

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

UNIVERSITE DE 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 DIPLOME
DE MASTER II EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

FILIERE: SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION: GENIE BIOLOGIQUE

THEME

**Effets de la supplémentation à différentes doses en α -tocophérol sur
quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif et sur
l'histologie du tissu cérébral chez le rat en croissance**

Présentée par:

M^{lle} ACHEROUF LYNDA

Date de soutenance:

18 septembre 2016

Devant le jury:

M ^{me} EDDAIKRA A.	Maitre Assistante "A"	UB1	Présidente
M ^r OUSSADOU L.	Maitre Assistant "A"	UB1	Examineur
M ^{me} ROUAKI F.	Maitre de Conférences "B"	UB1	Promotrice

Année Universitaire :2015/2016

Dédicaces

A mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices, vous vous êtes consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A la mémoire de ma chère sœur Kahina que je n'oublierais jamais.

A mes chers frères.

A mes meilleurs amies: Houda et Hanane.

LYNDA

Remerciements

Je remercie en premier Dieu, de m'avoir donnée assez de force pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à mon encadreur « Mme Rouaki F. », Maître de Conférences "B" à l'université de Blida 1, pour sa patience, ses précieux conseils et sa grande disponibilité pour l'aboutissement de ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à « M^{me} Eddaikra A. », Maître Assistante "A" à l'université de Blida, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury, je lui manifeste ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à « M^r Oussadou L. », Maître Assistant "A" à l'université de Blida 1, pour l'honneur qu'il m'a fait de vouloir faire partie de ce jury en tant qu'examineur, je tiens à vous exprimer tout mon respect.

Je tiens à remercier également le Dr Saidani, chef du laboratoire des grands animaux de l'institut Pasteur d'Alger, pour son précieuse aide.

Je remercie très chaleureusement Dr Bouaouni, chef de service du laboratoire d'Anatomie-Pathologique (IPA- Hamma).

Je n'oublierai pas de remercier Dr Djennas, Maître Assistante à l'hôpital Nafissa-Hamoud , pour son aide lors de la lecture des lames histologiques.

Ma gratitude à toutes l'équipe du laboratoire CRD d'El-Harrach (SAIDAL) surtout la responsable de l'animalerie Dr Belkadi, ainsi qu'aux personnel des laboratoires du CHU Franz-Fanon (Blida), d'anatomie pathologique (CHU Hussein Dey /Alger) et de Venus (Blida).

Je tiens à exprimer mes remerciements à M^{me} Khaldoun pour son aide, ainsi qu'à tous les enseignants qui m'ont suivi pendant mes 5 années d'études.

Enfin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette étude.

RESUME

L'objectif de notre travail est de déterminer l'effet de la supplémentation en alpha-tocophérol (α -T) à différentes doses (600, 1200 et 1800 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 cerveau, ainsi que sur l'histologie cérébrale chez le rat Wistar en croissance.

Au terme de cette étude expérimentale, les principaux résultats obtenus montrent une augmentation non significative de la teneur en protéines, accompagnée d'une diminution significative du taux en MDA et de l'activité de la CAT du lot supplémenté en 600 mg d' α -T / kg d'aliment et ceci par rapport au lot témoin. Par contre nous avons obtenu pour les deux lots supplémentés en 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment, les mêmes variations de l'activité de la CAT et du taux en MDA; ce qui montre qu'il y a eu un déséquilibre de la balance oxydante / antioxydante 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 cerveau montrent un parenchyme cérébrale normal pour les deux lots RS et RSE₆₀₀, cependant chez le lot RSE₁₂₀₀, on a observé un œdème avec une importante congestion en périphérie du parenchyme cérébrale, ainsi qu'une distension des deux feuillets méninges avec présence d'un amas lymphocytaires. En revanche, l'histologie du lot RSE₁₈₀₀, révèle la présence d'un foyer nécrotique avec densification et dystrophie neuronales.

Mots clés : Alpha-tocophérol, rat, antioxydant, pro-oxydant, cerveau.

ABSTRACT

The objective of our work is to determine the effect of supplementation with alpha-tocopherol (α -T) at different doses (600, 1200 and 1800 mg of α -T / kg feed), on cerebral protein content, the rate of malondialdehyde (MDA) and the antioxidant enzyme catalase activity, as well as brain histology of Wistar rat in growth.

After this trial period, the main results show a no significant increase in protein content, accompanied by a significant reduction in the rate MDA and CAT activity of the batch supplemented with 600 mg of α -T / kg food and this compared to the control group. On the other hand we obtained for the two batches supplemented in 1200 and 1800 Mg d' α -T/kg of food, the same variations of the activity of the CAT and the rate in MDA; what shows that it there with have an imbalance of the oxidizing/antioxydant balance due to the fact that l' α -T with such amounts does not have acts as an antioxydant but rather as an pro-oxidant.

Finally, the histological study of the brain show a normal parenchyma cerebral for two batches RS and RSE600, however at batch RSE1200, one observed an oedema with an important congestion in cerebral periphery of the parenchyma, as well as a distension of the two layers meninges with presence of a cluster lymphocytaires. On the other hand, the histology of batch RSE1800, reveals the presence of a hearth necrotic with neuronal thickening and dystrophy.

Keywords: Alpha-tocopherol, rat, antioxidant, pro-oxidant, brain.

المخلص

يهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير مكملات الألفا توكوفيرول (α -tocophérol) بجرعات مختلفة (600، 1200 و 1800 ملغ من الـ α -T / كغ من الغذاء) ، على نسبة البروتينات، و معدل الـ (MDA) malondialdehyde وإنزيم المضاد للأكسدة الكاتالاز CAT في الدماغ وكذلك الفحص النسيجي لأنسجة دماغ الفئران من سلالة ويستار Wistar في مرحلة نمو.

بعد هذه الفترة التجريبية، النتائج الأساسية المحصل عليها تبين زيادة غير معتبرة في نسبة البروتين،يرافقه انخفاض معتبر في معدل الـ MDA ونشاط الـ CAT عند إضافة 600 ملغ من الـ α -T / كغ من الغذاء مقارنة بالشاهد. من ناحية أخرى حصلنا حصلنا علي نفس التغيرات في المجموعتين المستكملتين ب 1200 و 1800 ملغ من الـ α -T / كغ من الغذاء، في النشاط CAT ومستويات MDA. مما يدل على انه كان هناك خلل في توازن المؤكسد / مضاد للأكسدة لان الـ α -T في هذه الجرعات لم يتصرف كمضاد للأكسدة ولكن كدافع للأكسدة.

وأخيرا، أظهرت الدراسة النسيجية لدماغ نسيج حشوي عادي لكل من المجموعتين RS و RSE600، ولكن في المجموعة RSE1200، لوحظ تورم مع احتقان كبير في محيط النسيج الحشوي للدماغ ، فضلا عن انتفاخ طبقتي السحايا مع وجود تجمعات لمفاوية. من ناحية أخرى، فإن أنسجة المجموعة RSE1800 ، تبين وجود تركيز نخرية مع تكثيف وضمور الخلايا العصبية.

الكلمات المفتاحية : ألفا توكوفيرول , الفأر, مضاد للأكسدة, دافع للأكسدة, الدماغ..

Glossaire

Athérosclérose: est une maladie chronique et évolutive définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout s'accompagne d'une modification de la média » (Paula et Baudinb, 2009).

Vasospasme: est défini comme une vasoconstriction inappropriée pouvant conduire à des phénomènes ischémiques dans le territoire irrigué par le vaisseau concerné (Haufroid et Collignon-robe, 2004).

Lipofuscine: composés terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés, signe de vieillissement (Halliwell et Gutteridge, 2015).

Dermatite: une affection inflammatoire chronique, survenant sur un terrain atopique, caractérisée par des poussées prurigineuses d'eczéma aigu sur fond de xérose cutanée permanente (Dibi, 2014).

Maladies parodontales: sont des affections des tissus de soutien de la dent d'origine microbienne, constituées de lésions inflammatoires sous la dépendance du système de défense de l'hôte, entraînant une atteinte partielle ou complète de ses différentes structures (Bouchard, 2014).

