



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : BIOCHIMIE

Thème

Effets d'une supplémentation de doses croissantes en Alpha-tocophérol sur le bilan et l'histologie du tissu cardiaque chez le lapin.

Présenté par :

Soutenu le : 03/07/24

Nom et prénom : BERKANE Niama

Nom et prénom : SIDI MOUSSA Ouafa

Devant le jury :

Nom

Grade/Lieu

Qualité

Mme OURIACHE H.

MCB /USDB1

Présidente

Mme HAMZI W.

MCA/USDB1

Examinatrice

Mme ROUAKI F.

MCA /USDB1

Promotrice

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la santé, le courage, la force, la volonté et la patience de finir ce mémoire.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice «Mme Rouaki F.», Maître de conférences "A" à l'université de Blida 1, pour sa grande disponibilité, son soutien moral, ses précieux conseils et la confiance qu'elle nous a accordée.

Nous voudrions remercier très chaleureusement «Mme Ouriache H.», maitre de conférences "B" à l'université de Blida 1, pour le grand honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre examinatrice «Mme Hamzi W.», maitre de conférences "A" à l'université de Blida 1, qui a bien voulu consacrer de son temps pour lire notre travail ainsi que pour ses précieuses remarques.

Nous tenons à remercier «Dr Khamsi D.» et son équipes du laboratoire d'anatomie pathologique de Blida.

Nous adressons également notre remerciement au Dr Djadja, Dr Ait Ziene, Dr Belarbi, Dr Benrazki ainsi qu'à toute l'équipe du l'hopitale de Douera.

Enfin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette étude on leur présente nos remerciements et notre gratitude.



Dédicaces

Chaque étape franchie ouvre la voie à une nouvelle aventure et les années ont transformé un rêve en réalité, le voyage, bien que long et ardu, m'a forgé. Avant tout je remercie Allah, le Tout-Puissant, de m'avoir donné la santé et le courage pour achever ce travail, et aujourd'hui, avec une immense fierté et une profonde gratitude je savoure ce moment précieux et je dédie ce succès à :

Mon cher père «Mohamed Salah Eddine »

Un homme dont je porte le nom avec une immense fierté. Ta présence constante dans ma vie, ta sagesse et ton soutien sans faille ont été les piliers sur lesquels j'ai bâti mes rêves, tu as toujours été là pour enlever les obstacles de mon chemin et m'encourager à avancer, grâce à toi, je suis devenue une personne forte et déterminée. Que Dieu t'accorde une longue vie.

Ma très chère mère «Nawel»

A celle dont le cœur aimant m'a toujours vue comme une source de fierté et dont les mains protectrices m'ont toujours entourée de chaleur, à mon pilier et premier soutien dans la réalisation de mes rêves, ma précieuse mère, qui est restée éveillée à mes côtés durant les moments difficiles et dont les prières m'ont accompagné partout, c'est grâce à elle que je suis devenue la fille ambitieuse que je suis aujourd'hui. Que Dieu t'accorde une longue vie.

A ma chère sœur «Meriem» et mon cher frère «Ahmed Ibrahim»

Pour leur soutien, leur affection ainsi que leur encouragement permanents. Vous occupez une place particulière dans mon cœur.

A mes grands-parents maternel, ma grand-mère paternelle, mon oncle et mes tantes, mes cousins et mes cousines pour leur confiance et leurs conseils.

A la mémoire de mon grand-père paternel, une figure chère qui reste éternellement présente dans mon cœur. Que Dieu t'accueille dans son vaste paradis, où ta gentillesse et ta lumière continueront de briller pour l'éternité.

A ma chère amie «Hanine» pour son soutien sans faille et ses encouragements précieux. Que Dieu veille sur elle et lui réserve un avenir rempli de succès.

A mon binôme «Niama» cinq ans de voyage universitaire où nos mains se sont liées avec force. Ensemble, nous avons surmonté des épreuves, luttées pour chaque avancée, et maintenant, au seuil de cette étape finale, nos cœurs se fondent comme deux âmes sœurs, destinées à se soutenir pour toujours.

Quafa





Dédicaces

Le voyage n'a pas été court et n'aurait pas dû l'être. Le rêve n'était pas proche. Non, la route était semée d'embûches, mais je l'ai fait. Avant tout je remercie Allah, le tout miséricordieux et le tout puissant, qui a facilité les débuts et nous a permis d'arriver à la fin et aujourd'hui, avec une énorme fierté et une profonde gratitude je profite ce moment précieux et je dédie ce succès à :

Mon très cher père «Abderrahman »

À celui dont je porte le nom avec fierté, qui m'a soutenu et m'a appris que la vie est un combat et que son arme est la connaissance, qui m'a appris la patience et la persévérance malgré les difficultés, à celui qui a récolté les épines de mon chemin pour m'ouvrir la voie, et dont les prières m'ont toujours entouré, grâce à toi, je suis devenue une personne forte. Que Dieu t'accorde une longue vie.

Ma très chère mère «Fatiha»

A la précieuse femme qui était mon espoir, au cœur attentionné et à la bougie qui était une lumière pour moi dans les nuits sombres, qui m'a soutenu tout au long de mon voyage et a rendu le chemin facile grâce aux prières qui m'ont accompagné partout et où j'allais, à celle qui m'a appris à gravir les échelons de la vie avec sagesse et patience, faisant de moi la fille ambitieuse que je suis aujourd'hui. Que Dieu t'accorde une longue vie.

À ma très chère sœur «Doâa» et mon très cher frère «Abdelaziz»

Pour leur soutien, leur affection ainsi que leur encouragement permanents. Vous occupez une place particulière dans mon cœur.

À mes grands-parents paternel, mes grands-parents maternels, mes oncles et mes tantes, mes cousins et mes chères cousines « Nabila, Iman, Yasmine, Hasnaa, Rihab » pour leur confiance, leurs conseils et leur soutien inconditionnel.

À mes chères amies «Serine, Ahlem, Manel» pour ses soutiens sans faille et ses encouragements précieux. Que Dieu veille sur elles et lui réserve un avenir rempli de succès.

À mon binôme «Ouafa» cinq ans de voyage universitaire où nos mains se sont liées avec force. Ensemble, nous avons surmonté des épreuves, luttées pour chaque avancée, et maintenant, au seuil de cette étape finale, nos cœurs se fondent comme deux âmes sœurs, destinées à se soutenir pour toujours.

À tout la famille Berkane et Khimiri et toutes les personnes que j'aime.

Niama



Résumé

L'objectif de notre étude est de déterminer les effets de la supplémentation en alpha-tocophérol (α -T) à différentes doses (600, 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment), sur le bilan cardiaque, à savoir : la créatine phosphokinase (CPK) et la troponine inhibitrice (TnI) ainsi que sur l'histologie du tissu cardiaque, chez le lapin traité pendant huit semaines; et ceci afin de montrer que selon la dose l'effet antioxydant de l' α -T pouvait basculer en un effet pro-oxydant.

Au terme de cette étude, les principaux résultats obtenus montrent une augmentation non significative de la CPK et de la TnI du lot supplémenté en 600 mg d' α -T/kg d'aliment par rapport au témoin ; par contre nous avons obtenu pour les lots supplémentés en 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment, une augmentation très significative du taux sérique de CPK, accompagnée d'une augmentation hautement significative de la teneur en TnI par rapport au témoin, ces résultats montrent qu'il y a altération de la fonction cardiaque due aux doses élevées d' α -T administrés.

L'étude histologique du tissu cardiaque des lots ayant été supplémentés en 1200 et 1800 mg d' α -T/ kg d'aliment a confirmée les altérations de la fonction cardiaque, révélées par l'élévation des paramètres biochimiques, et ceci par la présence d'infiltrats lymphocytaires, d'importantes congestions, de foyers nécrotiques et la présence de nombreuses fibroses, précisons que ces dernières ont induits un dysfonctionnement cellulaire entraînant d'importantes altérations tissulaires; il est à noter que l'immunohistochimie a révélée l'absence du phénomène d'apoptose, du fait de l'absence de l'antisuppresseur de tumeur : la p53 et ceci pour l'ensemble des lots. En finalité nous pouvons conclure qu'aux doses 1200 et 1800 mg d' α -T/ kg d'aliment, l' α -T a induit un stress oxydatif.

Mots clés : alpha-tocophérol, bilan cardiaque, histologie, lapin, pro-oxydant.

Abstract

The objective of our study is to determine the effects of alpha-tocopherol (α -T) supplementation at different doses (600, 1200 and 1800 mg of α -T / kg of food), on the cardiac balance, namely: creatine phosphokinase (CPK) and inhibitory troponin (InT) as well as on the histology of the cardiac tissue, in rabbits treated for eight weeks, and this in order to evaluate the dose for which the α -T switches from the antioxidant effect to a pro-oxidant.

At the end of this study, the main results obtained show a non-significant increase in the CPK and the InT of the batch supplemented with 600 mg of α -T/ kg of food compared to the control; on the other hand, we obtained for the batches supplemented with 1200 and 1800 mg of α -T / kg of food, a very significant increase in the serum CPK level, accompanied by a highly significant increase in the InT content compared to the control, these results show the presence of cardiac lesions due to high doses of α -T.

The histological study of the cardiac tissue of the batches having been supplemented with 1200 and 1800 mg of α -T / kg of food confirmed the cardiac lesions revealed during the elevation of the dosed biochemical parameters, and this by the presence of lymphocytic infiltrates, significant congestions, necrotic foci and the presence of numerous fibroses, it should be noted that the latter induced cellular dysfunction leading to significant tissue alterations; it is noted that immunohistochemistry revealed the absence of the phenomenon of apoptosis, due to the absence of the tumor antisuppressant: p53 and this for all batches. Finally, at doses of 1200 and 1800 mg of α -T / kg of food, the antioxidant: α -T induced oxidative stress.

Key words: alpha-tocopherol, cardiac assessment, histology, rabbits, pro-oxidant.

ملخص

الهدف من دراستنا هو تحديد آثار مكملات ألفا توكوفيرول (α -T) (600, 1200, 1800 ملغ من α -T/كغ من الغذاء) على توازن القلب، وهي: CPK) créatine phosphokinase) و (TnI) Troponine inhibitrice وكذلك على الأنسجة من أنسجة القلب، في الأرانب المعالجة لمدة ثمانية أسابيع، وهذا من أجل تقييم الجرعة التي يتحول α -T من تأثير مضاد للأكسدة إلى مؤيد للأكسدة.

في نهاية هذه الدراسة، أظهرت النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها زيادة غير معتبرة في CPK و TnI و هذا في ما يتعلق بالمجموعة المكملة ب 600 ملغ من α -T /كغ من الغذاء مقارنة بمجموعة الشاهد؛ من ناحية أخرى، لقد حصلنا على زيادة معتبرة في CPK و TnI بالنسبة للمجموعات المكملة ب 1200 و 1800 ملغ من α -T /كغ من الغذاء، مقارنة بمجموعة الشاهد، تظهر هذه النتائج وجود آفات قلبية بسبب الجرعات العالية من α -T.

أكدت الدراسة النسيجية للأنسجة القلبية ظهور الآفات قلبية للمجموعات التي تم استكمالها ب 1200 و 1800 ملغ من α -T /كغ من الغذاء والتي تم الكشف عنها أثناء ارتفاع المعلمات البيوكيميائية للجرعات، وهذا من خلال وجود تسربات لمفاوية، وتخثر الدم، وبؤر نخرية ووجود العديد من الألياف، وتجدر الإشارة إلى أن هذا الأخير تسبب في خلل وظيفي خلوي يؤدي إلى تغيرات كبيرة في الأنسجة؛ يشار إلى أن الدراسة الكيميائية المناعية كشفت عن عدم وجود ظاهرة موت الخلايا المبرمج، بسبب عدم وجود مضاد للورم: p53 وهذا لجميع المجموعات. أخيراً، بجرعات 1200 و 1800 ملغ من α -T /كغ من الغذاء، مضاد الأكسدة: α -T تسبب الإجهاد التأكسدي.

الكلمات المفتاحية: ألفا توكوفيرول، تقييم القلب، الأنسجة، الأرانب، المؤيد للاكسدة.

Glossaire

Peroxydation lipidique : c'est un phénomène général qui se produit aussi bien dans les aliments que dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines. Elle entraîne des dommages oxydatifs avec des conséquences sur la conservation des aliments et le développement de diverses maladies. (Cillard et Cillard, 2006).

Nécrose : Processus de dégénérescence aboutissant à la destruction d'une cellule ou d'un tissu. (Quevauvilliers et *al.*, 2009).

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

Chapitre I : Etude bibliographique

I. STRESS OXYDATIF.....2

I.1. LES DIFFERENTES ESPECES REACTIVES OXYDANTES 2

I.2. SOURCES DU STRESS OXYDATIF 3

I.3. ACTION DES RADICAUX LIBRES..... 3

I.4. IMPLICATION PATHOLOGIQUE DE STRESS OXYDATIF 4

II. LES ANTIOXYDANTS5

II.1. DIFFERENTS TYPES D'ANTIOXYDANTS 5

III. VITAMINE E.....6

III.1. STRUCTURE DE LA VITAMINE E 6

III.2. ACTION ANTIOXYDANTE ET PRO-OXYDANTE DE LA VITAMINE E 6

III.2.1. Action antioxydant 6

III.2.2. Action pro-oxydante 7

Chapitre II: Matériel et Méthodes

I. MATERIEL8

I.1. MATERIEL NON BIOLOGIQUE (ANNEXE 01)..... 8

I.2. MATERIEL BIOLOGIQUE 8

I.2.1. Animaux étudiée 8

I.2.2. Traitement	9
I.2.3. Préparation de l'aliment	9
II. METHODES	11
II.1. SACRIFICE ET PRELEVEMENT DU SANG.....	11
II.2. ANALYSE DES MARQUEURS BIOCHIMIQUE ET HISTOLOGIQUES DE LA FONCTION CARDIAQUE	12
II.2.1. Analyse des marqueurs biochimiques de la fonction cardiaque.....	12
II.2.1.1. Dosage de la créatine phosphokinase (CPK)	12
II.2.1.2. Dosage de la troponine	13
II.2.2. Etude histologique de tissu cardiaque.....	14
II.2.2.1. Etude macroscopique	14
II.2.2.2. Etude microscopique	14
II.2.2.3. Immunohistochimie (IHC)	20
II.3. Etude statistique	22

Chapitre III : Résultats et discussion

I. EFFETS DE LA SUPPLEMENTATION EN DIFFERENTES DOSES D'ALPHA-T SUR LE BILAN CARDIAQUE.....	23
I.1. ETUDE DE LA SUPPLEMENTATION DE 600 MG D'ALPHA-T/KG D'ALIMENT PAR RAPPORT AU LOT TEMOIN.....	23
I.2. ETUDE DE LA SUPPLEMENTATION DE 1200 ET 1800 MG D'ALPHA-T/KG D'ALIMENT PAR RAPPORT AU LOT TEMOIN	25
II. EFFETS DE LA SUPPLEMENTATION EN DIFFERENTES DOSES D'ALPHA-T SUR L'HISTOLOGIE DU TISSU CARDIAQUE.....	27
II.1. LOT RSE ₆₀₀	27

II.1.1. ETUDE HISTOLOGIQUE PAR LA COLORATION H&E DU LOT RSE₆₀₀ PAR RAPPORT AU LOT RS.....	27
II.1.2. ETUDE HISTOLOGIQUE PAR LA TECHNIQUE TRICHROME DE MASSON DU LOT RSE₆₀₀ PAR RAPPORT AU LOT RS.....	29
II.2. LES LOTS RSE₁₂₀₀ ET RSE₁₈₀₀	31
II.2.1. ETUDE HISTOLOGIQUE PAR LA COLORATION H&E DES LOTS RSE₁₂₀₀ ET RSE₁₈₀₀ PAR RAPPORT AU LOT RS.....	31
II.2.2. ETUDE HISTOLOGIQUE PAR LA TECHNIQUE TRICHROME DE MASSON DES LOTS RSE₁₂₀₀ ET RSE₁₈₀₀ PAR RAPPORT AU LOT RS.....	33
II.3. ETUDE HISTOLOGIQUE PAR LA TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHEMIE DES LOTS RSE₆₀₀, RSE₁₂₀₀ ET RSE₁₈₀₀ PAR RAPPORT AU LOT RS.....	35
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	38

Annexes

Liste des abréviations

ADP : Adénosine DiPhosphate.

