₀₅₀	Lot 6 RSE₁₁₀₀	Lot 7 RSE₁₁₅₀	Lot 8 RSE₁₂₀₀
Congestion de la VCL	-	+	+	++	++	++	++	++
Congestion sinusoïdal	-	+	+	++	++	++	++	++
Vacuolisation	-	+	+	++	++	++	++	++
Infiltration lymphocytaire	-	-	-	++	++	++	++	++
Œdème	-	-	+	-	+	+	+	+
Lésion de la membrane hépatocytaire	-	-	-	+	-	-	+	-