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Chapitre I: Etude bibliographique	
1.Stress oxydatif.....	3
1.1.Différentes espèces réactives.....	3
1.1.1.Espèces réactives de l'oxygène.....	3
1.1.2. Espèces réactives de l'azote.....	5
1.2. Sources du stress oxydatif.....	5
1.2.1. Sources Exogènes.....	5
1.2.2. Sources Endogènes.....	6
1.3. Actions biologiques des radicaux libres.....	6
1.3.1. Lipides.....	6
1.3.2. Protéines.....	8
1.3.3. Acide désoxyribonucléique (ADN).....	8
1.4. Implications pathologiques du stress oxydatif.....	9
2. Antioxydants.....	10
2.1. Différents types d'antioxydants.....	10
2.1.1. Antioxydants endogènes.....	11
2.2.2. Antioxydants Nutritionnelle (exogènes).....	13
3. Vitamine E.....	15
3.1. Propriétés physico-chimiques.....	15
3.2. Source de la vitamine E.....	16
3.3. Métabolisme de la vitamine E.....	16

3.4. Mode d'action de la vitamine E.....	17
3.4.1. Action antioxydante de la vitamine E.....	18
3.4.2. Action pro-oxydante de la vitamine E	19

Chapitre II: Matériel et méthodes

1. Matériel.....	21
1.1. Matériel biologique.....	21
1.1.1. Lieu de stage.....	21
1.1.2. Animaux étudiés.....	21
1.1.3. Expérimentation.....	22
1.1.4. Supplémentation de l'aliment.....	22
1.1.5. Sacrifice et prélèvement du cerveau.....	22
1.2. Matériel non biologique.....	24
2. Méthodes.....	24
2.1. Dosage des protéines (Lowry et al., 1951).....	24
2.2. Dosage du malondialdéhyde (Draper, 1993).....	27
2.3. Dosage de l'activité de la catalase (Aebi, 1984).....	28
2.4. Réalisation des coupes Histologiques.....	29
3. Etude statistique.....	31

Chapitre III: Résultats et discussion

1. Modifications physiologiques.....	32
1.1. Symptomatologie.....	32
1.2. Effet de la supplémentation en α -tocophérol sur les paramètres pondéraux.....	32
2. Effet de la supplémentation en α -T sur quelques paramètres du stress oxydant.....	37
2.1. Effets des différents régimes sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale.....	37

3. Effet de la supplémentation en α -T à différentes doses sur l'histologie du tissu cérébral.....49

Conclusion et perspectives.....55

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène.

ERA: Espèces Réactives de l'Azotes.

EROA: Espèces Réactives Oxygénées et Azotées.

$O_2^{\bullet -}$: Anion Superoxyde.

$^{\bullet}OH$: Radical Hydroxyl.

RO^{\bullet} : Radical Alkoxy.

ROO^{\bullet} : Radical Peroxyl.

H_2O_2 : Peroxyde D'hydrogène.

1O_2 : Oxygène Singlet.

HOCL: Acide Hypochloreux.

ROOH: Hydroperoxyde.

NO^{\bullet} : Monoxyde d'azote.

HNO_2 : Acide Nitrique.

$ONOO^-$: Peroxynitrite.

NO_2 : Nitrique Dioxyde.

O_2 : Oxygène Moléculaire.

$O_2^{\bullet -}$: Radical Superoxyde.

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate Hydrogène.

^-OH : Anion Hydroxyde.

H⁺: Ion Hydrogène.

NOS: Nitrique Oxyde Synthase.

NADP⁺: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

ONOO•: Peroxynitrite.

Lp: Lipides.

AGPI: Acides Gras Polyinsaturés.

L•: Radical Alkyle.

LOO•: Radical Peroxyle.

LOOH: Hydroperoxydes.

MDA: Malondialdehyde.

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

SOD: Superoxyde Dismutase.

CAT: Catalase.

GPx: Glutathion Peroxydase.

GSH: Glutathion.

GSSG: Glutathion-Disulfure.

GR: Glutathion Réductase.

GS °: Radical Thiols.

ROO•: Radicaux Peroxydes.

CoQH₂: Ubisemiquinone.

CoQH ° : Ubiquinol.

AscH⁻: Ascorbate.

Asc^{•-} : Radical Ascorbyl.

α -T: α - Tocophérol.

α -T[•]: Radical α -Tocophéroxyl.

MTP: Microsomal Triglycerides Transfert Protéine.

VLDL: Lipoprotéines de très basse densité.

α - TTP: α -Tocophérol Transfert Protéine.

PLTP: Protéine du Transfert Plasmatique des Phospholipides.

HDL: Lipoprotéines de haute densité.

LDL: Lipoprotéines de basse densité.

PXR: Pregnane X Récepteur.

Mn⁺: Ions Métalliques

RS: Régime Standard.

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

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

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

ONAB: Office National des Aliments de Bétail.

NaCl: Chlorure de Sodium.

BSA: Sérum Albumine bovine.

TBA: Acide Thiobarbiturique.

TBA-RS: Substances Réactives de l'Acide Thiobarbiturique.

Liste des figures

Figure 01: Peroxydation lipidique	7
Figure02: Pathologies associées aux espèces réactives oxygénée.....	9
Figure 03: Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant.....	10
Figure 04: Coopération entre les systèmes non enzymatiques et enzymatiques.....	14
Figure 05: Les structures chimiques de tocophérol et tocotriénol.....	15
Figure 07: Métabolisme de la vitamine E.....	17
Figure 08: L' α -tocophérol médiateur de la peroxydation lipidique.....	18
Figure 09 : Expérimentation animale.....	21
Figure 10: Aliments fournis aux rats sous forme de poudre.....	23
Figure 11: Pesée de l'aliment des rats.....	23
Figure 12: Vitamine E commercial.....	23
Figure 13: Broyage des échantillons cérébraux à l'aide d'un broyeur homogénéiseur.....	25
Figure 14: Automate de traitement des tissus.....	30
Figure 15: Module de refroidissement des blocs de paraffine.....	30
Figure 16: Coloration Hématoxyline-Eosine.....	31
Figure 17: Variation du gain de poids corporel en gramme chez les rats en croissance.....	32
Figure 18: Evaluation des poids cérébraux chez les rats en croissance.....	36
Figure 19. (A à C): Effet de la supplémentation de 600 mg en α -T/kg d'aliments: RSE600, sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale chez des rats en croissance, par rapport aux lots RS.....	39
Figure 20. (A à C): Effet de la supplémentation de 1200 mg en α -T/kg d'aliments: RS1200, sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale chez les rats en croissance, par rapport aux lots RS et RSE600.....	43

Figure 21. (A à C): Effet de la supplémentation de 1800 mg en α -T/kg d'aliments: RS1280, sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale chez les rats en croissance par rapport aux témoins: RS, le lot RSE600 et RSE1800.....47

Figure 21 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale (10 \times , H&E) montrant: (a) l'architecture normale chez le lot "témoin" : RS, et (b) chez les rats supplémentés avec 600 mg d' α -T / kg d'aliment: RSE600. flèche noire: neurone pyramidale, flèche rouge: oligodendrocytes.....52

Figure 22 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE 1200, montrant la présence d'un œdème avec une congestion en périphérie du parenchyme cérébrale avec distension des deux feuillets méninges (la dure-mère et la pie-mère); (a): (10 \times , H&E), (b): (40 \times , H&E). PC: parenchyme cérébrale, D: dure-mère, P: pie-mère, Oe:œdèmes, CG: congestion.....53

Figure 23 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE 1200, montrant présence d'un amas de cellules lymphocytaires; (a): (10 \times , H&E), (b): (40 \times , H&E). PC: parenchyme cérébrale, L: amas de lymphocytes.....53

Figure 24 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE 1800, montrant la présence d'un foyer nécrotique; (a): (10 \times , H&E), (b): (40 \times , H&E). PC: parenchyme cérébrale, N: foyer nécrotique, Nc: cellules nécrotiques.....54

Figure 25 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE 1800, montrant la présence d'une densification et dystrophie neuronales; (a): (10 \times , H&E), (b): (40 \times , H&E). DN: densification neuronale.....54

Listes des tableaux

Tableau I : Principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....	3
Tableau II: Gamme étalon réalisée à partir de la solution BSA.	27
Tableau III: Concentrations et quantités de réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase.....	29

Introduction

Introduction

Toutes les cellules vivantes sont exposées de façon chronique aux oxydants provenant de sources à la fois endogènes et exogènes qui génèrent à chaque instant dans l'organisme des molécules qu'on appelle espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (EROA); ces dernières sont des intermédiaires indispensables à l'organisme où elles sont impliquées dans des processus physiologiques à de faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des EROA peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule: les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Au niveau moléculaire, les EROA peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes donnant lieu à un stress oxydatif qui sera impliqué dans le développement de diverses pathologies. Et de tous les organes, le cerveau est le plus vulnérable aux dommages oxydatifs en raison de sa forte consommation d'O₂, la présence de niveaux élevés d'acides gras polyinsaturés et de la nature dégénérative de neurones, ce qui peut conduire à diverses maladies neurodégénératives (Jie et *al.*,2013).