CPK : Créatine Phosphokinase.

DAB : 3-3 DiAminoBenzidine.

ER : Espèces réactives.

ERA : Espèces réactives d'azote.

ERO : Espèces réactives oxygène.

GSH : Glutathion.

GSSG : Glutathion-Disulfure.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

IHC : Immunohistochimie.

L[•] : Radical lipidique.

LDL : Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéines de baisse densité).

LOO[•] : Radical pyroxy.

LOOH : Hydroperoxydes.

MDA : Malondialdehyde.

NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène.

OH[•] : Radical Hydroxyl.

RL : Radicaux libres.

RS : Régime Standard.

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

RSE₁₈₀₀ : Régime Standard supplémenté en 1800 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

RSE₆₀₀ : Régime Standard supplémenté en 600 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

TnI : Troponine Inhibitrice.

Vit : Vitamine.

α -T : α - Tocophérol.

α -T[•] : Radical α -Tocophéroxyl

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Rahman et <i>al.</i> , 2012)	2
II	Sources de stress oxydant endogènes et exogènes (Haleng et <i>al.</i> , 2007)	3
III	Préparation des régimes	9

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Les ERO induit des dommages oxydatifs sur les lipides, les protéines et l'ADN (Sharma et <i>al.</i> , 2012).	4
2	Pathologies associées aux ERO (Lee et <i>al.</i> , 2004).	4
3	Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant (Denys, 2013).	5
4	Structure des différents vitamères de la vitamine E (Landrier, 2011).	6
5	Coopération entre les systèmes non enzymatiques et enzymatiques (Xavier, 2009).	7
6	La peroxydation lipidique par l' α -TOH (Stoker et <i>al.</i> , 1999).	8
7	Expérimentation animal (photo originale).	8
8	Aliments fournis aux lapins (Photo original).	9
9	La vitamine E commerciale (photo originale).	10
10	Prélèvement du sang dans des tubes héparine (photo originale).	11
11	Dissection des lapins et prélèvement de cœur (photo originale).	11
12	Les fragments du cœur imprégnés dans du formol (photo originale).	14
13	Les étapes de préparation des cassettes (photos originales).	15
14	Automate de circulation (Leica) (photo originale).	16
15	La confection des blocs (photo originale).	17
16	Obtention des coupes sous forme d'un ruban (Leica) (photo originale).	17
17	L'appareil de coloration (Leica) (photo originale).	18
18	Montage des lames (photo originale).	20

19	Appareil PT Link et le pH utilisé (photo originale).	21
20	Traçage avec l'A-PAP Pen (photo originale).	21
21	La chambre noire humide (photo originale).	22
22	Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (600mg/kg d'aliments) sur CPK (fig.22a) et TnI (fig.22b) chez les lapins. 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).	23
23	Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (1200 et 1800mg/kg d'aliments) sur CPK (fig.25a) et TnI (fig.25b) chez les lapins. 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).	25
24	Histologie de tissu cardiaque des lots RS et RSE ₆₀₀ par la coloration H&E.	28
25	Histologie de tissu cardiaque des lots RS et RSE ₆₀₀ par la coloration Trichrome de Masson.	30
26	Histologie du tissu cardiaque des lots RS et RSE ₆₀₀ par la coloration (H&E).	31
27	Histologie du tissu cardiaque des lapins par la coloration trichrome de Masson.	33 34
28	Histologie du tissu cardiaque des lapins par l'étude immunohistochimique de p53.	35

Introduction

Toutes les cellules vivantes sont constamment exposées à des oxydants, provenant de sources endogène et exogène ; ces oxydants sont responsables de la production continue de molécules réactives, communément appelées espèces réactive de l'oxygène et espèce réactive de l'azote, l'accumulation de ces dernières mène à un stress oxydatif (**Savall, 2020**). Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif, défini comme un déséquilibre entre la production de ces espèces réactives et la capacité de l'organisme à les neutraliser à l'aide de ses défenses antioxydantes ; et est responsable de dommages oxydatifs impliqués dans le développement de diverses maladies dégénératives, telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires (**Aggarwal et al., 2019**).

Pour contourner les dommages causés par les espèces réactive de l'oxygène et de de l'azot, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants, qui peuvent être enzymatique (Superoxyde dismutase, Catalase...) et non enzymatiques (vitamine C, vitamine E...), dans la plupart des cellules, pour éliminer les radicaux libres qui sont constamment générés (**Desmir, 2016**) ; la vitamine E découverte en 1920, possède de nombreuses fonctions physiologiques, et par l'un de ses isomères qui est l'alpha-tocophérol, joue le rôle de puissant antioxydant, celui-ci est connu pour réguler les altération de l'équilibre redox liée à diverses maladies et est considéré comme élément essentiel (**Miyazawa et al., 2019**). Cependant l'alpha-tocophérol peut avoir un effet pro-oxydant qui consiste à augmenter la peroxydation des lipides, un processus bien connu *in vitro* (**Bowry et al., 1992**). Des études avec des suspensions micellaires (**Mukai, 1993**) et des LDL isolées (**Thomas et al., 1996**) ont montré que de fortes doses d'alpha-tocophérol ont un effet pro-oxydant. La raison de cette activité pro-oxydante est l'interaction des radicaux tocophéroxyls avec des radicaux peroxylys ou avec les acides gras polyinsaturés dans les LDL, cette réaction conduit à l'accumulation d'hydroperoxydes et de diènes conjugués (**Mukai, 1993**).

Actuellement, il existe peu d'études *in vivo* sur le potentiel pro-oxydatif de fortes doses de vitamine E, et c'est dans ce contexte que s'insère notre étude dont l'objectif est d'évaluer l'évolution les paramètres biochimiques et l'étude histologique du tissu cardiaque, chez le lapin avec régime standard supplémenté en 600, 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment, nous souhaitons contribuer à une meilleure compréhension de cet effet pro-oxydant de l'alpha-tocophérol.

Chapitre I : Etude Bibliographique

I. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme l'ensemble des agressions causées par des radicaux libres (RL), ces derniers doivent en principe être neutraliser par des mécanismes de défense physiologiques (Sebbar et al., 2023). Le stress oxydatif peut être défini aussi comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou à des dommages moléculaires (Sies, 2020).

I.1. Les Différentes espèces réactives oxydantes

Les espèces réactives oxydantes sont des atomes ou molécules générées par voie enzymatique ou par interactions chimiques (Thannickal et Fanburg, 2000). Il existe deux grandes familles d'ER : les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces réactives d'azote (ERA) (Tableau I).

Tableau I. Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

	Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)	Espèces Réactives azotées (ERA)
Radicalaires	<ul style="list-style-type: none"> - Anion Superoxyde: $O_2^{\bullet -}$ - Radical Hydroxyle: $\bullet OH$ - Radical peroxy: $RO\bullet$ - Radical Alcoxy: $ROO\bullet$ 	<ul style="list-style-type: none"> - Monoxyde d'azote : $NO\bullet$ - Acide nitrique : HNO_2
Non Radicalaires	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxyde d'hydrogène: H_2O_2 - Oxygène singulet: 1O_2 - Peroxyde d'hydrogène: HOCL - Acide hypochloreux: $ROOH$ 	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxynitrite: $ONOO^-$ - Dioxyde d'azote: NO_2

(Rahmanet al., 2012)

I.2. Sources du stress oxydatif

Les sources de stress oxydant peuvent avoir diverses origines (Tableau II).

Tableau II. Sources de stress oxydant endogènes et exogènes

Source exogène		Source endogène
Hygiène de vie	Environnement	
<ul style="list-style-type: none"> - Tabagisme - Faible consommation en fruits et légumes - Alcool - Médicaments ` - Pilule contraceptive - Exposition au soleil - Exercice intense ou mal géré 	<ul style="list-style-type: none"> - Pollution - Ozone - Amiante - Radiations - Contacts avec des substances cancérogènes 	<ul style="list-style-type: none"> - Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion) - Inflammation - Altération de la fonction endothéliale - Surcharge en fer - Oxydation de l'hémoglobine - Altérations mitochondriales - Biosynthèse des prostaglandines - Interventions chirurgicales (Circulation extra-corporelle, transplantations)

(Haleng et al., 2007)

I.3. Action des radicaux libres

La production excessive de RL provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) (figure 01), mais aussi des lésions indirectes dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

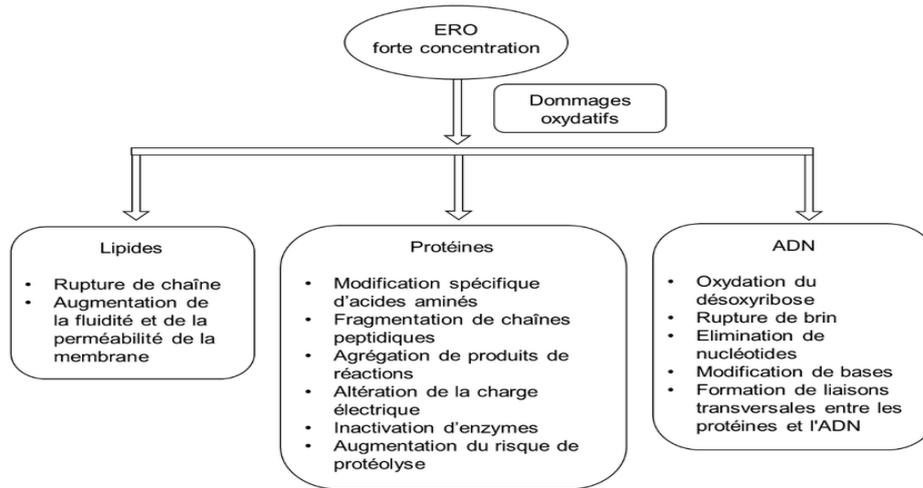


Figure 01. Les ERO induit des dommages oxydatifs sur les lipides, les protéines et l'ADN (Sharma *et al.*, 2012).

I.4. Implication pathologique de stress oxydatif

De nombreuses pathologies sont caractérisées par un stress oxydatif accru (Berger, 2006) (figure 02).

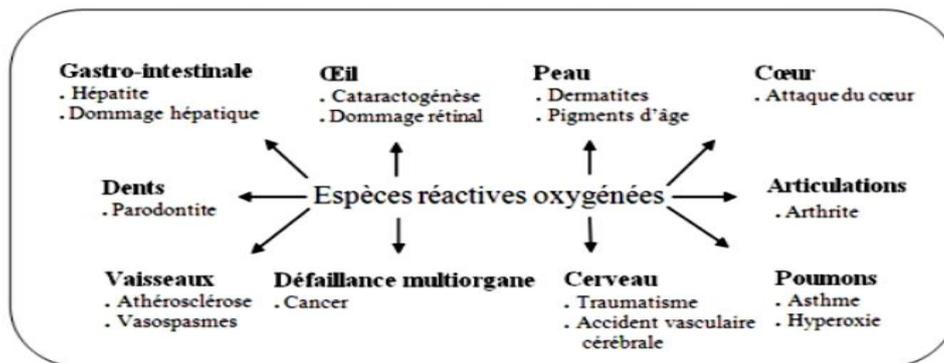


Figure 02. Pathologies associées aux ERO (Lee *et al.*, 2004).

II. Les antioxydants

Un antioxydant est une espèce chimique inhibant le stress oxydant au sein de l'organisme (Tang et Halliwell, 2010), ils peuvent interagir en toute sécurité avec les RL et effectuer une réaction en chaîne avant que les molécules vitales soient endommagées (Oroian et Escriche, 2015).

II.1. Différents types d'antioxydants

Les antioxydants sont répertoriés selon leur origine (figure 03), les antioxydants endogènes de types enzymatiques qui sont impliqués dans la neutralisation des ERO, alors que les antioxydants non enzymatiques et ceux d'origine exogène sont des donneurs de protons ou d'électrons (Durand, 2013).

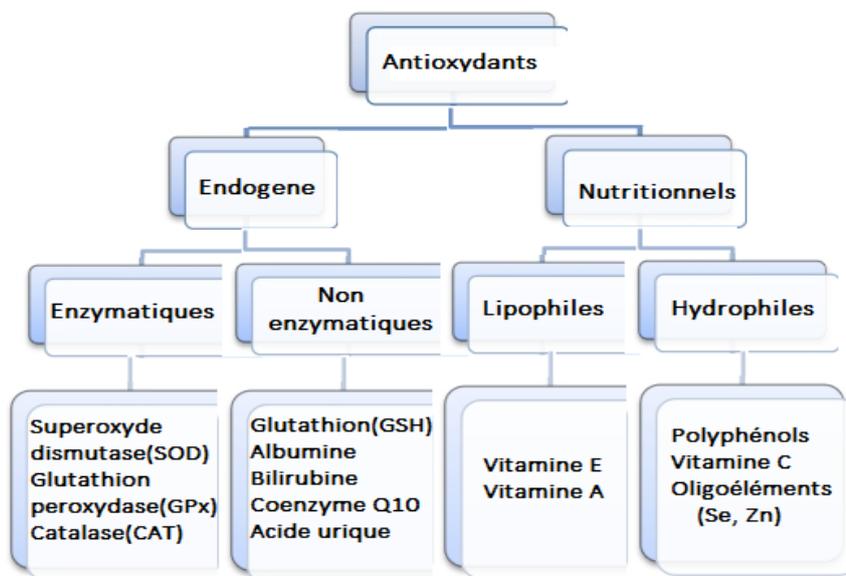


Figure 03. Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant (Durand, 2013).

III. Vitamine E

La vit E fait partie de la famille des tocophérols, nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et *al.*, ce nom vient du grec tokos signifiant accouchement ou enfantement et du mot phérol signifiant porter ; c'est l'antioxydant majeur des milieux lipidiques (huiles, membranes biologiques, lipoprotéines) (Cuvelier et *al.*, 2003).

III.1. Structure de la vitamine E

La structure de la vit E présente différentes formes moléculaires : des vitamères alpha, beta, gamma et delta, chaque vitamère existant sous différentes formes stéréo-isomériques (Gamma et Spriano, 2021). La molécule présente deux parties (figure 04) : un noyau 6-OH-chromane qui possède la fonction anti-oxydante, et une chaîne latérale à 16 atomes de carbone de structure isoprénique (Leger, 2000).