Pour contourner les dommages causés par les EROA, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants, ces derniers présents à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, sont définis comme toute substance ayant la capacité de contrôler, retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Tang et Halliwell, 2010). Il existe une multitude d'antioxydants proprement dits qui sont synthétisés par l'organisme ou le plus souvent apportés par l'alimentation. Entre autres, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes assurent la réparation des éventuels dommages oxydatifs au niveau des protéines et de l'ADN, en présence des antioxydants non enzymatiques (vitamine E, sélénium, cuivre,...) et sont parfois considérés comme des cofacteurs de divers enzymes à activité antioxydante (Defraigne et Pincemail, 2008).

Les antioxydants ont fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux, qu'ils soient ingérés avec les aliments ou sous forme de compléments. En l'état actuel des connaissances, l'apport d'antioxydants par l'alimentation peut être considéré comme favorable à la santé (Tanguy et Begué-Simon, 2009). La vitamine E (α -tocophérol), qui est considéré comme le principal antioxydant membranaire, utilisé par la cellule

pour inhiber la peroxydation lipidique. Durant la réaction antioxydante, l' α -tocophérol est converti en radical α -tocophéroxyl beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxyde) (Valko et *al.*, 2006).

Cependant, l'effet pro-oxydant de l' α -T consiste à augmenter la peroxydation lipidique, ce processus est bien connue *in vitro* (Bowry et *al.*, 1992). Des études sur des suspensions micellaires (Mukai, 1993) et des LDL isolées (Thomas et *al.*, 1996), ont montrés que de fortes doses en vitamine E avaient un effet pro-oxydant. La cause de cette activité pro-oxydante et l'interaction du radical tocophéroxyl avec des radicaux peroxyde ou avec des acides gras polyinsaturés dans les LDL. Cette réaction mène à l'accumulation des hydroperoxydes et des diènes conjugués (Mukai, 1993).

Actuellement, il existe très 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 cette étude dont l'objectif est d'évaluer quelques marqueurs de la balance oxydants/antioxydants chez des rats Wistar, nourris pendant 8 semaines avec régime standard supplémenté en (600, 1200 et 1800 mg d' α -T/kg d'aliment), nous souhaitons contribuer à une meilleure compréhension de l'effet de ces suppléments sur des rats en croissance et sur l'histologie du tissu cérébral.

Chapitre I: Etude Bibliographique

1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les systèmes d'oxydation et les défenses antioxydantes des cellules et des tissus conduisant à la surproduction des radicaux libres (Vibha et *al.*, 2016), ces derniers sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leurs couches périphériques (Denys, 2013), généralement instables et très réactif (Sha, 2015).

1.1. Différentes espèces réactives

Selon Adelheid et Andrey (2015), les espèces réactives comprennent deux classes de molécules : les espèces réactives de l'oxygène; ERO et les espèces réactives de l'azote; ERA appelées « espèces réactives oxygénées et azotées : EROA » représentés au niveau du tableau I:

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

	Radicalaires	Non Radicalaires
Espèces Réactives Oxygène (ERO)	Anion Superoxyde $O_2^{\bullet -}$ Radical Hydroxyle $\bullet OH$ Radical Alkoxyl RO^{\bullet} Radical Peroxyl ROO^{\bullet}	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 Oxygène Singlet 1O_2 Acide Hypochloreux $HOCl$ Hydroperoxyde $ROOH$
Espèces Réactives azotées (ERA)	Monoxyde d'azote NO^{\bullet} Acide Nitrique HNO_2	Peroxynitrite $ONOO-$ Nitrique Dioxyde NO_2

(Taibur et *al.*, 2012)

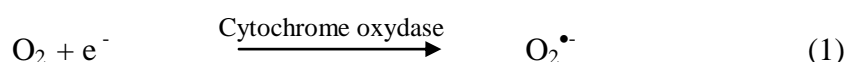
1.1.1. Espèces réactives de l'oxygène

À l'état naturel, l'Oxygène moléculaire (O_2) comporte deux électrons célibataires très instables avec une forte tendance à « oxyder » les composés qu'ils rencontrent en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataires (Xavier, 2009).

Les ERO sont produites dans les organismes vivants dans des conditions physiopathologiques et comprennent des espèces radicalaires et des espèces non-radicalaires (Mario et *al.*, 2016).

A. Radical superoxyde

Le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) résulte de l'addition d'un électron à l' O_2 , une telle réaction (1) est catalysée par la cytochrome oxydase (Halliwell et Gutteridge, 2015):



L' $O_2^{\bullet-}$ peut également se former grâce à la NADPH oxydase et le système enzymatique xanthine / xanthine oxydase (Halliwell et Gutteridge, 2015).

B. Radical hydroxyle

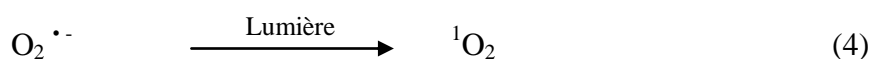
Le radical Hydroxyle ($\bullet OH$) est produit par la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction d'Haber-Weiss : réaction (2) (Lacolley et *al.*, 2007), et aussi en présence de métaux de transition (fer, cuivre) selon la réaction (3) de Fenton (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003):



Le radical $\bullet OH$ est le plus réactive des ROS en particulier, vis - à- vis des lipides membranaires en déclenchant la peroxydation lipidique (Huet et *al.*, 2007).

C. Oxygène singlet

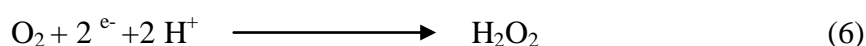
L'oxygène singlet (1O_2) est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à l' O_2 , produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes (Navarra et *al.*, 2009). Il est formé à partir de l'ion $O_2^{\bullet-}$ selon la réaction (6) (Halliwell et Gutteridge, 2015):



Bien que $^1\text{O}_2$ ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et dans certaines maladies liées à l'âge (Choe et Min, 2005).

D. Peroxyde d'hydrogène

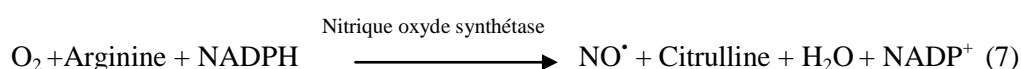
Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit par la dismutation spontanée ou induite de l'anion $\text{O}_2^{\bullet-}$ (réaction 5) ou par la réduction bivalente de l' O_2 (réaction 6) selon Bonnefont Rousselot et *al* (2003):



L' H_2O_2 n'est pas un radical libre mais à la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition, il donne naissance *via* la réaction de Fenton (5) à un radical $\bullet\text{OH}$ (Bonnefont Rousselot et *al.*, 2003).

1.1.2. Espèces réactives de l'azote

Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction (7) est catalysée par la nitrique oxyde synthétase (Sorg, 2004):



A forte concentration, le NO^{\bullet} devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former le peroxyde d'azote (ONOO^{\bullet}) (Densiov et Afanas'ev, 2005). Cependant, le NO^{\bullet} n'est pas dénué de toxicité car il réagit avec la plupart des ERO (Halliwell et Gutteridge, 2015).

1.2. Sources du stress oxydatif:

Les agents capables de donner naissance à des ERO sont soit exogènes ou endogènes:

1.2.1. Sources Exogènes

Selon Guineber et *al* (2005), les radicaux libres d'origine exogène résultent de l'action chimique de certains constituants de notre environnement:

- les rayonnements UV et les radiations ionisantes (Opara, 2006),
- les agents toxiques tels que le NO[•] et NO₂, sont responsables de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des alvéoles pulmonaires (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2001),
- les xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides) et médicaments, en plus des aliments qui peuvent contenir des oxydants (Curtay et Robin, 2000),
- les antioxydants naturels comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols, sont souvent prétendu être bénéfiques pour la santé. Cependant, à des doses plus élevées ils peuvent exercer des activités pro-oxydantes toxiques (Rietjens et *al.*, 2002).

1.2.2. Sources Endogènes

Dans l'organisme vivant, il ya de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie en fonction des tissus (Droge, 2002):

- les principaux systèmes enzymatiques: la NADPH oxydases, NO synthases et la chaîne respiratoire (Beaudeau, 2006),
- les cellules phagocytaires lorsqu'elles phagocytent les particules étrangères (Lau et *al.*, 2007),
- la β -oxydation dans les peroxyosomes (Cadenas et Davies, 2000),
- le métabolisme du cytochrome P450 des composés xénobiotiques (Cadenas et Davies, 2000).