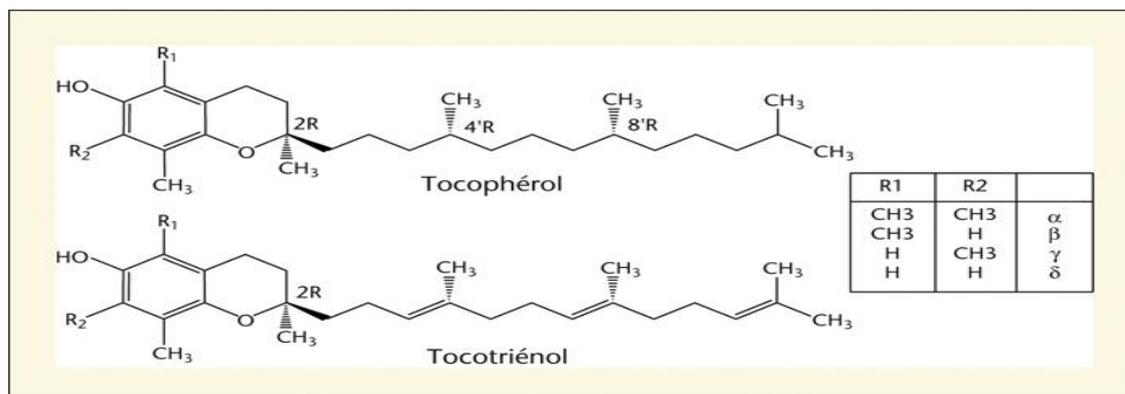


Figure 04. Structure des différents vitamères de la vitamine E (Landrier, 2011).

III.2. Action antioxydante et pro-oxydante de la vitamine E

L'incohérence dans les effets de la vit E peut être liée à la fonction complexe et au comportement chimique de la vit E, elle est capable d'avoir un effet antioxydant, neutre ou un effet pro-oxydant (Rietjens et *al.*, 2002).

III.2.1. Action antioxydant

La vit E, en tant qu'antioxydant liposoluble, joue un rôle crucial dans la protection des membranes cellulaires contre les dommages oxydatifs causés par les RL. Son mécanisme d'action repose sur sa capacité à neutraliser les RL en leur fournissant un atome d'hydrogène, ce qui limite la peroxydation lipidique et stabilise les membranes riches en acides gras polyinsaturés (Rizvi et *al.*, 2014). L'oxydation de l'α-T conduit à un radical tocophéryl qui peut être secondairement régénéré en présence de vit C (figure 05), elle-même régénérée par le glutathion réduit (Leverve, 2009).

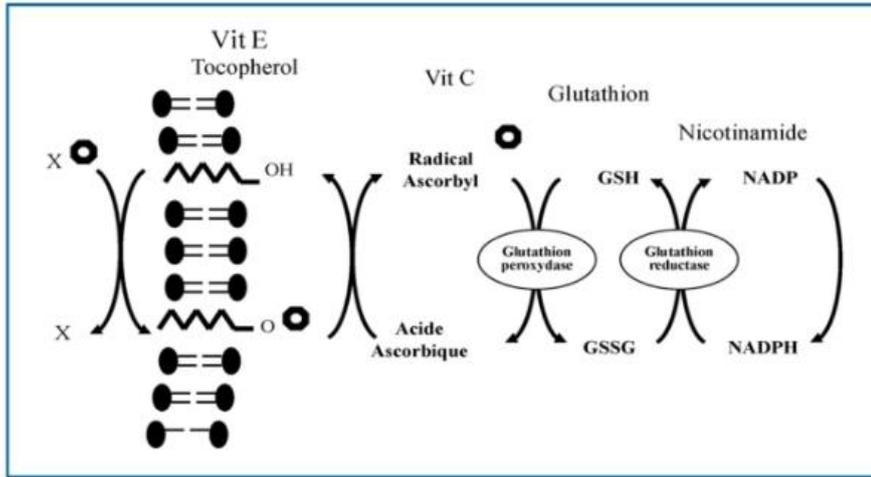


Figure 05. Coopération entre les systèmes non enzymatiques et enzymatiques (Leverve, 2009).

III.2.2. Action pro-oxydante

L' α -TOH s'oxyde en α -TO• pour rompre la peroxydation lipidique dans les membranes phospholipidiques et les LDL (figure 06) (réaction [1']), l' α -TO• peut arracher un atome d'hydrogène des lipides (LH) de surface ou de noyau qui contiennent des hydrogènes bisallyliques (réaction [1]) ; cela produit α -TOH et un radical lipidique (L•) centré sur le carbone auquel s'ajoute de l'oxygène moléculaire. Le radical peroxyde lipidique résultant (LOO•) est stabilisé rapidement par α -TOH (réaction [2]) pour produire de l'hydroperoxyde lipidique (LOOH) et régénérer α -TO•. Les coantioxydants (XH) inhibent la peroxydation en stabilisant l' α -TO• (réaction [3]) et produisant du radical dérivé du coantioxydant (X•) dans l'espace aqueux (réaction [4]), où il se désintègre en produits non radicalaire (PNR) (Stoker et al., 1999).

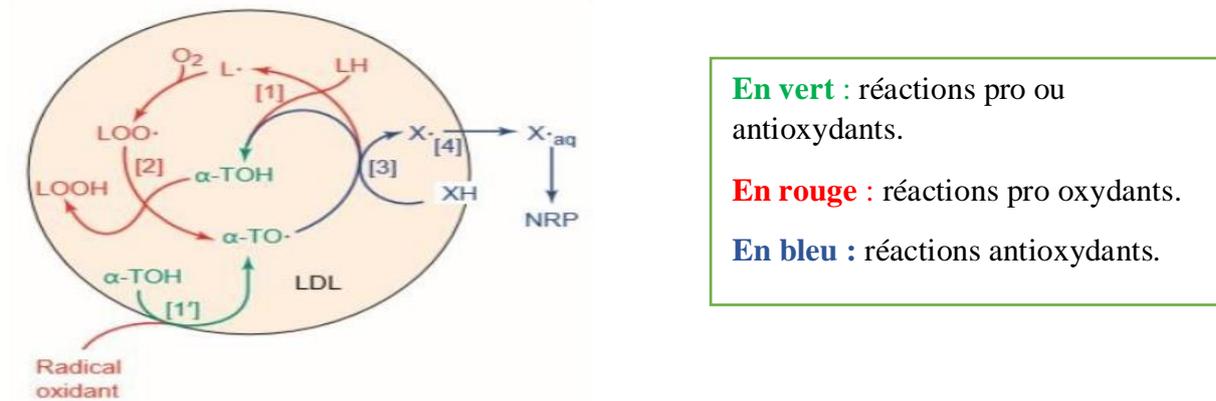


Figure 06. La peroxydation lipidique par l' α -TOH (Stoker et al., 1999).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée conjointement au laboratoire Khemsi de Blida et au CHU de Douera, s'étendant du mois de Janvier au mois de Mai. Pour cela, une expérimentation animale a été menée sur des lapins, afin de mettre en évidence l'effet de la supplémentation en dose croissante d' α -T (600, 1200 et 1800mg/kg d'aliment), qui est incorporée dans un régime alimentaire équilibré et administré sur une période de 8 semaines. Notons que l'objectif de la présente étude était d'observer les effets de l' α -T sur le bilan cardiaque (CPK et Troponine) et l'histologie du tissu cardiaque.

I. Matériel

I.1. Matériel non biologique (Annexe 01)

Tous le matériel non biologique est cité dans l'annexe 01

I.2. Matériel biologique

I.2.1. Animaux étudiée

L'expérimentation animale a été réalisées sur 12 lapins sevrés, males de souche croisée (Argenté anglais, Petit papillon, blanc de Vendée) âgés de 2 mois et demi environ, dont le poids corporel moyen varié entre 714 à 1760g. Les lapins sont séparés en quatre (04) lots expérimentaux de trois(03) lapins chacun après une semaine d'adaptation et maintenus dans des clapiers en métal (Figure 07), et nettoyés trois fois par semaine (La ferme de démonstration et de la production de semences de Baba Ali).



Figure 07. Expérimentation animal (2024).

L'eau est donnée *ad libitum* jusqu'à la fin de l'expérimentation.

I.2.2. Traitement

Les lapins ont été répartis en 4 lots de 3 lapins chacun, en fonction de la dose en vit E qui a été administrée (Tableau III).

Tableau III : Préparation des régimes.

Lot	Régime consommé
Témoin	Un régime standard (RS)
RSE ₆₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 600 mg d' α -T / kg d'aliment
RSE ₁₂₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 1200 mg d' α -T / kg d'aliment
RSE ₁₈₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 1800 mg d' α -T / kg d'aliment

I.2.3. Préparation de l'aliment

L'aliment est donné aux lapins après broyage sous forme de fins granules (figure 08). Sa composition est portée Annexe 2 et est produit par SARL (Production locale CEREGAN Bouzareah).



Figure 08. Aliments fournis aux lapins (2024)

Chapitre II: Matériel et méthodes

L' α -T est acheté en pharmacie sous le nom commerciale Vitamine E et sous forme de gélule de 100 mg (Figure 09), elle sera mélangé à l'aliment.



Figure 09. La vitamine E commerciale (2024).

II. Méthodes

II.1. Sacrifice et prélèvement du sang

Suite aux 8 semaines d'expérimentation, les lapins sont sacrifiés après 12 heures de jeûne et le sang est recueilli à partir de la veine jugulaire dans des tubes héparines et étiquetés, pour le dosage des paramètres cardiaques (CPK, TnI) (Figure 10).

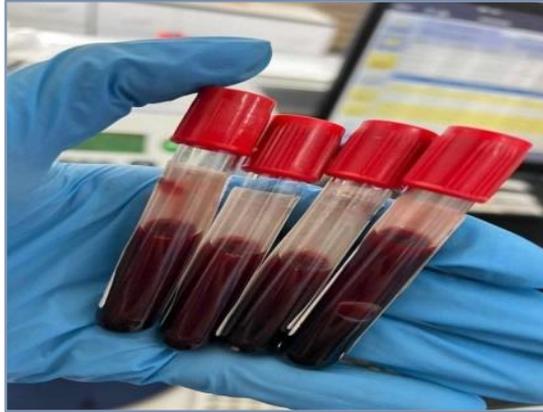


Figure 10. Prélèvement du sang dans des tubes héparine (2024).

Après le sacrifice, une dissection a été réalisée (Figure 11), le cœur est prélevé, rincé à l'eau physiologique (0.9%) pour éliminer le surplus de sang du tissu cardiaque qui est connu comme étant un organe richement vascularisé.



Figure 11. Dissection des lapins et prélèvement de cœur (2024).

II.2. Analyse des marqueurs biochimique et histologiques de la fonction cardiaque

II.2.1. Analyse des marqueurs biochimiques de la fonction cardiaque

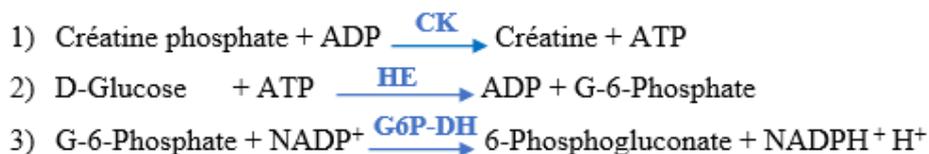
II.2.1.1. Dosage de la créatine phosphokinase (CPK)

a. Principe

La méthode de dosage enzymatique été décrit par **Olive et Biochem (1955)**, modifiée par **Rosalki et al., (1967)** puis par **Szasz et al., (1976)**.

La créatine phosphokinase (CPK) catalyse le transfert réversible d'un groupe dephosphates de la phosphocréatine vers l'ADP (réaction 01). Cette réaction s'accouple avec d'autres réactions catalysées par l'hexokinase (HK) (réaction 02) et par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) (réaction 03).

La vitesse de formation de NADPH, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique en CPK présente dans l'échantillon testé.



b. Mode opératoire

	Automate	Technique manuelle
Température	25-30°C	37°C
Réactif de travail (R1+R2)	240 µL	1000 µL
Echantillon	12 µL	50 µL
Mélanger et laisser incuber 2 minutes.		
Lire l'absorbation (A) initiale de l'échantillon, mettre en route le chronomètre et lire l'absorbation à chaque minute pendant 3 minutes.		
Calculer la moyenne de l'augmentation d'absorbation par minute ($\Delta A/\text{min}$).		

c. Calculs de concentration :

La concentration de CPK est calculée par les deux formules suivantes :

$$25^{\circ} - 30^{\circ}\text{C CK (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 4127$$

$$37^{\circ}\text{C CK (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 8095$$

II.2.1.2. Dosage de la troponine

a. Principe

Le premier chercheur japonais à explorer le principe de la troponine cardiaque fut par **Ebashi et al., (1965)**, ensuite deux techniques clés ont révolutionné ce domaine, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), développé par **Engvall et Perlmann (1971)**, et le système VIDAS, introduit par les chercheurs de **bioMérieux en 1991**.

Le principe de dosage de la troponine repose sur des immunoessais spécifiques utilisant des anticorps pour capturer et détecter la troponine présente dans le sang. Un premier anticorps se lie à la troponine, puis un second anticorps lié à une enzyme se lie à ce premier anticorps ; lorsque le substrat est ajouté, un signal mesurable est généré.

b. Mode opératoire

Etape	Automate VIDAS	Manuel ELISA
Echantillon	200 µL	100 µL
Température	37°C	37°C
Temps d'incubation	10 min	1-2 heures
Anticorps primaire	Préchargé dans la bande de teste	Pré-enduit sur la microplaque
Anticorps secondaire	Conjugué à l'enzyme Phosphatase alcaline	100 µL d'anticorps conjugué à l'enzyme peroxydase de raifort
Incubation secondaire	10 min à 37°C	1 heures à 37°C
Lavage	tampon de lavage	3-5 fois avec tampon de lavage
Substrat	4-méthylumbelliféryle phosphate	100 µL de tétraméthylbenzidine
Réaction enzymatique	10 min à (20-25°C)	15-30 min à (20-25°C)
Solution d'arrêt	Non applicable	50 µL d'acide sulfurique
Lecture	Fluorescence	Absorbance à 450nm

II.2.2. Etude histologique de tissu cardiaque

Le but de cette étude est d'obtenir des coupes fines observables au microscope photonique, grâce à une coloration spécifique à partir des tissus déjà fixés au formol, en passant par plusieurs étapes qui s'enchaînent.

II.2.2.1. Etude macroscopique

Le cœur prélevé est coupé délicatement en petit fragments, ensuite imprégnés dans du formol à 10% dans des tubes afin de bien les conserver avant l'étude histologique.



Figure 12. Les fragments du cœur imprégnés dans du formol (2024).

II.2.2.2. Etude microscopique

Les étapes selon le protocole suivie par le laboratoire de Khamsi Blida et le service cytologie et anatomie pathologiques au CHU.

A. La fixation

Nous avons coupé les fragments du cœur, déjà conservés dans le formol, en frottis, puis nous les avons placés dans des cassettes, ensuite nous les avons redessinés dans un panier du formol dilué à 10%, puis mis dans le micro-ondes dans le but d'améliorer leur fixation (figure 13).