1.3. Actions biologiques des radicaux libres

Le stress oxydatif peut causer des dommages à toutes les cibles moléculaires: lipides, protéines et ADN (Gueteens et *al.*, 2002):

1.3.1. Lipides

L'oxydation des lipides (Lp) surtout les AGPI, est un processus radicalaire de réactions en chaîne, connue sous le nom de peroxydation lipidique qui provoque une augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération

irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule (Brack, 2009). La lipopéroxydation se déroule en trois phases (Figure 01) :

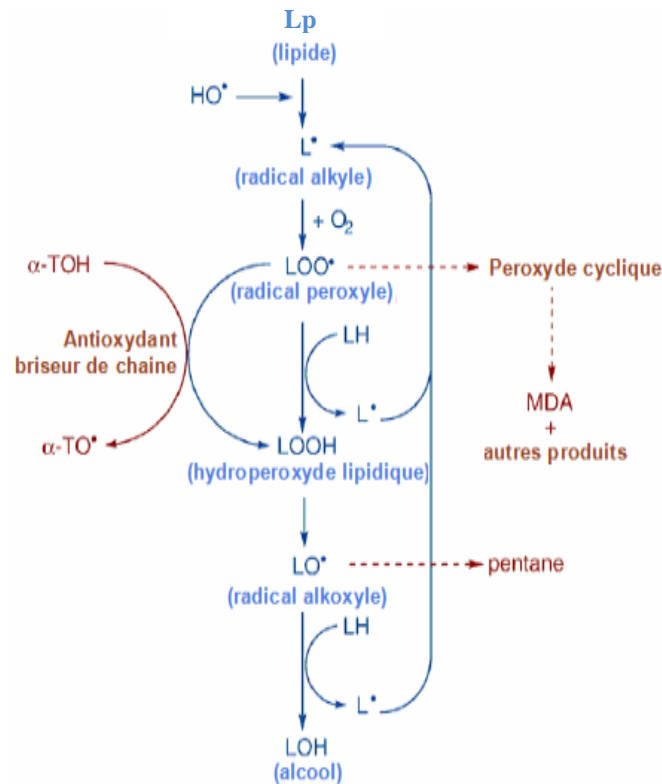


Figure 01: Peroxydation lipidique (Sachdev et Davies, 2008).

- **Initiation** : l'attaque par un radical OH^\bullet du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'un AGPI produit un radical alkyle L^\bullet , qui est transformé en radical peroxyde LOO^\bullet en présence d' O_2 (Atta-ur et Choudhary, 2010),

- **Propagation**: le radical LOO^\bullet enlève un hydrogène à un nouveau LH voisin qui à son tour produira un radical L^\bullet puis un radical LOO^\bullet , une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydroperoxydes LOOH formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions (Atta-ur et Choudhary, 2010); le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques (Lehucher-Michel et *al.*, 2001),

- **Terminaison** : Consiste à former des composés stables issus de la rencontre de deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite 'briseur de chaîne' (Kohen et Nyska, 2002).

1.3.2. Protéines

Selon Baraibar et *al* (2013), les protéines peuvent subir l'action directe des ERO:

- l'oxydation des chaînes latérales des résidus cystéine et méthionine, conduisant à la formation de disulfures, acide sulfénique et méthionine sulfoxyde,
- formation de réticulations intra- et inter-moléculaires et/ou fragmentation des chaînes polypeptidiques par oxydation du squelette carboné de la protéine,
- fragmentation de la chaîne carbonée par oxydation d'un résidu glutamyl, α -amidation ou oxydation directe de chaînes latérales de résidus sensibles (lysine, arginine, proline, thréonine) conduisant à la formation des groupes carbonyles.

1.3.3. Acide désoxyribonucléique (ADN)

Les attaques radicalaire de l'ADN sont essentiellement causées par le $\cdot\text{OH}$ et sont de différents types (Grandjean, 2005):

- modification des bases azotées entraînent un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN,
- destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base ou « abasique », qui s'avère être non fonctionnel,
- destruction du désoxyribose, responsable d'une cassure de brin, létale pour la cellule,
- formation de pontages avec des protéines, ou avec des dérivés d'oxydation lipidique (tel que le MDA),

Ainsi ces dommages peuvent participer à une mutagénèse, à un arrêt des divisions cellulaires, de la synthèse protéique par blocage des mécanismes de transcription /traduction, et enfin à une mort cellulaire.

1.4. Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant (figure 02) apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (Favier, 2003).

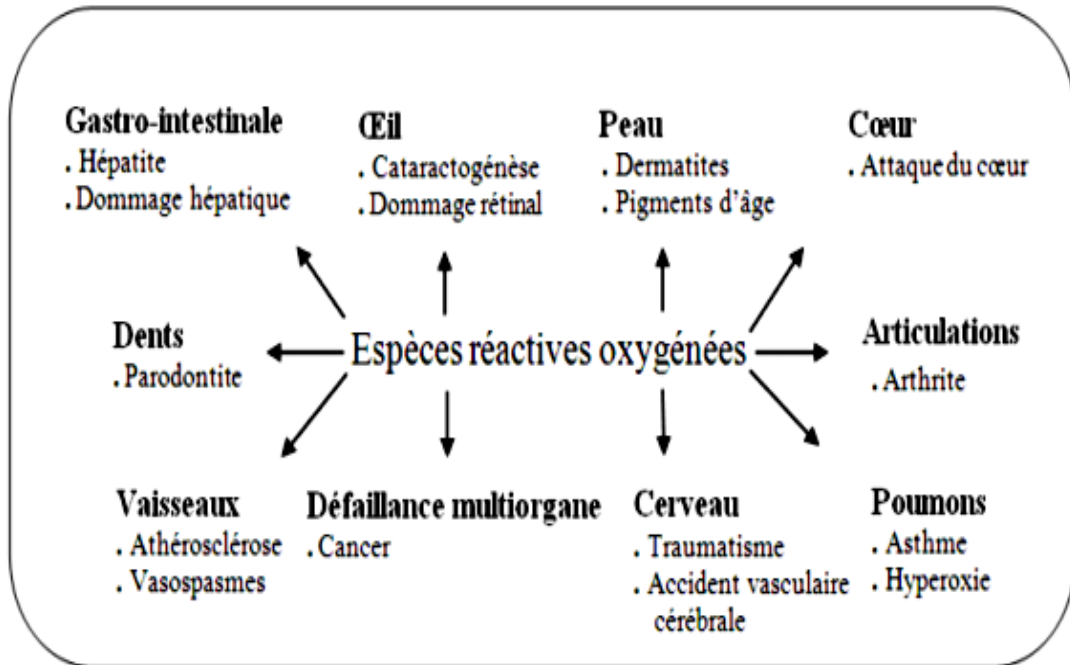


Figure 02: Pathologies associées aux espèces réactives oxygénées (Lee et al., 2004).

2. Antioxydants

L'O₂ à un potentiel oxydant très élevé, ce qui le rend très dangereux pour toutes les molécules organiques. C'est ainsi que les organismes vivants ont développé de puissantes défenses antioxydantes (Xavier, 2009).

Le concept d'antioxydant fait référence à tout composé lorsqu'il est présent à une faible concentration à celle du substrat oxydable, et est capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation de ce substrat (Pisoschia et Popa, 2015). Les antioxydants couvrent différentes catégories de composés qui peuvent interférer avec les cycles d'oxydation pour inhiber ou retarder les dommages oxydatifs (Oroian et Escriche, 2015).

2.1. Différents types d'antioxydants

Les antioxydants sont répertoriés selon leur origine (figure 03), les antioxydants endogènes de types enzymatiques 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 (Denys, 2013).

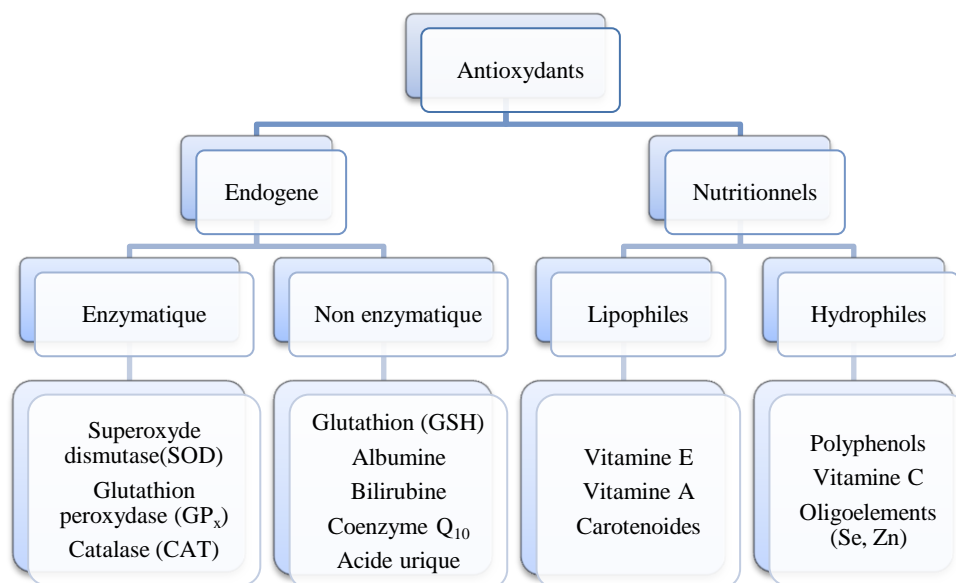


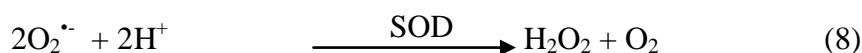
Figure 03: Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant (Denys, 2013).

Se : Sélénium, Zn : Zinc.

2.1.1 Antioxydants endogènes

A. Superoxyde dismutase (SOD)

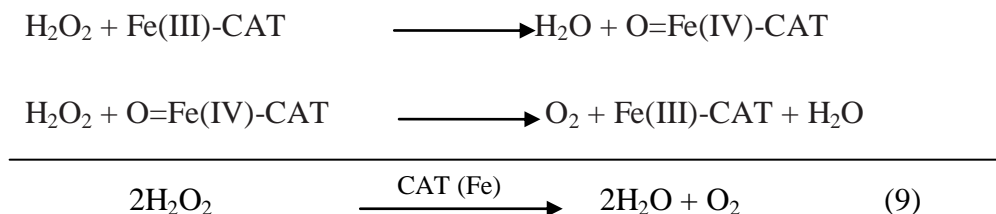
La SOD catalyse la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ en O_2 et en H_2O_2 selon la réaction (8) (Taibur et al, 2012):



Selon Pisoschia et Popa (2015), il ya trois types de SOD: la SOD cytosolique, SOD (Cu/Zn-SOD), la SOD de la matrice mitochondriale (Mn-SOD) et la SOD extracellulaire (EC-SOD).

B. Catalase (CAT)

La CAT est une protéine héminique, formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un hème, qui constituent les sites actifs de la CAT (Delattre et al., 2005). Elle catalyse la transformation du H_2O_2 en H_2O et O_2 pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (Halliwell et Gutteridge, 2015). Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du H_2O_2 , ce qui crée l' H_2O et un coupement $Fe(IV)=O$ très oxydant ; ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de H_2O_2 pour donner du O_2 . Cette réaction est illustrée par les deux demi-équations suivantes (Bonnefont-Rousselot et al., 2003) :



La CAT présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques (Halliwell et Gutteridge, 2015).

C. Glutathion peroxydase (GPx)

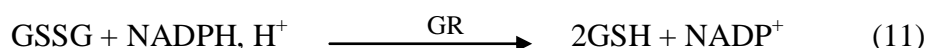
La GPx est formée de quatre sous-unités identiques contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans la sélénocystéine (Raman et Berry, 2011). Elle

réduit le H_2O_2 en H_2O (réaction 10) avec oxydation de deux molécules de glutathion réduit (GSH) en glutathion-disulfure (GSSG) (Halliwell et Gutteridge, 2015):



D. Glutathion réductase (GR)

La GR catalyse la réduction du glutathion oxydé GSSG en glutathion réduit GSH à l'aide du cofacteur NADPH (réaction 11), qui provient de l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate, de la voie des pentoses phosphates (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) :



E. Glutathion (GSH)

Le GSH est un tripeptide γ -Glu-Cys-Gly, sous sa forme réduite (GSH) il agit comme un antioxydant. En maintenant les thiols des protéines et certains composés sous leurs formes réduites comme la vitamine C ou E. Le GSH est un composé piègeur pouvant réagir avec $\cdot\text{OH}$ ou l' H_2O_2 pour donner un radical thyle (GS^\bullet), pouvant lui même réagir avec l' O_2 et entraîner une série de réactions, les radicaux formés pouvant se recombinaison en glutathion disulfide stoppant ainsi la réaction radicalaire en chaîne (Lacolley et *al.*, 2007).

F. Bilirubine

La bilirubine liposoluble est un produit terminal de dégradation de l'hémoglobine, il a été montré *in vitro* que la bilirubine avait des propriétés antioxydants envers plusieurs espèces réactives comme le radical peroxyde ROO^\bullet , l' ONOO^- , RO^\bullet et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Halliwell et Gutteridge, 2015).

La bilirubine est le principal protecteur de l'albumine (Algeciras et *al.*, 2007). tandis que la bilirubine lipophile empêche également la peroxydation des lipides membranaires (Pisoschia et Popa, 2015).

G. Coenzyme Q₁₀

D'après Halliwell et Gutteridge (2015), le coenzyme Q₁₀ comporte dix résidus isoprénique (n=10), il est connu pour son rôle dans la production d'énergie. La réduction de l'ubisemiquinone (CoQH₂) en ubiquinol (CoQH°), permet de piéger le ROO• et d'inhiber la peroxydation lipidique (réaction 12) selon Halliwell et Gutteridge, (2015):



H. L'acide urique

L'acide urique est un produit terminal majeur du métabolisme des purines, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant des radicaux O₂•-, ROO• et l'HO• (Lacolley et *al.*, 2007), il protège également la membrane érythrocytaire de la lipopéroxydation (Pisoschia et Popa, 2015). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C). Les propriétés antioxydantes de l'urate *in vivo* peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les EOA, l'allantoïne, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant (Haleng et *al.*, 2007).

II-2-2 Antioxydants Nutritionnelle (exogènes)

A. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont un groupe de pigments végétaux formés de longues chaînes aliphatiques alternant simples et doubles liaisons permettant une délocalisation des électrons le long de cette chaîne. Certains caroténoïdes surtout les β-carotènes sont des précurseurs de la vitamine A aussi appelées rétinoles (Halliwell et Gutteridge, 2008). Ils captent l'•OH et ROO•, ce qui les rend susceptibles d'inhiber la lipopéroxydation. Ils captent également l¹O₂, permettant de protéger ainsi contre les rayons UV (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

B. Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique), est un antioxydant plasmatique hydrosoluble capable de céder un électron à quasiment tous les radicaux libres (Defraigne et Pincemail, 2008). En réagissant avec les ERO, l'ascorbate (AscH^-) est oxydé en radical ascorbyle ($\text{Asc}\cdot^-$) qui est inerte vis-à-vis des molécules biologiques. De plus, l'ascorbate permet la régénération du GSH et de l' α -tocophérol (α -T) à partir de leurs formes radicalaires (Figure 04). L' AscH^- est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical $\text{Asc}\cdot^-$ (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

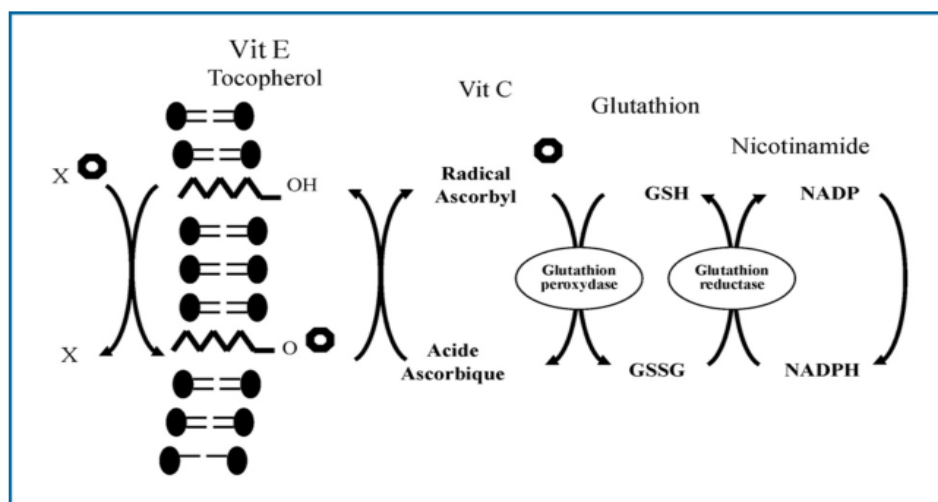


Figure 04: Coopération entre les systèmes non enzymatiques et enzymatiques (Xavier, 2009).