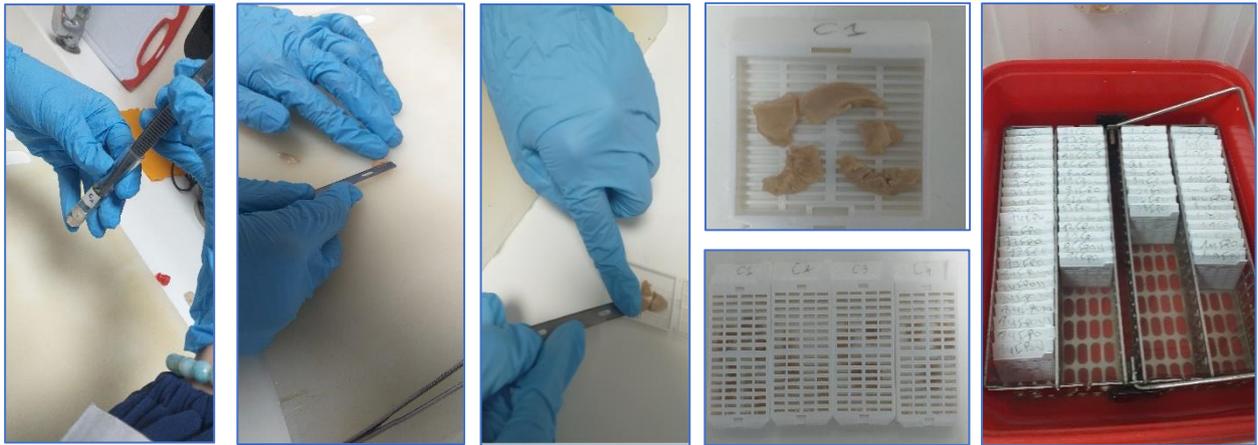


Figure 13. Les étapes de préparation des cassettes (2024).

B. Circulation

Il s'agit de la première étape après la fixation, elle consiste à enlever l'eau présente dans les cellules ; il faut d'abord passer le tissu dans des liquides intermédiaires qui sont miscibles à l'eau (de manière à l'enlever du tissu) et au milieu d'inclusion (de manière à le laisser pénétrer le tissu). Toutes les étapes du cycle sont réalisées par un circulateur automatique (Leica autotechnicon) à 12 bains et permet une série d'opérations :

- ✓ **Post-mordantage** : cette étape est considérée comme une suite de la fixation du tissu par imprégnation des cassettes dans un bain de formol à 10% pendant 1h.
- ✓ **La déshydratation** : la première étape de la circulation proprement dite est la déshydratation : elle consiste à débarrasser le tissu de l'eau par un agent déshydratant qui effectivement doit-être miscible à l'eau. Elle s'effectue par immersion des échantillons dans une succession de cinq (05) bains d'alcool (éthanol absolue) pendant 1h dans chaque bain ; Cela sert à éviter de briser le tissu et sa détérioration.
- ✓ **Eclaircissement** : C'est l'étape de la clarification des échantillons par l'utilisation des agents éclaircissant. Il consiste à enlever l'alcool par un solvant à la paraffine (xylène ou toluène) afin de repousser les traces d'alcool. Cela se fait par imprégnation des fragments déshydratés dans trois bains de xylène à une durée de 1h pour chaque bain.
- ✓ **Imprégnation** : C'est l'étape terminale de la circulation, elle permettra de rendre le prélèvement solide et inflexible afin de procéder à la coupe par l'évaporation du xylène et leur remplacement par la paraffine fondue à 56°C. Les prélèvements passent par 3 bains de paraffine pendant 3h dans chaque bain.



Figure 14. Automate de circulation (leica) (2024).

C. Enrobage et confection des blocs

L'inclusion consiste à infiltrer la paraffine fondue dans le tissu ce qui donne la rigidité et la résistance mécanique nécessaire à la réalisation des coupes fine et régulière en forme de ruban. Cette étape est effectuée dans un système d'inclusion en suivant ce protocole :

- déposer le moule métallique dans la partie chaude de l'automate et couler la paraffine.
- lever l'échantillon tel qu'il est sans inverser les faces à l'aide des pinces chauffées et la mise dans le moule métallique.
- déplacer le moule à l'espace froid et appuie rapidement sur l'échantillon par une pince pour éviter la formation de la première couche de la paraffine.
- déposer la cassette codifiée au-dessus de la pièce, appuie un peu et verser la paraffine.
- laisser refroidir dans l'appareil de refroidissement environ 10 min pour aider à démouler facilement et obtenir un bloc solide.
- nettoyer les côtés du bloc des résidus de paraffine.
- conserver les blocs dans le réfrigérateur à 4°C jusqu'à la réalisation de la coupe.

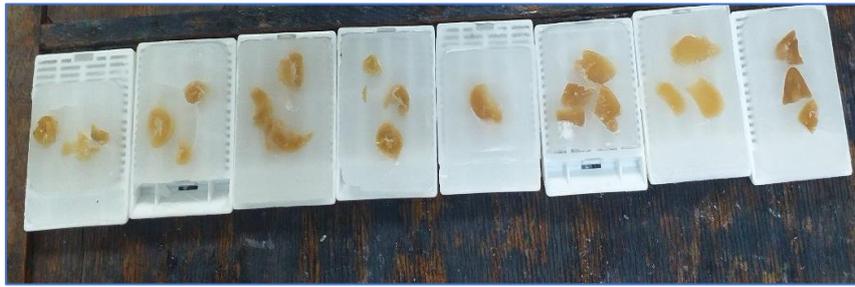


Figure 15. La confection des blocs (2024).

D. Microtomie ou confection des lames

A l'aide d'un microtome (Leica) (figure 16a), le bloc de paraffine est coupé à une épaisseur de $3\mu\text{m}$, nous donnons de fins rubans de paraffine qu'on met par la suite dans un défripeur (figure 16b) pour défriper le tissu sur l'eau. On étale ces rubans sur des lames puis on les fait sécher dans une étuve.



Figure 16. Obtention des coupes sous forme d'un ruban (Leica) (2024).

❖ Déparaffinage et réhydratation

- **Déparaffinage :** on a mis les lames dans un bain de xylène pendant 2min pour enlever la paraffine du tissu pour pouvoir être coloré.
- **Réhydratation :** les lames passent dans un bain d'alcool pendant 2min afin de remplacer le xylène des tissus par de l'eau.

E. Coloration

Après séchage, les lames sont colorées en utilisant des types de coloration.

1) Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E)

C'est une coloration topographique de base. Elle est utilisée par les pathologistes comme une évaluation initiale pour une vue complète des éléments structurels d'une préparation histologique. Elle est dite bi-chromatique associant 2 colorants différents l'hématoxyline et l'éosine, permettant la distinction entre le noyau et le cytoplasme.

L'hématoxyline colore tout ce qui est à caractère acide y compris le noyau en bleu violacé. L'éosine en tant qu'un colorant acide, colore le cytoplasme en rose.

🎯 Mode opératoire

Cette coloration est réalisée à l'aide d'un appareil de coloration (Leica) (figure 17).

- Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline environ 2 min.
- Rinçage à l'eau courante jusqu'à ce que les lames deviennent claires.
- Baigner les lames dans un bain d'acides chloridrique (garde le noyau coloré), rinçage à l'eau puis l'acide ammoniac (donne une brillance), rinçage à l'eau pendant 2min dans chaque bain.
- Ensuite les lames passent dans le bain qui contient la coloration Eosine (colore le cytoplasme en rose) pendant 2min, rinçage à l'eau.
- Passage des lames dans un bain d'alcool puis un bain de xylène.
- Sécher les lames dans l'étuve suivie d'un montage.



Figure 17. L'appareil de coloration (Leica) (2024).

2) coloration Trichrome de Masson

Le trichrome de Masson est la deuxième coloration topographique de routine utilisé dans notre travail, pour la mise en évidence les fibres de collagène et les tissus conjonctifs, qui combine 3 colorations (tri-chromique) :

- Un colorant nucléaire l'hématoxyline de Groat colore les noyaux en bleu violet.
- Fuch sine ponceau colore le cytoplasme en rouge.
- Le bleu d'aniline permet la différenciation des fibres de collagène qui sont apparait en bleu.

⊙ Mode opératoire

Déparaffiner par le xylène	3 bains, 2min entre chaque bain
Réhydrater à l'aide d'alcool à 100% puis à 95%	2bains, 2 à 5min dans chacun
Réhydrater dans l'eau distillée	2min
Immerger les lames dans une solution alcoolique Aniline	5min
Rinçage à l'eau du robinet	5min
Submerger les lames dans un bain d'hématoxyline de Groat	10 à 15min
Laver les lames lentement à l'eau courante	10min
Tremper les lames dans un bec contenant la fuch sine ponceau	25min
Passage dans un bain de l'eau distillé	Quelques secondes
Immerger les lames dans l'acide phospho-molybdique	5min
Rinçage des lames dans l'eau acétifiée (eau distillée + acide acétique à 100%)	
Colorer les lames par le bleu d'aniline	1 à 3min
Lavage secondaire dans l'eau acidifiée	3bains, 3min pour chacun
Déshydrater avec de l'alcool à 70%, 95% et 100%	2 bains pour chacun, 2min
Éclaircissement par le xylène	2 bains de 5 min chacun
Séchage dans l'étuve suivie par un montage.	

F. Montage et observation

Le montage des coupes est réalisé entre lame et lamelle au moyen d'Eukitt. Ces lames sont observées au microscope optique à différents grossissements (GR x 10, GR× 40 et GR× 100).



Figure 18. Montage des lames (2024).

II.2.2.3. Immunohistochimie (IHC)

L'immunohistochimie permet la révélation des protéines spécifiques et leurs localisations cellulaires dans une coupe de tissu préalablement fixée et incluse en paraffine. Nous utilisons une technique d'IHC indirecte permettant une amplification de l'intensité du signal obtenu après le marquage d'une réaction antigène-anticorps.

🎯 Mode opératoire

- a) **Préparation du tissu** : fixation, circulation, enrobage et microtomie sont identique à celle de la coloration classique. Néanmoins l'étalement des rubans doit se faire sur des lames silanisées pour réduire le risque de décollement des fragments.
- b) **Incubation** : les lames sont déposées dans l'étuve à 37°C pendant 24h afin d'avoir une bonne adhésion des coupes sur les lames.
- c) **Déparaffinage** : passage par 3 bains de xylène (5min chacun).
- d) **Réhydratation** : passage par 3 bains d'alcool à 100%, 95% et 70% (5min chacun).
 - Rinçage à l'eau du robinet puis à l'eau distillée pendant 5min.
- e) **Prétraitement et démasquage antigénique** : cette étape est réalisée à l'aide d'un appareil PT Link à pH 9 (figure 19) ; dans le but d'inhiber les effets secondaires de la fixation.

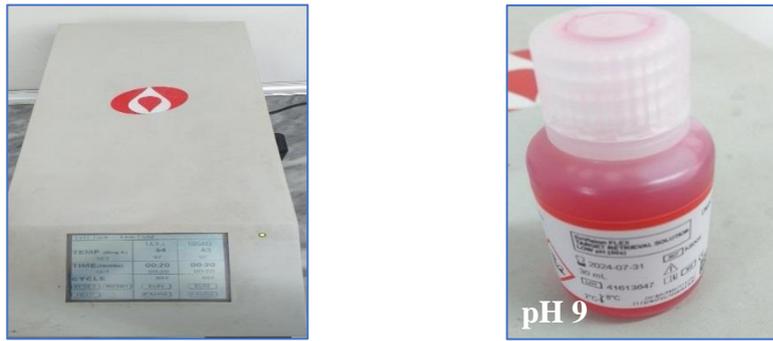


Figure 19. Apparil PT Link et le pH utilisé (2024).

- Rinçage par une solution de lavage (Annexe 03).
- Les coupes tissulaire sont délimitées à l'aide d'un stylo hydrophobe (Dakopen) (figure 20) afin d'empêcher les anticorps de diffuser sur toute la surface de la lame.

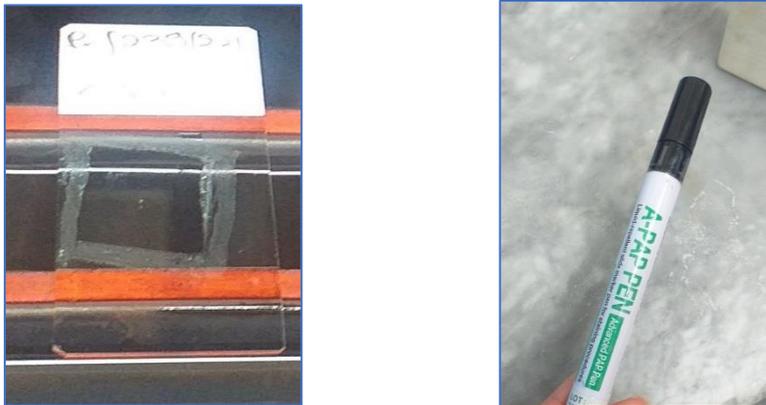


Figure 20. Traçage avec l'A-PAP Pen (flèches) (2024).

- Les coupes tissulaires sont mises à incuber pendant 10min par 200 μ l de la solution peroxyde block dans une chambre noire humide (figure 21) pour le blocage de la peroxydation endogène.
 - Rinçage par une solution de lavage.
- f) Application de l'anticorps primaire :** l'anticorps primaire utiliser est l'anti-P53 est testé sur la totalité des lames pendant 30min dans une chambre humide (figure 21).
- Elimination de l'anticorps primaire par rinçage dans trois bains successif de Wash Buffer (05 min pour chaque bain).



Figure 21. La chambre noire humide (2024).

- g) Application de l'anticorps secondaire :** 200 μ l d'HRP (Horseradish peroxidase) pendant 20min.
- ✓ Rinçage par solution de lavage (Wash Buffer).
- h) Révélation :** ajouter 200 μ l de solution DAB dilué (Annexe 03) (3,3'-Diaminobenzidine) sur les lames, dès que la coloration marron apparaisse, la réaction est arrêtée par un rinçage.
- i) Contre coloration :** avec l'hématoxyline de Mayer pendant 05min. Puis l'élimination de l'excès de coloration par bleuissement.
- j) montage :** les coupes sont montées entre lame et lamelle par l'Eukitt.
- k) Observation microscopique :** à l'aide d'un microscope photonique.

II.3. 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 ou moins l'écart type et sont considérés comme :

- Significative lorsque ($P \leq 0,05$)
- Très significative comparant au témoin ($P \leq 0,01$)
- Hautement significative comparant au témoin ($P \leq 0,001$)

Avec (P) : seuil de signification.

Chapitre III : Résultats et discussion

La discussion de nos résultats s'est abordée selon deux grandes parties à savoir une première qui concernera le bilan cardiaque et une seconde l'étude histologique :

I. Effets de la supplémentation en différentes doses d' α -T sur le bilan cardiaque

Lors du présent travail, nous avons évalué l'activité de la CPK et de la TnI, afin de déterminer les effets de la supplémentation de l' α -T (600, 1200 et 1800 mg/kg d'aliment) sur le tissu cardiaque. Les résultats de ces deux paramètres (CPK et TnI) seront répartis selon les effets obtenus à savoir, aucun effet pour le lot RSE₆₀₀ et un effet pro-oxydant pour les lots supplémentés en 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment. Il est à noter que très peu d'études discutent l'effet pro-oxydatif de la Vit E sur les paramètres cardiaques plasmatiques.

I.1. Etude de la supplémentation de 600 mg d' α -T/kg d'aliment par rapport au lot témoin

Les valeurs que nous avons obtenus lors du dosage de la CPK (figure 22a) et la TnI (figure 22b) pour les lots RSE₆₀₀ sont respectivement de $762,66 \pm 28,50$ et $1,13 \pm 0,05$ est variés de manière non significative ($p < 0.05$) par rapport au témoin (RS) et qui sont respectivement de $640,33 \pm 33$ et $0,93 \pm 0,25$.

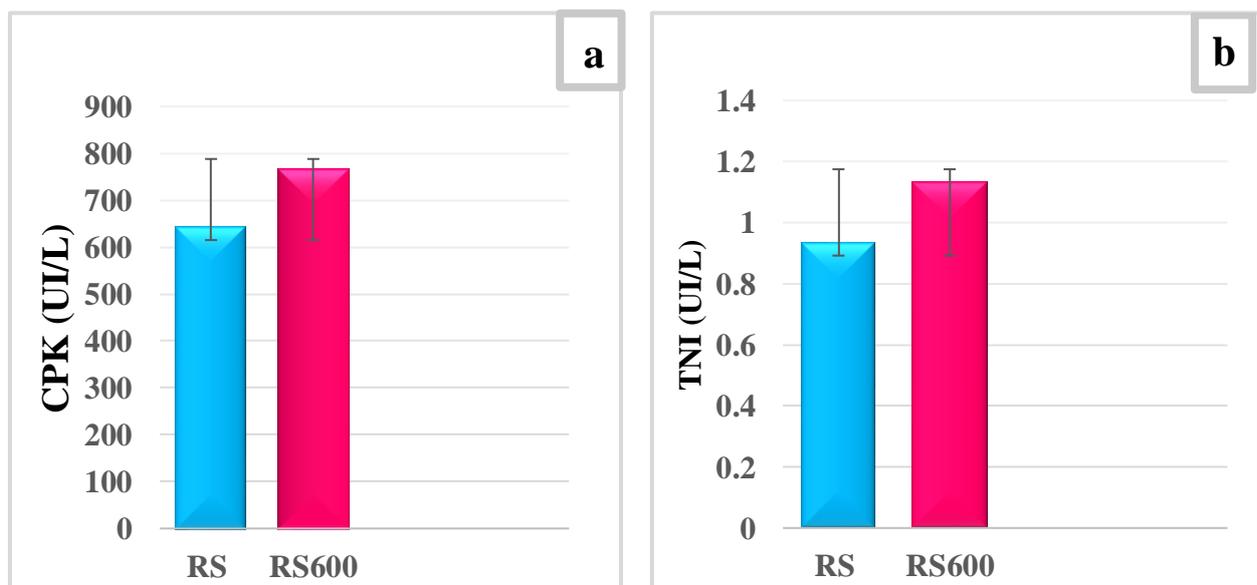


Figure 22. Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (600mg/kg d'aliments) sur CPK (figure 22a) et TnI (figure 22b) chez les lapins. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités, a : comparaison avec le lot RS).

Le fait est que les résultats que nous avons obtenu chez le lot RSE₆₀₀ soient non significatifs par rapport au lot RS, ceci nous laisse supposer que cette dose est une dose physiologique et surtout sans effet sur le tissu cardiaque; d'ailleurs nos résultats concordent avec ceux d'une étude réalisée par **Barakat et El-Sayeden (2016)**, et qui a porté sur la réalisation d'une expérimentation animale sur soixante-douze rats albinos mâles adultes de souche Sprague Dawely, pesant entre 158 et 198 g, et répartis en 6 groupes, dont deux seulement seront cités dans la présente discussion vue leurs intérêt: un groupe témoin et un groupe traités avec 200 mg de Vit E/kg de poids corporel/dose quotidienne, et ceci pendant 3 semaines. Les résultats des paramètres cardiaques du deuxième groupe ont montré des changements non significatifs des taux de la CPK et de la TnI par rapport au groupe témoin. Ces auteurs ont conclu que l'effet de cette dose d' α -T n'a eu aucun effet sur le tissu cardiaque.

En 2019, Ibrahim et al., ont réalisé une étude sur des souris mâles Balb / c pesant 20 à 30 g et âgées de 5 semaines, ces souris ont reçu un régime alimentaire standard et de l'eau *ad libitum*; elles ont été divisées en quatre groupes (8 souris chacun), deux groupes seulement seront cités vue leur intérêt dans notre étude: un groupe témoin et un groupe traité avec 100mg de vit E/kg de poids corporel/jour, et ceci pendant 30 jours. Les résultats des paramètres cardiaques du groupe qui a été traité avec 100 mg de vit E ont montré des changements non significatifs des taux de la CPK et de la TnI par rapport au groupe témoin. A l'issue de cette étude, la conclusion émise par ces auteurs est que la dose 100 mg de vit E /kg de poids corporel n'a aucun effet potentiel sur la fonction cardiaque, il est à préciser que nos résultats sont en accords avec ceux de la présente étude, à savoir que la dose 600 mg/kg d'aliment n'a pas eu d'effets sur le tissu cardiaque.

Nous discuterons nos résultats également avec une étude utilisant un composé (Pisum sativum) qui est antioxydant autre que l' α -T, vue le peu de travaux portant sur la vit E à des doses physiologiques; cette étude réalisée par **Abdelghffar et al., (2021)**, et qui a porté sur quarante-neuf souris albinos mâles « Mus musculus », pesant entre 25 et 30 g, et qui avaient libre accès à la nourriture et à l'eau, six lots ont été étudiés, dont trois groupes seulement seront cités vue leur intérêt dans notre étude: un groupe témoin, les deux autres groupes ont été traités respectivement par voie orale avec deux doses croissantes de l'extrait de peau de pois « Pisum sativum » 250 et 500 mg/kg de poids corporel (notons que cet extrait est un antioxydant), et ceci pendant trois semaines. Les résultats de cette recherche ont montré que pour les groupes supplémentés avec 250 et 500 mg d'extrait de peau de pois/kg de poids corporel, les concentrations moyennes de la CPK et la TnI n'ont pas variées de manière significative à celle du témoin; en finalité les auteurs ont conclu que la supplémentation en extrait de peau de pois

à des doses de 250 et 500 mg n'a pas eu d'effet sur la fonction cardiaque, vue que ces doses doivent correspondre à des doses physiologiques.

I.2. Etude de la supplémentation de 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment par rapport au lot témoin

Notre étude comprenait une partie qui visait à déterminer l'effet de la supplémentation d'un régime standard en doses croissantes d' α -T sur deux paramètres cardiaques, à savoir le taux en CPK et en TnI. Les valeurs obtenus lors du dosage de la CPK et de la TnI du lot RSE₁₂₀₀ sont respectivement 1481 ± 119.02 et 30.86 ± 4.01 ; pour le lot RSE₁₈₀₀ sont respectivement 1814.33 ± 139.53 et 37.4 ± 1.80 par rapport au lot RS dont son CPK est $640,33 \pm 33$ et son TnI est $0,93 \pm 0,25$. Qui montre une augmentation très significative ($p < 0.01$) de CPK et une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) de TnI du lot RSE₁₂₀₀ (figure 23a) et une augmentation très significative ($p < 0.01$) de CPK et une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) de TnI du lot RSE₁₈₀₀ (figure 23b) ; nous supposons que les doses élevées d' α -T utilisées lors de notre étude ont provoqués un stress oxydatif. Ce dernier, peut déclencher des facteurs spécifiques responsables de dommages oxydatifs dans la cellule : surexpression de gènes oncogènes, génération de composés mutagènes, promotion de l'activité athérogène, apparition de plaques séniles ou inflammation (Pisoschi et Pop, 2015). En pathologie cardiovasculaire, il peut apparaître un déséquilibre provoqué essentiellement par une production exagérée d'ERO à laquelle peut s'associer un déficit des défenses antioxydantes (Baudin, 2006).

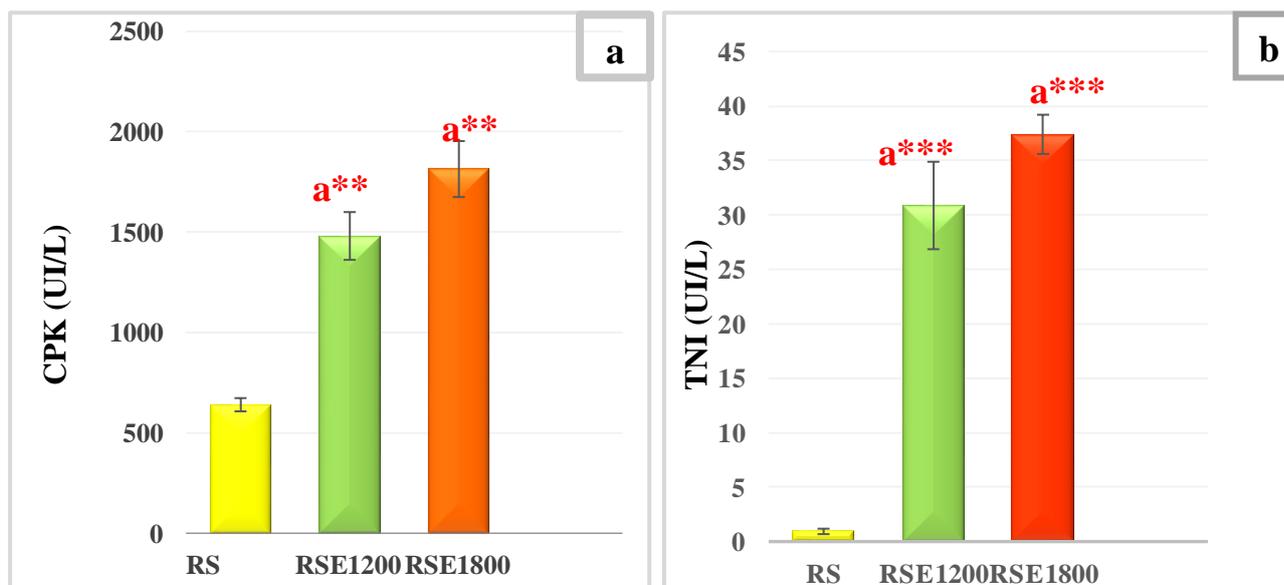


Figure 23. Effets de la supplémentation d'un régime standard en α -T (1200 et 1800mg/kg d'aliments) sur CPK (figure 23a) et TnI (figure 23b) chez les lapins. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités, a : comparaison avec le lot RS).

Avant de discuter de l'effet pro-oxydant de l' α -T *in vivo*, il serait intéressant de retracer quelques-unes des nombreuses études effectuées *in vitro*, nous en citons les plus importantes notamment celles réalisées par **Bowry et Stocker** :

Plusieurs études menées par **Bowry** se sont succédées pour montrer l'effet pro-oxydant de la vit E *in vitro*, il a d'ailleurs cité et en collaboration avec d'autres auteurs (**Ingold et Stocker**) dans sa première étude réalisée en 1992, sur les LDL isolées de plasma humain enrichies en α -T et soumises à l'azo : un initiateur d'hydroperoxydes : le 2,2-azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) et le 2,2-azobis-(2,4 diméthylisovaléronitrile) (AMVN), que l' α -T avait la capacité d'agir comme prooxydant et d'augmenter la peroxydation des lipides *in vitro*. C'est en 1993, qu'une autre étude menée par **Bowry et Stocker** toujours *in vitro* et sur le même type d'échantillon. Ils viennent définir la théorie de « l' α -T médiateur de peroxydation », il est vrai que dans cette étude, ces auteurs montrent clairement que l' α -T donne le radical tocophéroxyl et que si ce dernier n'était pas réduit il devenait pro-oxydant.

Enfin, **Bowry et al. (1995)** ont montré que pour prévenir l'oxydation des lipoprotéines *in vivo*, il est essentiel que l'ensemble des α -TO \cdot soient réduits par des composants qui les rendront incapables de poursuivre la chaîne de peroxydation. Dans des conditions normales ceci semblerait être réalisé par deux antioxydants endogènes, c'est-à-dire la vitamine C (dans le plasma) et CoQ10H₂ (dans LDL), qui empêchent l'oxydation de LDL et ceci par deux mécanismes tout à fait distincts.

Les quelques études réalisées *in vivo*, viennent confirmer les résultats obtenus lors des nombreuses études faites *in vitro* :

En 2009, Pinelli et al., ont consacré une étude sur l'Acide 5-aminolévulinique (5-AAL : utilisé dans la prévention des maladies cardiovasculaires) mais qui a la capacité de provoquer des lésions cardiaques et un stress oxydatif à dose élevée. Pour cela deux groupes de six lapins ont été constitués, un groupe témoin et un second groupe traité par voie sous-cutanée avec 50 mg de 5-AAL /kg de poids corporel puis sacrifié 3 h après; les résultats obtenus ont montré une augmentation très significative des taux plasmatiques de CPK, de TnI et de MDA du groupe traité par rapport à celui du témoin ; il est à noter que selon **Valenzuela (1991)** les niveaux élevés de MDA s'expliquent par le fait que le 5-AAL est métabolisé en produits d'oxydation et que selon **Weiss et al., (2003)** le 5-AAL pouvait induire une augmentation de la peroxydation lipidique. À l'issue de cette étude la conclusion émise par ces auteurs était que la dose de 50mg du 5-ALA/kg de poids corporel favorisait des lésions myocardiques et provoquait un stress oxydatif. Notons que nos résultats corroborent avec ceux de cette étude si

ce n'est que la seule différence et que dans notre cas c'est l' α -T à doses élevées qui a provoqué des lésions myocardiques et un stress oxydatif.

Kiron et al. (2004), ayant travaillé sur les érythrocytes ont obtenu une augmentation significative en LPO. Effectivement, lors de la supplémentation d'un régime équilibré avec 1000 mg d' α -T/ Kg et administré à des truites arc en ciel « *Oncorhynchus mykiss* » ; c'est auteurs ont montré que la forte dose en α -T (1000 mg/ Kg d'aliment) n'a pas servi en tant qu'antioxydant, mais comme pro-oxydant lors d'un stress oxydatif modéré.

Encore une par manque de références portant sur la vitamine E, nous citerons également une étude très intéressante réalisée sur un autre modèle animal différent du nôtre et utilisant un inducteur de stress autre que la vit E :

En 2016, Chen et al ont évalué le système redox dans les tissus de porcs en finition hybrides par supplémentation à forte dose de daidzéine (640 mg/kg de poids corporel). Ils ont réparti quarante-huit (48) porcs pesant d'une moyenne de 57 kg en deux groupes ; un groupe témoin qui ont été nourris avec un régime de base et un groupe traités par un régime de base additionné par 640 mg de daidzéine /kg de poids corporel. Les résultats de cette étude montre une augmentation de la teneur en MDA dans le plasma ; cette expérience suggère que la supplémentation alimentaire des porcs en finition avec de la daidzéine à une dose élevée exerce un effet pro-oxydant dans le plasma.