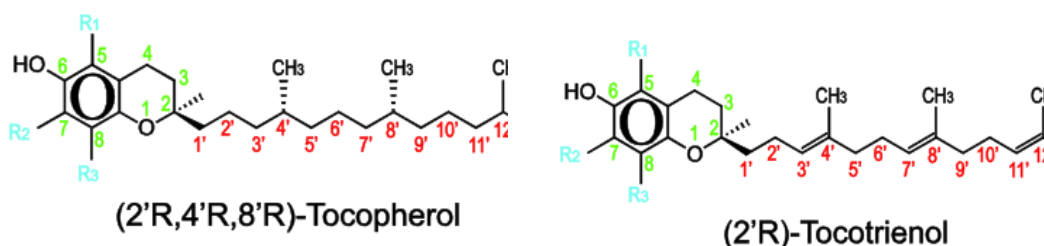
C. Vitamine E

La vitamine E (α -T) à un caractère hydrophobe, ce qui lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines et empêchant ainsi la propagation de la lipopéroxydation (El-Sohemy et *al.*, 2002). L' α -T en contacte avec les ERO perd un hydrogène et se transforme en radical α -tocophéroxyle ($\alpha\text{-T}\cdot$), tandis que le radical $\text{ROO}\cdot$ est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (ROOH) (Blokhina et *al.*, 2003). L' $\alpha\text{-T}\cdot$ retourne à une forme réutilisable grâce à la vitamine C et le glutathion (Heer et *al.*, 2015).

3. Vitamine E

La vitamine E représente deux groupes de molécules (Figure 05): les tocophérols et les tocotrienols, comprenant chacun quatre vitamères : alpha, beta, gamma et delta (α , β , γ et δ) (Peh et *al.*, 2015). Leurs structures chimiques se composent d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri méthyle auquel est rattachée une chaîne latérale à 16 atomes de carbone qui définit les deux grandes familles (Herrera et Barbas, 2001):

- Les tocophérols avec une chaîne latérale saturée.
- Les tocotrienols avec une chaîne latérale à trois insaturations.



Vitamin E	R ₁	R ₂	R ₃	Molecular Weight
α -tocopherol	CH ₃	CH ₃	CH ₃	430.71
β -tocopherol	CH ₃	H	CH ₃	416.68
γ -tocopherol	H	CH ₃	CH ₃	416.68
δ -tocopherol	H	H	CH ₃	402.65
α -tocotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃	424.66
β -tocotrienol	CH ₃	H	CH ₃	410.63
γ -tocotrienol	H	CH ₃	CH ₃	410.63
δ -tocotrienol	H	H	CH ₃	396.61

Figure 05: Structures chimiques de tocophérol et tocotriérol (Peh et *al.*, 2015).

3.1. Propriétés physico-chimiques

L' α -T pure est un liquide visqueux huileux et jaunâtre qui s'oxyde facilement lorsqu'elle est exposée à la lumière, à l'O₂ et aux métaux de transition. Elle est insoluble dans l'eau, très soluble dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (Peh et *al.*, 2015). Elle est peu sensible à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensible à l'oxydation et aux bases (Claude, 2003).

3.2. Source de la vitamine E

La vitamine E est synthétisée uniquement par les organismes photosynthétiques. L' α -T est contenu dans les chloroplastes des cellules végétales alors que les vitamines β -, γ -, et δ - se trouvent généralement en dehors des parties vertes (Gerald et Combs, 2012). Les huiles de germe de blé, de tournesol et de carthame sont riches en α -T, tandis que les huiles de maïs et de soja contiennent principalement la γ -tocophérol. Les tissus animaux ont tendance à contenir de faibles quantités d' α -T, principalement dans les tissus adipeux qui varie en fonction de l'apport alimentaire de la vitamine E (Gerald et Combs, 2012).

La vitamine E existe également sous forme synthétique, il s'agit du dl-alpha tocophérol. On retrouve également l'acétate ou le succinate de tocophérol. La forme naturelle est particulièrement recommandée. En effet, elle est la plus active et deux fois mieux assimilée par les tissus que la forme synthétique (Andreas et Papas, 2008).

3.3. Métabolisme de la vitamine E

La première phase de la digestion-absorption est la dissolution des vitamines liposolubles dans la phase lipidique du bol alimentaire, qui est ensuite émulsifiée en gouttelettes lipidiques au niveau stomacal puis duodéal (Borel, 2003). Les vitamines lipophiles sont incorporées avec les lipides dans des micelles mixtes, de cette façon l' α -T est absorbée de 55-79 %, depuis la lumière intestinale par un processus de diffusion passive à travers l'entérocyte (Reboul, 2011).

Par ailleurs, il est admis que la vitamine E est incorporée sous forme libre dans les chylomicrons (figure 07), ce processus implique la MTP (microsomal triglycérides transfert protéine) (Anwar et *al.*, 2007). La vitamine E restant dans les chylomicrons résiduels, c'est-à-dire celle qui n'a pas été échangée avec d'autres lipoprotéines ou distribuée aux tissus périphériques lors de la lipolyse par les lipases endothéliales, est captée par le foie.

L' α -T est incorporée dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) via l' α -tocophérol transfert protéine (α -TTP), selon un mécanisme non élucidé, ce qui va permettre sa distribution aux tissus périphériques (Traber, 2007). Ainsi, la protéine de transfert plasmatique des phospholipides (PLTP), facilite l'échange de l' α -T entre les

lipoprotéines de haute densité (HDL) et les lipoprotéines de basse densité (LDL) (Lagrost et Masson, 2002). Approximativement la moitié de l' α -T plasmatique est présente dans les LDL et l'autre moitié est distribuée entre les VLDL et les HDL (Albahrani et Greaves, 2016).

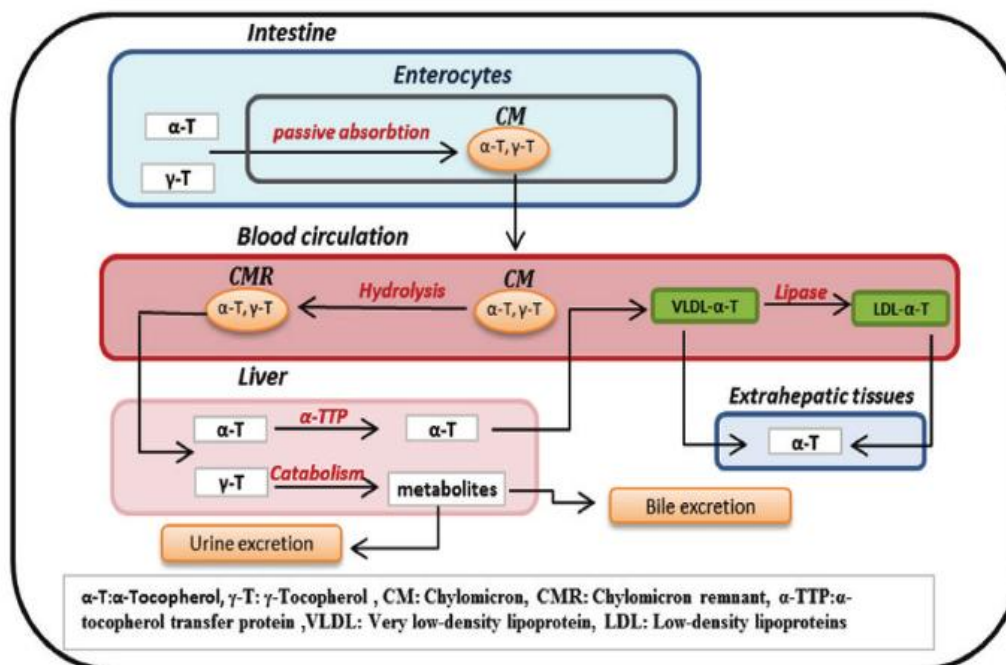


Figure 07: Métabolisme de la vitamine E (Albahrani et Greaves, 2016).

La vitamine E connaît 2 voies d'excrétion : une excrétion urinaire pour les métabolites résultant de l'action antioxydante de l' α -T et celles qui proviennent d'une voie d'excrétion non oxydative. L'excrétion fécale est majeure pour la vitamine E ingérée (Cuvelier et al., 2003).

3.4. Mode d'action de la vitamine E

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

L' α -tocophérol (α -TOH) situé à la surface des particules du LDL (figure 08), peut faciliter l'entrée des radicaux dans la particule (réaction [1']). Le radical α -tocophéroxyle résultant (α -TO \bullet) peut initier la peroxydation lipidique en arrachent un atome d'hydrogène des lipides de surface ou de cœur contenant des hydrogènes

bisallyliques (LH) (réaction [1]); Cela produit l' α -TOH et un radical lipidique (L^\bullet) Centré sur le carbone auquel s'ajoute l'oxygène moléculaire. Le radical peroxyde résultant (LOO^\bullet) est rapidement stabilisé par l' α -TOH (réaction [2]) pour produire l'hydroperoxyde lipidique (LOOH) et régénérer α -TO $^\bullet$. La nature cyclique des réactions [1] and [2] permet à de nombreuses molécules de LOOH d'être formées sans consommation de vitamine E. Les co-antioxydants (XH) inhibent la peroxydation en stabilisant l' α -TO $^\bullet$ (Réaction [3]) et produisant du radical co-antioxydant (X^\bullet) (réaction [4]), et formé ainsi des produits non radicalaires (NRP). La vitamine E seule peut agir comme un pro- ou anti-oxydant, en fonction des fréquences auxquelles les particules du LDL rencontrent les radicaux libres et la présence de co-antioxydants (Stocker et *al.*, 1999).