II. Effets de la supplémentation en différentes doses d' α -T sur l'histologie du tissu cardiaque

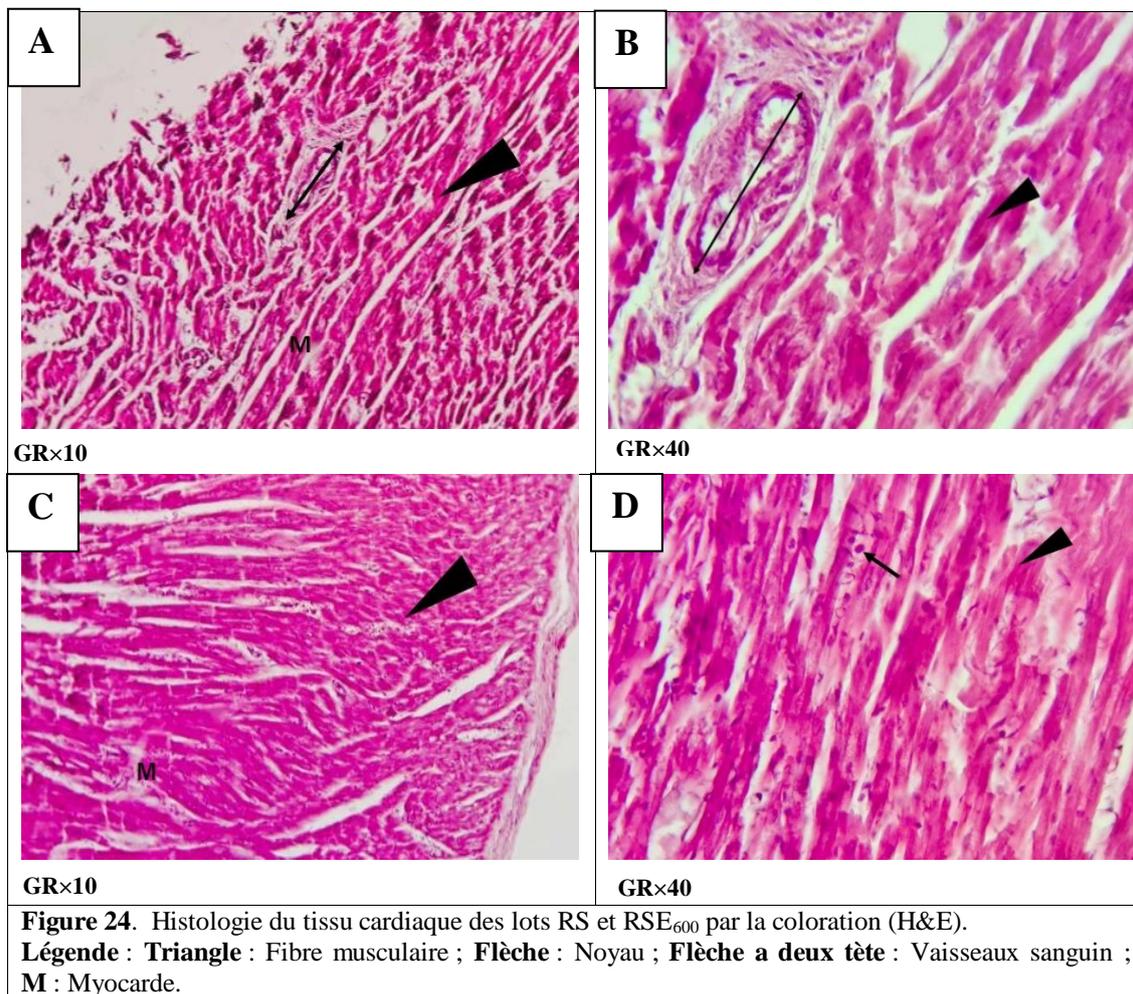
L'étude histologique (H&E, trichrome de Masson et l'immunohistochimie) réalisée lors de notre mémoire sera traitée sous deux volets, d'abord un premier volet qui va concerner les coupes histologiques du lot RSE₆₀₀ du fait que les résultats ont montrés l'absence de stress oxydatif, puis un second volet portant sur les lots RSE₁₂₀₀ et RSE₁₈₀₀ vue la présence d'un stress oxydatif modéré.

II.1. Lot RSE₆₀₀

II.1.1. Etude histologique par la coloration H&E du lot RSE₆₀₀ par rapport au lot RS

Les coupes histologiques obtenues par la technique H&E, ont montré une architecture globale du lot RSE₆₀₀ (figure 24 C et D) identique à celle du lot RS (figure 24 A et B), nous

avons observé une disposition normale des noyaux de myocytes, une structure normale de myofibrilles, ainsi qu'une continuité des myofibrilles adjacentes.



Les observations des coupes histologiques des lots RS₆₀₀, nous permettent d'avancer que l' α -T administrée à 600 mg/Kg d'aliments n'a exercé aucun effet au niveau du tissu cardiaque, si ce n'est un effet antioxydant non apparent. Selon **Ferry et al., (2012)**, l' α -T est l'un des antioxydants les plus puissants, il protège les membranes cellulaires des effets de la peroxydation lipidique. Il interrompt le phénomène de peroxydation lipidique en captant les radicaux peroxydes et en prévenant la propagation du processus de la lipoperoxydation. Ainsi, l'activité antioxydante de l' α -T a la capacité d'éviter l'apparition des maladies chroniques, particulièrement celles causées par un composant du stress oxydatif, comme les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, le cancer et les maladies neurodégénératives (**Stampfer et al., 1993 ; Nwanguma et al., 1998**). De plus il a un rôle dans la relaxation des vaisseaux sanguins et il empêche l'agrégation des plaquettes (**Verhagen et al., 2006**).

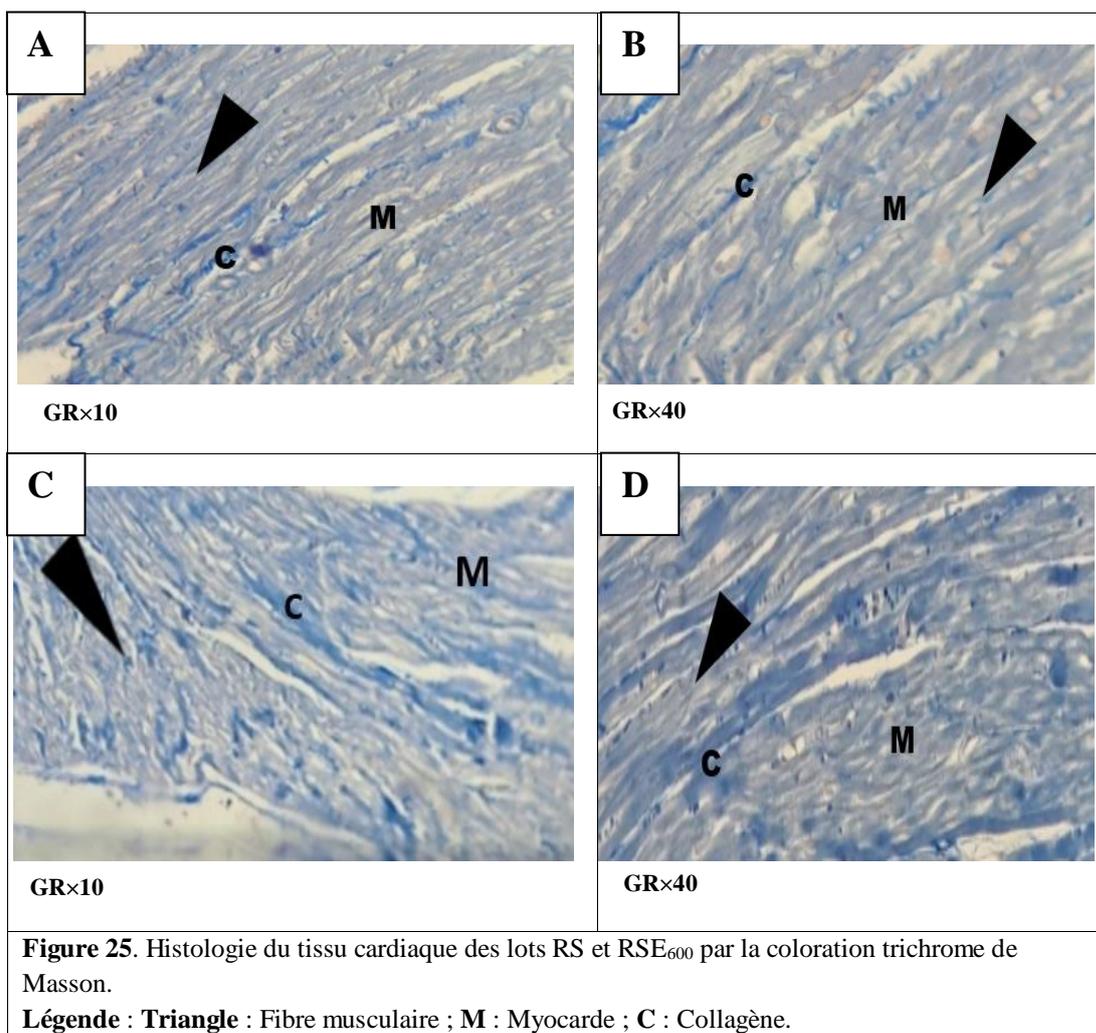
En 2011, Al-Attar a montré l'effet protecteur de l' α -T sur les dommages hépatiques induits par l'exposition de souris albinos mâle à un mélange de métaux lourds et ceci pendant 7 semaines. Sur les quatre groupes constitués, nous nous intéresserons à deux seulement : un groupe témoin et un groupe traité avec 34 mg d' α -T/kg de poids corporel. L'analyse histologique utilisant la coloration H&E réalisée lors de cette étude a révélée que pour le groupe traité par l' α -T, aucunes altérations histologiques n'est décelable, il est tout à fait identique au témoin ; ces résultats montrent encore une fois que l' α -T en absence de stress oxydatif et à des doses physiologiques n'exerce aucun effet sur l'ensemble des tissus.

En 2013, Abbas et al., ont répartis 48 rats mâles Sprague-Dawley, pesant entre 170 et 200 g, en six groupes, nous nous intéresserons à deux seulement : un groupe témoin et un groupe traité avec 100 mg d' α -T/kg de poids corporel ; l'examen histologique par coloration H&E n'a révélé aucune différence entre le groupe traité par l' α -T et le groupe témoin, suggérant que l' α -T, en absence de stress oxydatif, n'a pas d'effet apparent sur la structure du tissu cardiaque. Ces résultats indiquent que, dans des conditions physiologiques normales, la supplémentation en vit E n'entraîne pas de modifications histologiques détectables.

II.1.2. Etude histologique par la technique Trichrome de Masson du lot RSE₆₀₀ par rapport au lot RS

Lors d'une étude histologique approfondie, il est intéressant de compléter la coloration standard à l'hématoxyline et à l'éosine, au Trichrome de Masson et à l'immunohistochimie. Afin de détecter de manière optimale les lésions auxquelles le tissu cardiaque est soumis ; il est également nécessaire de préciser que la coloration trichrome de Masson permet de mieux visualiser les zones de fibrose (**Ouyang et al., 2010**).

L'examen histologique réalisée par la technique Trichrome de Masson à montrer une similitude du point de vue structural entre le lot RSE₆₀₀ (figure 25 C et D) et le lot RS (figure 25 A et B), nous avons observés une structure a aspect normal contenant des fibres striées présentant des petits noyaux et absence de fibrose ; notre observation permet de noté que cette dose de vit E n'a pas eu d'effet sur l'architecture du tissu cardiaque par rapport à celle du témoin; il est vrai que quelques études ont montrées qu'à des doses modérées de vit E et en absence de stress oxydatif, aucun changement n'est observable au niveau tissulaire par rapport au témoin (**Abdel-Hamid et al., 2015**), et que de nombreuses études ont énoncées qu'en présence de stress oxydatif et aux mêmes doses de vit E, cette dernière joue un rôle protecteur antioxydant (**Rouaki et Kanane, 2019**).



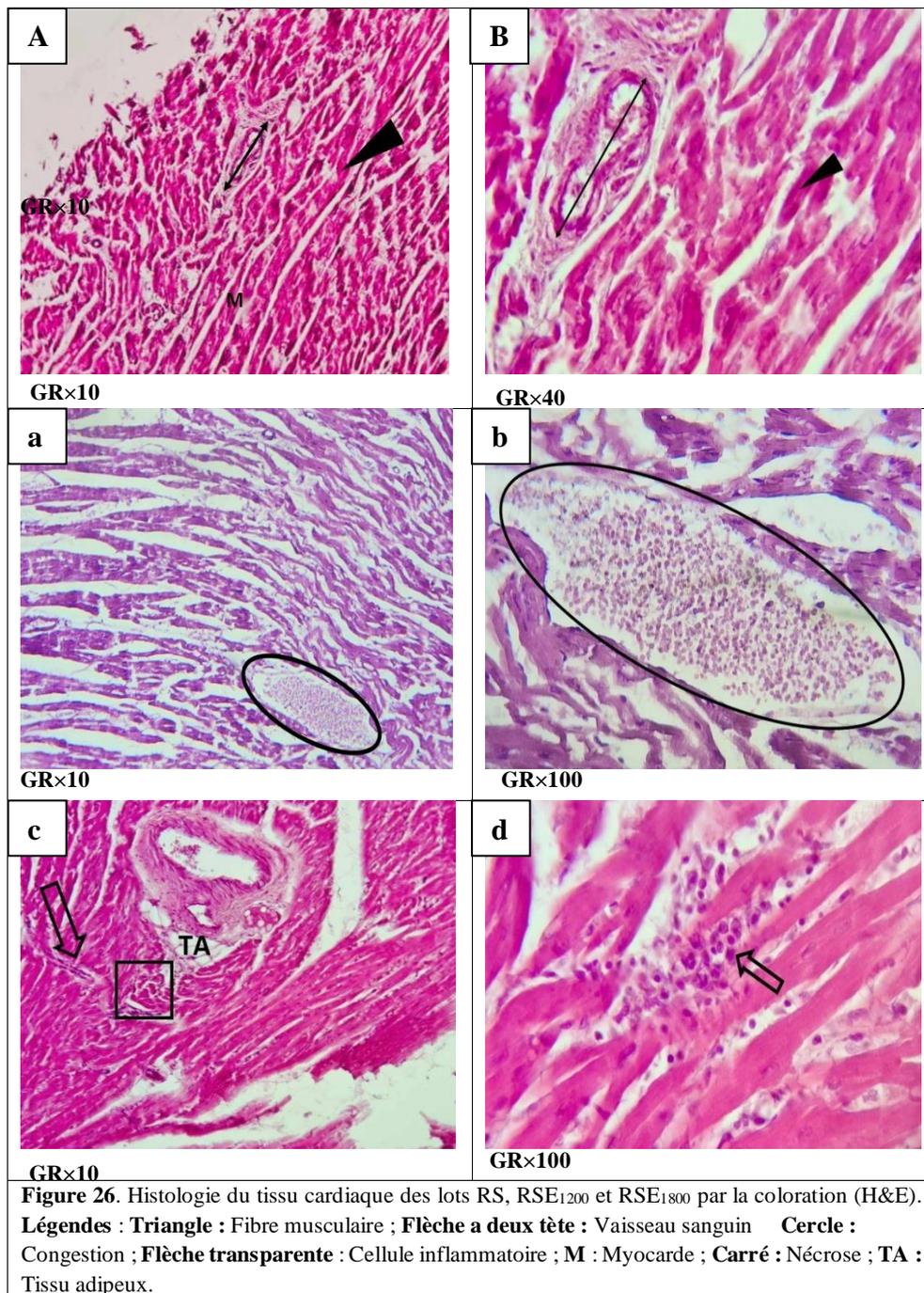
Malgré une recherche approfondie, aucune étude spécifique n'a été trouvée concernant l'effet de la supplémentation en vit E sur le tissu cardiaque observé par coloration au trichrome de Masson. Par conséquent, nous avons élargi notre analyse à des études portant sur l'impact de la vit E sur d'autres organes.

En 2015, Abdel-Hamid *et al.*, ont réalisé une étude pour évaluer l'effet de la supplémentation en vit E sur la néphrotoxicité induite par l'aflatoxine B1, des rats Sprague-Dawley mâles pesant 270 à 285g, sont répartis en six groupes ; notons que nous citerons uniquement deux groupes des six groupes constitués vue leur intérêt dans notre étude; un premier groupe témoin et un second groupe qui a reçue 100 mg α -T/kg de poids corporel/jour et ceci sur une période de 25 jours. Les résultats de l'étude histologique par la technique au Trichrome de Masson chez le groupe traitée avec l' α -T a montré qu'il n'y a eu aucun changement au niveau du tissu rénal, en finalité les auteurs ont conclu qu'à cette dose l' α -T n'a eu aucun effet sur l'architecture du tissu rénal et aucune fibrose n'a été observée.

II.2. Les lots RSE₁₂₀₀ et RSE₁₈₀₀

II.2.1. Etude histologique par la coloration H&E des lots RSE₁₂₀₀ et RSE₁₈₀₀ par rapport au lot RS

Les coupes histologiques obtenues par la coloration H&E ont révélé une architecture globale différente des lots RSE₁₂₀₀ (figure 28 a et b) et RSE₁₈₀₀ (figure 26 c et d) par rapport au lot RS (figure 26 A et B), nous avons observé une désorganisation du tissu cardiaque et des congestions dans le lot RSE₁₂₀₀, de plus des nécroses et une infiltration lymphocytaire, indiquant une inflammation, est présentent dans le lot RSE₁₈₀₀.



Les observations des coupes histologiques des lots RSE₁₂₀₀ et RSE₁₈₀₀, nous permettent d'avancer que l' α -T administré à 1200, 1800 mg/Kg d'aliments a induit un stress oxydatif et a exercé un effet pro-oxydant au niveau du tissu cardiaque. **En 2008, Defraigne et Pincemail**, ont montré que les antioxydants comme la vit C ou E se transforment eux-mêmes en RL lors de la neutralisation de certains dérivés toxiques de l'oxygène. Ainsi, la vit 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 tocophéryl. De même, **en 2012, Ferry et al.**, ont expliqué que si les niveaux de vit E dans les membranes sont faibles par rapport aux lipides et aux RL présents, seul un renouvellement rapide et constant de cette vit permettra son efficacité antioxydante. À défaut de cela, l'accumulation de ses formes oxydées participera probablement à un rôle pro-oxydant. Ainsi, l'hypothèse suggérée est que, tout comme une carence, un excès de supplémentation en vit E sans augmentation proportionnelle des systèmes de renouvellement pourrait basculer son activité antioxydante à pro-oxydante.

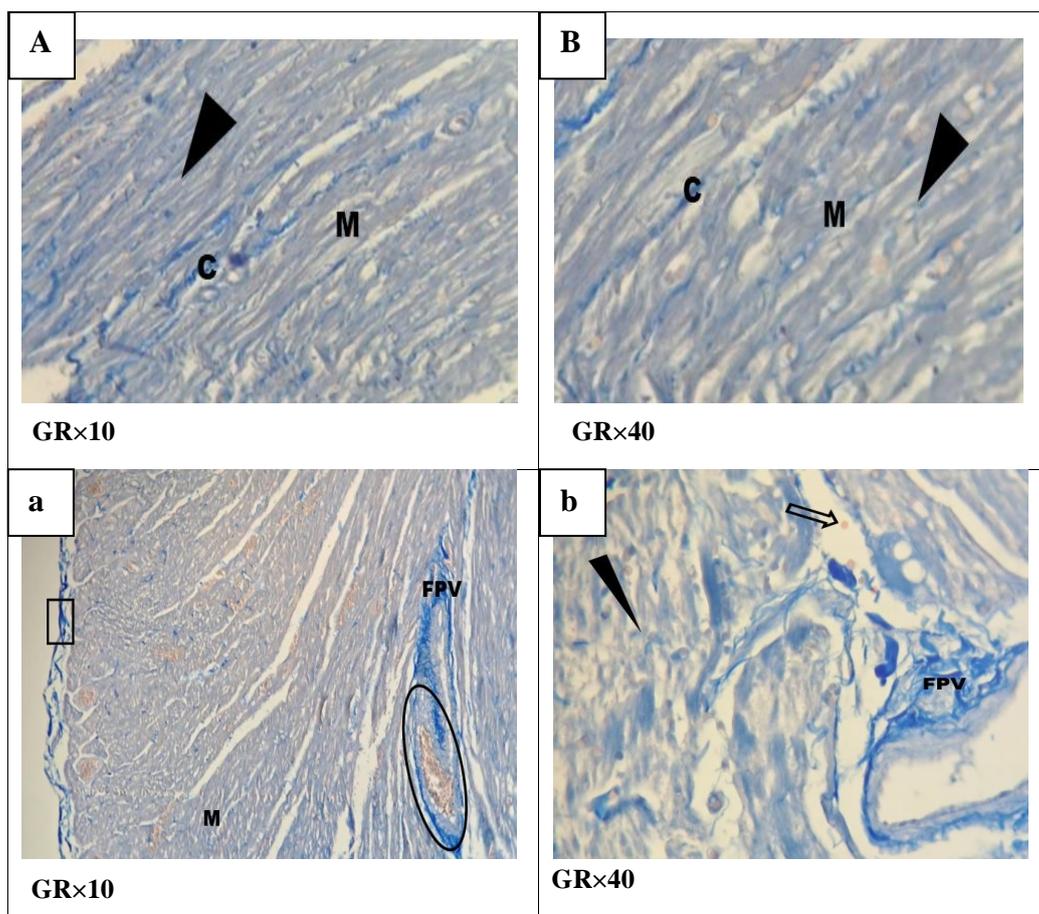
Une étude très intéressante réalisée en 2011, par **Nascimento et al.**, a porté sur l'effet d'une dose pharmacologique d' α -T sur le tissu cardiaque de rats Wistar adultes. Deux groupes ont été constitués, un groupe témoin et un autre qui recevait par gavage 250 mg d' α -T /kg de poids de rat/jour pour des rats dont le poids variait de 350 à 400 g, soit environ une quantité d' α -T variant de 87.5 à 100 mg/rat/jour et ceci pendant 7 semaines. Les coupes histologiques ont montré aucun changement pathologique chez le lot témoin par contre pour le lot supplémenté en α -T, des dommages cellulaires importants sont apparents et montrant une désorganisation morphologique des myocytes. Cette recherche souligne l'importance d'une surveillance lors de l'utilisation de suppléments d' α -T, en particulier à des niveaux pharmacologiques, afin de prévenir d'éventuels effets cardiotoxiques.

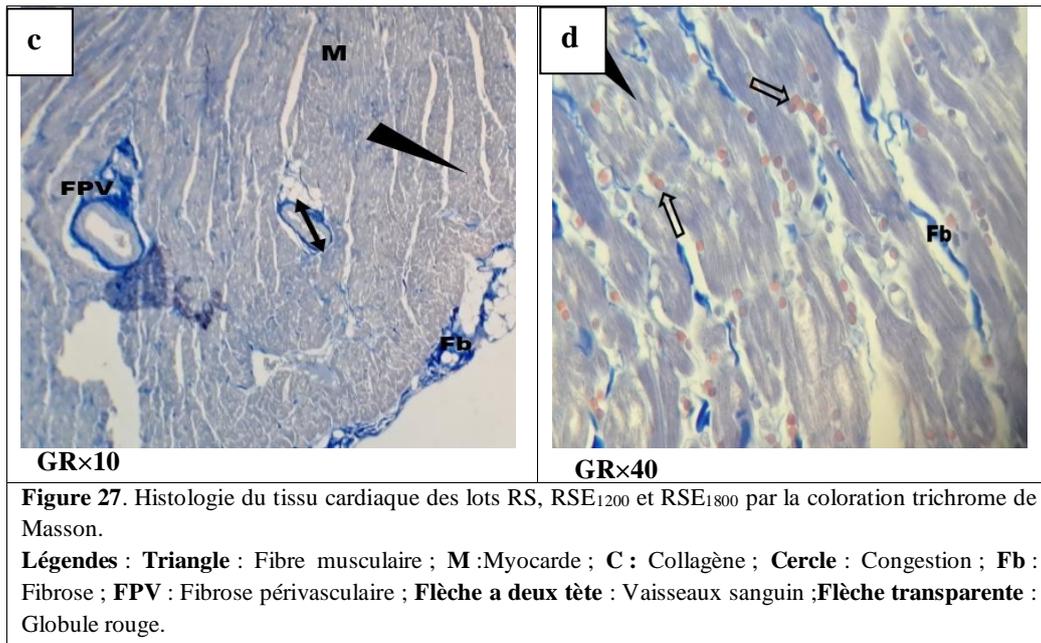
Nos observations concordent également avec ceux de **Rouaki et al.**, **en 2013**, dans leur étude investiguant l'effet de l'administration de 1200 mg d' α -T/kg de régime contenant 5% d'huile oxydée, sur le tissu cardiaque de rat wistar en plein croissance et relevant des changements morphologiques dans le tissu cardiaque plus sévères (nécrose), que ceux causées par l'administration de l'huile oxydée seule, ce qui confirme que l' α -T à augmenter le stress oxydatif et ces observations concordent aux notes.

En 2019, El-Hak *et al.*, ont évalué les effets d'une supplémentation en vit E sur des rats albinos mâles pendant 30 jours, en administrant des doses quotidiennes de 1000 et 2000 mg/kg de poids corporel par voie orale. Bien qu'aucune mortalité n'ait été enregistrée, l'étude histologique a révélée des altérations rénale et hépatique importantes aux doses étudiées. Les auteurs ont conclu que l'administration de fortes doses de suppléments de vit E sur une durée de 30 jours a induit une hépatotoxicité ainsi qu'une néphrotoxicité.

II.2.2. Etude histologique par la technique Trichrome de Masson des lots RSE₁₂₀₀ et RSE₁₈₀₀ par rapport au lot RS

L'examen histologique utilisant la technique du Trichrome de Masson à révéler une désorganisation marquée de la structure myocardique chez les lots RSE₁₂₀₀ (figure 27 a et b) et RSE₁₈₀₀ (figure 27 c et d), contrairement au lot RS (figure 27 A et B) qui présente une architecture saine, on a également observé des congestions vasculaires entourées de fibrose, soulignant des altérations du tissu cardiaque.



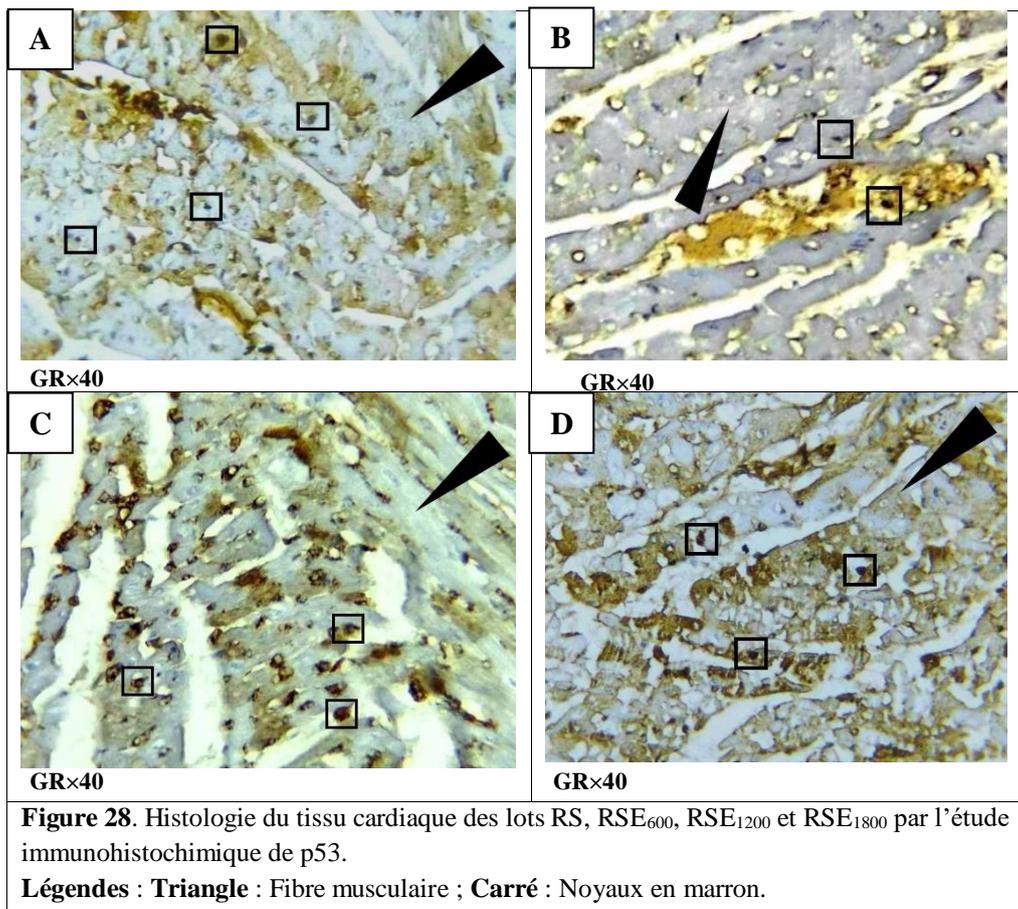


D'ailleurs en 2017 Samuel et al., ont relatés dans leur article, que le stress oxydatif dans le tissu cardiaque provoque des congestions, augmentant la pression vasculaire et réduisant l'oxygénation des tissus ; en réponse, le tissu libère des signaux chimiques qui recrutent des cellules inflammatoires, comme les macrophages ; ces derniers infiltreront le tissu congestionné et libèrent des cytokines et des facteurs de croissance, tels que le TGF- β , qui stimulent les fibroblastes à produire du collagène, entraînant une fibrose, y compris une fibrose périvasculaire autour des vaisseaux sanguins. Cette fibrose remplace progressivement le tissu sain et perturbe l'architecture tissulaire, conduisant à une altération de la fonction cardiaque.

Une étude menée par Varatharajan et al., en 2013, a été réalisée sur des rats Sprague-Dawley mâles pesant 270 à 330g, répartis en 3 groupes et ceci afin d'évaluer les effets de l'extrait de feuilles de palme riche en catéchines (puissant antioxydant) ; un premier groupe témoin, un second groupe dont ils ont induit un diabète, et enfin un dernier groupe traité de la même manière que le second mais à qui une dose de 1000 mg d'extrait de feuilles de palme /kg poids corporel a été administrée et ceci sur une période de 12 semaines. Les résultats de l'étude histologique par la technique au Trichrome de Masson chez le dernier groupe ont montré de nombreuses fibroses, des occlusions capillaires, la prolifération des fibroblastes, des dilatations et des atrophies tubulaires par rapport au second groupe. Ces auteurs ont conclu que l'effet d'un antioxydant comme l'extrait de feuilles de Palme peut basculer en un effet pro-oxydant à une certaine dose.

II.3. Etude histologique par la technique immunohistochimie des lots RSE₆₀₀, RSE₁₂₀₀ et RSE₁₈₀₀ par rapport au lot RS

Concernant l'étude immunohistochimique nous avons examiné l'expression cardiaque du bio-marqueur p53, un indicateur d'apoptose. Nous avons observé l'apparition de noyaux en marron (figure 28 A, B, C et D) indiquant la négativité des résultats immunohistochimiques, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'apoptose.