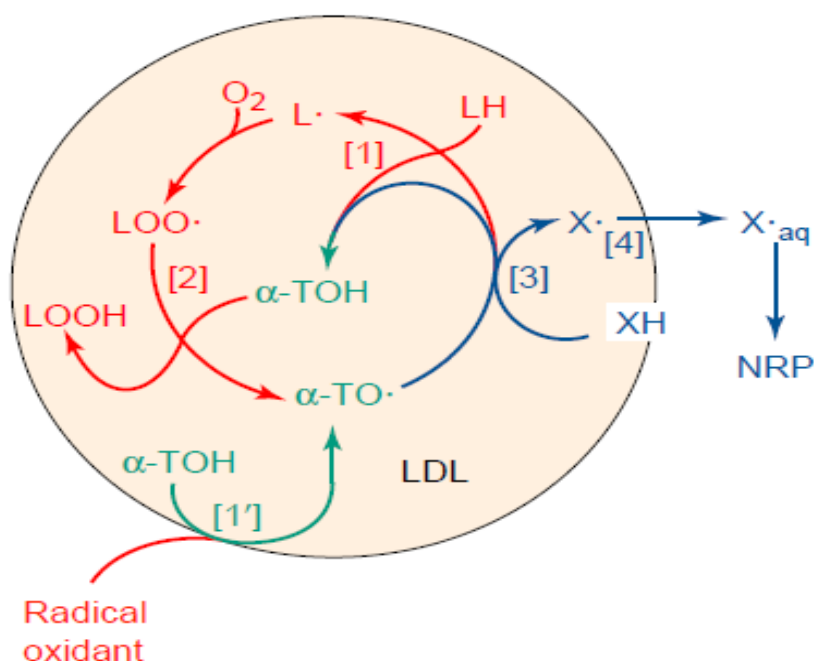


Figure 08: L' α -tocophérol médiateur de la peroxydation lipidique (Stocker et *al.*, 1999).

Réactions pro- ou anti-oxydant sont montré en vert; réactions pro-oxydantes sont indiquées en rouge; réactions antioxydantes en bleu.

3.4.1. Action antioxydante de la vitamine E

Traber et Atkinson, (2007) ont déclarés que le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au niveau des membranes biologiques riches en

AGPI où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les ERO.

Sur la base d'études épidémiologiques, il a été postulé que la vitamine E pourrait avoir un rôle bénéfique vis-à-vis des pathologies dégénératives (maladies cardiovasculaires, pathologies neurodégénératives, pathologies oculaires...) dans lesquelles les ERO semblent être impliquées (Bjelakovic *et al.*, 2007).

En parallèle de ces travaux sur les effets antioxydants, des études ont montré que la vitamine E est capable de moduler l'expression de gènes *via* un certain nombre de voies de signalisation et de récepteurs nucléaires (Azzi, 2007). En effet, il a été décrit que l' α - et le γ -tocotriénol, ainsi que l' α - et le γ -tocophérol sont des ligands de pregnane X récepteur (PXR), un récepteur nucléaire impliqué dans le métabolisme de xénobiotiques (Landes *et al.*, 2003).

L' α -T est également capable de moduler la synthèse endogène de cholestérol et d'oxystérols en modulant probablement le clivage des sterol response element binding proteins : SREBPs. Ces régulations géniques expliqueraient en grande partie les nombreux effets non antioxydants de la vitamine E. Il est important de souligner que les mécanismes moléculaires ne sont pas spécifiques à la vitamine E, celle-ci utilise des voies de signalisations communes à de nombreux autres modulateurs de l'expression génique (Landrier *et al.*, 2010).

La vitamine E augmente la production de la prostacycline, un puissant vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire par les cellules endothéliales. Son rôle sur l'élasticité de l'endothélium ainsi que dans le métabolisme des eicosanoïdes expliquent son effet favorable sur le processus athéromateux. Mais inversement, il peut expliquer certaines hémorragies cérébrales en particulier quand les doses sont trop importantes. C'est ainsi qu'en fonction du terrain et de la dose, les résultats des études peuvent être divergents (Ferry *et al.*, 2012).

3.4.2. Action pro-oxydante de la vitamine E

L'oxydation de l' α -T conduit à un radical α -T[•], 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 pro-oxydants

démontrés *in vitro* (Landrier et *al.*, 2010). Ce qui explique pourquoi les aliments contenant comparativement de faibles niveaux de vitamine E, mais aussi des co-antioxydants offrent des avantages pour la santé plus que les suppléments de vitamine E (Stocker, 1999).

Nitta et *al.*,(1991) ont rapportés que l'administration sous-cutanée chronique de l' α -T à des souris et des rats ont induit des tumeurs, ainsi que son administration orale continue chez la souris à augmenter significativement l'incidence du cancer du foie. En 2002, Rietjens et *al.* ont révélés une mortalité accrue résultant d'accident vasculaire cérébral hémorragique suite à la supplémentation en α -T.

In vitro des dommages oxydatifs de l'ADN sont induite en présence de Cu^{2+} , causée par la vitamine E cuivre dépendante qui médiée la formation des ERO (Yamashita et *al.*, 1998). Les tocophérols peuvent aussi *in vitro* réduire les ions métalliques (Mn^+) en ions ($\text{Mn}^{(+1)+}$) capables d'exercer une action prooxydante. Dans ce cas les tocophérols ne sont pas directement des pro-oxydants, ils réagissent plutôt de façon synergique en présence de pro-oxydants reconnus comme les métaux de transition sous forme ioniques, les lipides peroxydés. C'est pour cela qu'ils sont appelés co-pro-oxydants (Sayre et *al.* 2005).

Chapitre II: Matériel et méthodes

.1 Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. lieu de stage

Notre étude qui s'est étalée entre le mois de mars et le mois de juillet et qui consiste à réaliser une expérimentation animale au niveau de l'animalerie du Centre de recherche et de développement (Saidal/El-Harrach), afin de mettre en évidence les effets de la supplémentation de l' α -T à différentes doses sur le tissu cérébral du rat en croissance.

1.1.2. Animaux étudiés

L'expérimentation à été réalisée sur 16 rats mâles de souche Wistar âgés de trois semaines (Figure 09) avec un poids corporel qui varie entre 55 et 70 g, fournis par le centre d'élevage de l'Institut Pasteur d'Alger.

Les rats sont mis dans des cages individuelles 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. Les cages sont nettoyées et la litière changée une fois tout les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. L'eau de boisson est donné *ad libitum* dans des biberons adaptés aux cages.



Figure 09 : Expérimentation animal (photo original).

La température de l'animalerie était de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, un éclairage selon un rythme circadien 12 h jour /12h nuit et une hygrométrie de 35%).

Les rats ont été soumis à une phase d'adaptation d'une semaine environ, durant laquelle ils ont été nourris avec un régime standard sous forme de poudre. Tous les 3 ou 4 jours les rats ont été pesés.

1.1.3. Expérimentation

La vitamine E (α -T) a été administrée pendant 8 semaines à quatre groupes de quatre rats chacun :

- Groupe 1 : rats témoins nourris avec un régime standard (RS),
- Groupe 2 : rats nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 600 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment : RSE₆₀₀,
- Groupe 3 : rats nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 1200 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment : RSE₁₂₀₀,
- Groupe 4 : rats nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 1800 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment : RSE₁₈₀₀.

La période de 8 semaines devrait entraîner un changement au niveau des activités du système enzymatique antioxydant ainsi qu'au niveau du tissu cérébral.

1.1.4. Supplémentation de l'aliment

La nourriture a été fournie par l'Office National des Aliments de Bétail (ONAB), est apportée aux animaux sous forme de poudre dans des boîtes de Pétri (figure 10) à raison de 25g/jour/rat (figure 11), quantité recommandée (Jadot, 1981), et changée chaque jour. Les aliments sont préparés tous les 1 ou 2 jours par fraction de 166,66 g d'aliment et gardé à 4°C dans des boîtes hermétiques.

L' α -T est acheté en pharmacie sous le nom commercial "Vitamine E" sous forme de capsules de 100 mg (figure 12):

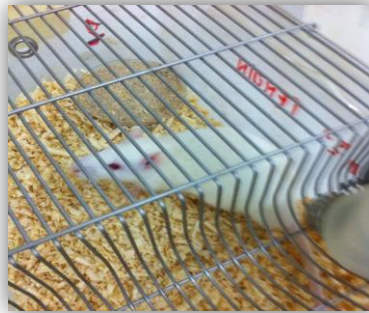


Figure 10: Aliments fournis aux rats sous forme de poudre (photo original).