Selon **Mettal *al.*, en 2014**, montré que dans les lésions tissulaires chroniques initiées par un stress oxydatif excessif, les macrophages sont recrutés pour combattre l'inflammation, ces dernier subissent ensuite un changement phénotypique leur permettant de promouvoir la réparation du tissu endommagé. Cependant **en 2008, Wynn** à montrer qu'à la suite du stress oxydatif initial, les macrophages orchestrent de manière séquentielle l'inflammation puis l'activation des myofibroblastes impliqués dans la régénération fibrotique réparatrice du tissu lésé, sans que la protéine p53 n'intervienne directement.

Conclusion

Dans la présente étude, notre travail a consisté à évaluer l'effet de la supplémentation croissante de l' α -T dans un régime standard, chez le lapin et sur une période de 8 semaines. Les analyses réalisées pour la détermination de l'activité de la CPK et la teneur de la TnI, ainsi que l'étude histologique (H&E, Trichrome de Masson et Immunohistochimie) du tissu cardiaque de lapin sont exposés comme suit :

- **Sur le plan sérique** : les résultats des analyses de la CPK et de la TnI du lot RS₆₀₀, ont montré une augmentation non significative de ces paramètres par rapport au lot non traité (RS). La supplémentation avec 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment quant à eux ont induit une augmentation très significative du taux sérique de la CPK ($p < 0,01$), accompagnée d'une augmentation hautement significative de teneur en TnI ($p < 0,001$) par rapport au témoin, ces résultats indiquent des dommages du muscle cardiaque due aux doses élevées en α -T.
- **Sur le plan histologique** : l'observation des coupes histologiques du lot RS et le lot RSE₆₀₀ a montré une disposition normale des noyaux de myocytes, une structure organisées de myofibrilles, ainsi qu'une continuité des myofibrilles adjacentes. Cependant, pour les lots RSE₁₂₀₀ et RSE₁₈₀₀ nous avons observé une infiltration lymphocytaire, des congestions, une perte de l'architecture des cardiomyocytes ainsi que la présence de nécroses ; l'ensemble de ces observations indiquent clairement que des doses élevés d' α -T ont agis en tant qu'oxydant, d'ailleurs **Bowry et Stocker en 1993** l'ont nommé : « tocophérol médiateur de peroxydation ».

A l'issue de ce travail plusieurs orientations d'études peuvent être envisagées et qui pourront faire l'objet de travaux ultérieurs :

- doser l' α -T au niveau cardiaque par chromatographie en phase liquide à haut performance,
- voire l'effet d'une telle supplémentation sur des paramètres antioxydant qui n'ont pas été dosé dans cette étude comme la SOD, la CAT et la GPx,

- faire le dosage de marqueurs de peroxydation comme le peroxyde d'hydrogène, le glutathion, le Malondialdéhyde ...
- déterminer la dose précise ou l'activité de la vitamine E bascule de l'effet antioxydant à l'effet pro-oxydant,
- prolonger la durée du traitement afin de voir les changements en immunohistochimie.

Références bibliographiques

- **A**bbas, A. M., & Sakr, H. F. (2013). Simvastatin and vitamin E effects on cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed on high fat diet. *Journal of physiology and biochemistry*, 69, 737-750.
- Abdelghffar, EA, Obaid, WA, Elgamal, AM, Daoud, R., Sobeh, M. et El Raey, MA (2021). L'extrait de peau de pois (*Pisum sativum*) atténue les lésions oxydatives du myocarde induites par la DOX. *Biomédecine & Pharmacothérapie* , 143 , 112120.
- Abdel-Hamid, A. A., & Firgany, A. E. D. L. (2015). Vitamin E supplementation ameliorates aflatoxin B1-induced nephrotoxicity in rats. *Acta histochemica*, 117(8), 767-779.
- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., Sak, K., ... & Sethi, G. (2019). Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules*, 9(11), 735.
- Al-Attar, A. M. (2011). Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi journal of biological sciences*, 18(4), 395-401.
- **B**arakat, H., & El-Sayed, M. (2016). Vitamins C and E as Effective Protectors against Potassium Bromate-induced Cardiac Injury in Rats. *Journal Of Applied Life Sciences International*, 7(3), 1-8.
- Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt cardio*, 2(1), 43-52.
- Berger, M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20(1), 48-53.

- Bowry, V. W., & Stocker, R. (1993). Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *Journal Of The American Chemical Society*, 115(14), 6029-6044.
- Bowry, V. W., Ingold, K. U., & Stocker, R. (1992). Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a pro-oxidant. *Biochemical Journal*, 288(2), 341-344.
- Bowry, V. W., Mohr, D., Cleary, J., & Stocker, R. (1995). Prevention of Tocopherol-mediated Peroxidation in Ubiquinol-10-free Human Low-Density Lipoprotein. *Journal Of Biological Chemistry*, 270(11), 5756-5763.
- **C**hen, W., Ma, X., Lin, Y., Xiong, Y., Zheng, C., Hu, Y., Yu, D., & Jiang, Z. (2016). Dietary supplementation with a high dose of daidzein enhances the antioxidant capacity in swine muscle but exerts pro-oxidant function in liver and fat tissues. *Journal Of Animal Science And Biotechnology/Journal Of Animal Science And Biotechnology*, 7, 1-11.
- Cillard, J., & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13(1), 24-29.
- Cuvelier, C., Dotreppe, O., & Istasse, L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét*, 147, 315-324.
- **D**efraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63.
- Desmier, T. (2016). Les antioxydants de nos jours: définition et applications (Doctoral dissertation).
- 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.

- **E**bashi, S., & Kodama, A. (1965). A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *The Journal of Biochemistry*, 58(1), 107-108.
- El-Hak, H. N., ELaraby, E. E., Hassan, A. K., & Abbas, O. A. (2019). Study of the toxic effect and safety of vitamin E supplement in male albino rats after 30 days of repeated treatment. *Heliyon*, 5(10), e02645.
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- **F**avier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Ferry, M., Mischlich, D., Alix, E., Brocker, P., Constans, T., Lesourd, B., Pfitzenmeyer, P., Vellas B. (2012). *Nutrition de la personne âgée*. Elsevier Masson. 368.
- **G**amna, F., & Spriano, S. (2021). Vitamin E : A Review of Its Application and Methods of Detection When Combined with Implant Biomaterials. *Materials*, 14(13), 3691.
- **H**aleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., & Chapelle, J.-P. (October 2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62 (10), 628-38.
- **I**brahim, M. A., Bakhaat, G. A., Tammam, H. G., Mohamed, R. M., & El-Naggar, S. A. (2019). Cardioprotective effect of green tea extract and vitamin E on Cisplatin-induced cardiotoxicity in mice : Toxicological, histological and immunohistochemical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 113, 108731.

- **K**iron, 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.
- **L**andrier, J. (2011). Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *Oilseeds And Fats, Crops And Lipids/OCL. Oilseeds & Fats Crops And Lipids*, 18(2), 83-87.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 3(1), 21-33.
- Leger, C. (2000). La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardio-vasculaire, biodisponibilité. *Oilseeds And Fats, Crops And Lipids/OCL. Oilseeds & Fats Crops And Lipids*, 7(3), 258-265.
- Leverage, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.
- **M**ittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126-1167.
- Miyazawa, T., Burdeos, G. C., Itaya, M., Nakagawa, K., & Miyazawa, T. (2019). Vitamin E: regulatory redox interactions. *IUBMB life*, 71(4), 430-441.
- Mukai, K., Sawada, K., Kohno, Y., & Terao, J. (1993). Kinetic study of the prooxidant effect of tocopherol. Hydrogen abstraction from lipid hydroperoxides by tocopheroxyls in solution. *Lipids*, 28(8), 747-752.
- **N**ascimento, M. C. M., Matsubara, B. B., Matsubara, L. S., Correa, C. R., Pereira, E. J., Moreira, P. L., ... & Ferreira, A. L. A. (2011). Pharmacological dose of α -tocopherol

induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. *Human & experimental toxicology*, 30(10), 1540-1548.

- Nwanguma, B.C, Achebe, A.C., Ezeanyika, L.U. and Eze, LC. (1998) . Toxicity of oxidized fats II: tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized oil det. *Food Chem. Toxicol.* 3: 413-416.
- **O**liver, I. T. (1955). A spectrophotometric method for the determination of creative phosphokinase and myokinase. *Biochemical Journal. Cellular Aspects*, 61(1), 116-122.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants : Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.
- Ouyang, J., Guzman, M., Desoto-Lapaix, F., Pincus, M. R., &Wieczorek, R. (2010). Utility of desmin and a Masson's trichrome method to detect early acute myocardial infarction in autopsy tissues. *International journal of clinical and experimental pathology*, 3(1), 98.
- **P**inelli, A., Trivulzio, S., Brenna, S., & Rossoni, G. (2009). Plasma Cardiac Necrosis Markers C-Troponin I and Creatine Kinase, Associated with Increased Malondialdehyde Levels, Induced in Rabbits by Means of 5-Aminolevulinic Acid Injection. *Pharmacology*, 84(5), 314-321.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- **Q**uevauvilliers, J., Somogyi, A., & Fingerhut, A. (2009). *Dictionnaire Médical*.(6e éd.) Issy-les-Moulineaux Cedex.
- **R**ahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T., & Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. *Advances In Bioscience And Biotechnology*, 03(07), 997-1019.

- Rietjens, I. M., Boersma, M. G., De Haan, L., Spenkeliink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., Van Zanden, J. J., Van Der Woude, H., Alink, G. M., & 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.
- Rizvi, S., Syed, T., Faizal, A., Absar, A., Shania, A., et Farzana, M. (2014). The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 14(2), 157–165
- Rouaki, F., Mazari, A., Kanane, A., Errahmani, M. B., & Ammouche, A. (2013). Cardiotoxicity Induced by Dietary Oxidized Sunflower Oil in Rats : Pro- and Antioxidant Effects of α -Tocopherol. *International Journal For Vitamin And Nutrition Research*, 83(6), 367-376.
- Rouaki, F., & Kanane, A. (2019) MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES DU FOIE DE RAT SOUMIS A UN RÉGIME CONTENANT UNE HUILE OXYDÉE ET SUPPLEMENTÉ EN VITAMINE E.
- **S**amuel, J., & Delcayre, C. (2017). La fibrose cardiaque. *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, 201(4-6), 775-784.
- Savall, M. (2020). *Etude de la réponse au stress oxydant de hépatocarcinomes présentant une hyperactivation de la voie β -caténine* (Doctoral dissertation, Université Paris Cité).
- SB, R. (1967). An improved procedure for creatine phosphokinase determination. *J. Lab. Clin. med.*, 69, 696-705.
- Sebbar, E., Naji, I., Mezgueldi, I. E., & Choukri, M. (2023). Le stress oxydatif, une agression cellulaire. *Actualités Pharmaceutiques*, 62(626), 36-37.

- 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, 1-26.
- Sies, H. (2020). Oxidative Stress : Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants*, 9(9), 852.
- Stampfer, M., Hennekens, C., Manson, J., Colditz, G., Rosner, B. and Willett, W. (1993) . Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women .*N.Engl .J. Med* .328: 1444 – 1449.
- Stocker, R. (1999). The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends in biochemical sciences*, 24(6), 219-223.
- Szasz, G., Gruber, W., & Bernt, E. (1976). Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clinical chemistry*, 22(5), 650-656.
- **T**ang, S. Y., & Halliwell, B. (2010). Medicinal plants and antioxidants : What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies ? *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 394(1), 1-5.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal Of Physiology. Lung Cellular And Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
- Thomas, S. R., Neuzil, J., Stocker, R. (1996). Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of α -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal–dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 16(5): 687-696.

- **V**alenzuela, A. (1991). The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences*, 48(4), 301-309.
- Varatharajan, R., Sattar, M. Z. A., Chung, I., Abdulla, M. A., Kassim, N. M., & Abdullah, N. A. (2013). Antioxidant and pro-oxidant effects of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaves extract in experimental diabetic nephropathy : a duration-dependent outcome. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 13(1).
- Verhagen,H.,Buijsse,B.,Jansen,E.,Bueno-de Mesquita,B.(2006).
Thestateofantioxidantaffairs.*NutritionToday*.41(6):244-250.
- **W**eiss, T. S., Pahernik, S., Scheruebl, I., Jauch, K., & Thasler, W. E. (2003). Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *Journal Of Hepatology*, 38(4), 476-482.
- Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 214(2), 199-210.

Annexes

Annexe 01 : Matériel non biologique

I. Verrerie et autres :

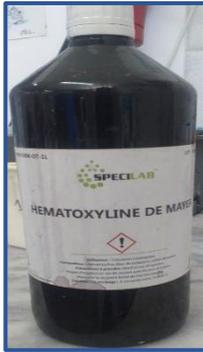
- Micropipette (de 10 μ l à 1000 μ l)
- Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml)
- Ciseaux
- Tubes (héparine, sec)
- Portoirs
- Papier absorbant
- Pincés
- Embouts de contenance de 1000 μ l
- Embouts de contenance 200 μ l
- Gants
- Les cassettes
- Lames et lamelles
- Pincés
- Les moules d'enrobage
- Support des lames

II. Réactifs chimiques :

▪ CPK :

R1 Tampon	Imidazole pH 7,0 Glucose Acétate de magnésium EDTA	100 mmol/L 20 mmol/L 10 mmol/L 2 mmol/L
R 2 Substrats	ADP AMP di-Adénosine-5- penta phosphate NADP ⁺ Hexokinase (HK) Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6F-DH) N-acétylcisteine Phosphate de créatine	2 mmol/L 5 mmol/L 10 mmol/L 2 mmol/L 2500 U/L 1500 U/L 20 mmol/L 30 mmol/L

▪ **Histologie :**



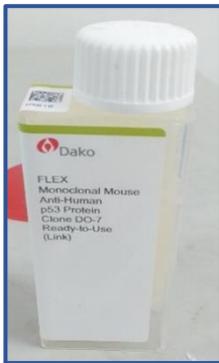
Hématoxyline de Harris



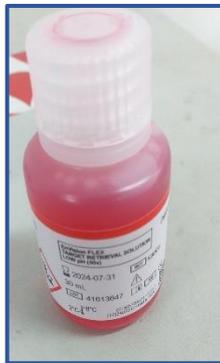
DAB + Chromogène



Anticorps secondaire



p53



pH 6



Peroxyd block



Wash buffer



Eosine



Xylène

III. Appareillage :

➤ Bilan biochimique :

- Centrifugeuse (DIAB)
- Spectrophotomètre UV-visible (minidray BA-88A)
- Bain-marie
- Réfrigérateur

➤ Histologie :

- Etuve
- Agitateur
- Micro-onde



Appareil d'inclusion
(Leica)



Appareil de refroidissement
des blocs (Leica)



Automate d'immunohistochimie
(VENTANA)

Annexe 02 :

Tableau I : Constitution du régime alimentaire

Ingrédients	Pourcentage
Farine de Luzerne	35%
Son	35%
Farine d'Orge	10%
Farine de Mais	10%
Farine de Viande	5%
Farine de poisson	3%
Complément minéral et vitaminique	2%

Annexe 03 :

- ✓ **Préparation de la solution de lavage :** en mettant 250Vml de l'eau distillé avec 250Vml de concentré de Wash Buffer.
- ✓ **Préparation de la solution DAB :** en mettant 01 ml du diluant « Substrat Buffer »avec 1ml du substrat « Chromogène DAB».