Figure 11: Pesée de l'aliment des rats (photo original).



Figure 12: Vitamine E commerciale (photo original).

La teneur de l'aliment en différents constituants excepte l' α -T est semblable pour les quatre lots de rats (Annexe 01).

1.1.5. Sacrifice et prélèvement du cerveau :

A la fin de l'expérimentation (après 8 semaines), les rats de chaque lot sont pesés puis anesthésiés par l'éther éthylique après 12 heures de jeûne.

Le rat est placé sur sa partie ventrale dans la cuve à dissection. On coupe la peau à partir du nez jusqu'à l'arrière du cou, on tire sur la peau pour voir le crâne. Et on tient la tête par la peau avec le pouce et les doigts et à l'aide du scalpel placé à l'horizontale, on coupe lentement les os du crâne pour exposer le cerveau. Et on utilise les pinces pour retirer les petits fragments d'os.

Après la dissection, le cerveau est soigneusement prélevé, rincé avec une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9%, ensuite pesé. Un premier fragment du cerveau de chaque rats est conservé dans du formol à 10%, pour la réalisation des coupes histologiques. Un second fragment du cerveau est maintenu à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant (les protéines cérébraux, MDA et l'activité enzymatique de la catalase).

1.2. Matériel non biologique: (Annexe 02)

2. Méthodes

Le dosage des différents paramètres du stress oxydant (les protéines cérébraux, MDA et l'activité enzymatique de la CAT), ont été effectués au niveau du laboratoire central de biologie au CHU Frantz Fanon (Blida).

2.1. Dosage des protéines (Lowry et al., 1951)

A. Principe

Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry et al, (1951). C'est une mesure colorimétrique où l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu à une solution protéique donne une coloration bleue foncée. Cette coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. On réalise une gamme étalon de solution

d'albumine à 1mg/ml (Annexe 03), l'absorbance est mesurée à 750 nm après le développement de la couleur pendant 45 min à l'abri de la lumière.

B. Mode opératoire

a) Extraction des protéines

- 9ml d'une solution de triton X-100 (0.5%) sont mis dans un tube Potter en présence de 100 mg de l'échantillon du cerveau,
- l'échantillon est broyé par un broyeur homogénéisateur de Potter Thomas pendant 1min (figure 13),



Figure 13: Broyage des échantillons cérébraux à l'aide d'un broyeur homogénéiseur (photo original).

- 1ml de TCA à 1% est mis dans un tube en verre contenant 100 μ l de l'homogénat,
- centrifugation à 4000 tr/min pendant 15min,
- 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) Préparation des solutions de dosage

Solution A : préparée par mélange des trois solutions suivant:

- ◆ 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.

c) Dosage des protéines

- 1ml de la solution A 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,
- après 45 minutes, la densité optique à 750 nm est mesurée au spectrophotomètre contre l'eau bi-distillée (blanc).

d) 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 croissant de solution BSA (0-200µl), complétés avec de l'eau distillée (tableau I):

Tableau II: Gamme étalon réalisée à partir de la solution BSA:

	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (1 µg/µl)	0	10	25	50	75	100	150	200
H ₂ O (µl)	200	190	175	150	125	100	50	0
BSA (µl)	0	10	25	50	75	100	150	200

2.2. Dosage du malondialdéhyde (Draper, 1993)

A. Principe

Le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique. Après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit chromogène de couleur rose consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à 532 nm.

B. Mode Opératoire

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

- 100 mg de l'échantillon du cerveau sont broyés en présence de 9 ml de tampon phosphate KH₂PO₄ (0,2 M à pH=7,4),
- 1ml de TCA à 10 % sont mis dans un tube à essai, contenant 200 µl d'homogénat,
- le mélange est mis à ébullition dans un bain marie à 100°C pendant 30 min,
- après refroidissement, le mélange est versé dans des tubes secs et 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 selon l'équation suivante:

$$[MDA] = \frac{DO \times 22}{[Proteines]} \text{ [n moles/ mg de protéines]}$$

- ◆ [MDA]: Concentration en MDA en n moles/mg de protéines,
- ◆ DO : Densité optique lue à 532 nm,
- ◆ [Protéines] : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

2.3. Dosage de l'activité de la catalase (Aebi, 1984)

A. Principe

En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H₂O₂ en fonction du temps (Aebi, 1974).

B. Mode Opératoire

a) Préparation des solutions

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.

b) Lecture de la Densité Optique

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

	témoin (blanc)	essai
Solution I	1ml	/
Echantillon	2 ml	2ml
Solution II	/	1 ml

La lecture de l'absorption se fait à 240 nm durant 3 min. L'activité CAT est calculée selon l'équation suivant :

$$\text{Activité de la catalase}(\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min/mg prot}) = \frac{\frac{V}{v} \times 2,3 \times \log \frac{A_1}{A_2}}{X}$$

- ◆ V: volume de l'échantillon,
- ◆ v: volume total,
- ◆ Δt: temps de décomposition du H₂O₂,
- ◆ A1: absorbance à t₀,
- ◆ A2: absorbance à t_(3min),
- ◆ X : quantité des protéines mg/ml,

2.4. Réalisation des coupes Histologiques

Les coupes histologique du tissu cérébrale des différents lots ont été réalisés au niveau du laboratoire d'Anatomie pathologique, CHU Nafissa Hamoud - Ex: Hôpital Parnet, Hussein Dey. La technique utilisée est celle proposée par Martoja et Martoja., (1967) à l'hématoxyline/ éosine.

Les fragments du cerveau de chaque rat sont retirés du Formol 10 % et sont mis dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage des liquides.

▪ Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés par l'agitation rapide d'un automate spécial (figure 14) afin éliminer l'eau des tissus. Cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 90% et 100%).



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

▪ **Inclusion**

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenu et imbibés 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.

Les blocs sont mis sur une plaque métallique réfrigérée (figure 15) pour obtenir une solidification rapide.

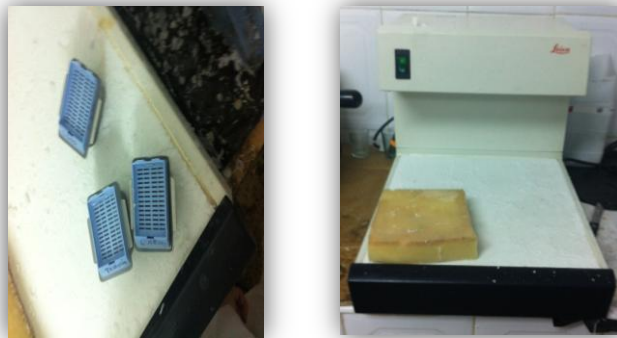


Figure 15: Module de refroidissement des blocs de paraffine (photo original).

▪ **Coupes et coloration**

Les blocs d'inclusions sont collés sur un porte-échantillon, les coupes sériées sont réalisées à l'aide d'un microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns). Ces coupes sont étalées et fixés sur des lames gélatineuses.

Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou HématoéineEosine) selon les étapes suivantes (figure 16):

- déparaffiner et hydrater les lames dans du xylène pendant 30 min et passage dans 3 bains d'alcool à concentration décroissante 100% -90% -70%, chaque un pendant 3min,
- lavage 1 min à l'eau du robinet,
- immerger 5 min dans un bain d'Hématoxyline de Groat, qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux),
- rinçage des lames 5 min à l'eau courante,
- immerger dans un bain d'Eosine (30 secondes) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme),
- déshydrations des lames dans 3 bains d'alcool à concentration croissante 70-95-100,
- mise en contacte lame-lamelle,
- observation au microscope photonique à Gr: *40 puis *100,
- prise de photos micrographiques.



Figure 16: la coloration Hématoxyline-Eosine (photo original).

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

1. Modifications physiologiques

1.1. Symptomatologie

Dans la présente étude nous avons observé chez les rats nourris avec un régime standard et supplémenté de 1200 et 1800 mg d' α -T des diarrhées, ce signe de toxicité à déjà été signalé par Abdo et *al.* (1986), lors de l'administration d'une dose importante de vitamine E (2000 mg/kg d'aliment) à des rats mâles; dans cette même étude ces auteurs ont par contre signalés la mort de sept des dix rats traités lors de cette expérimentation et ceci après une durée de 11 semaines. La mort à été attribuée à une hémorragie interne. Nous supposons que dans notre cas l'absence de mortalité est due au faite que la durée d'expérimentation n'était pas assez longue.

1.2. Effet de la supplémentation en α -tocophérol sur les paramètres pondéraux

A. Variation du poids corporel

Le suivi du poids corporel des rats témoins et ceux traités par différentes doses d' α -T a été réalisé tous les 3 ou 4 jours, (Figure 17 et Annexe 04):

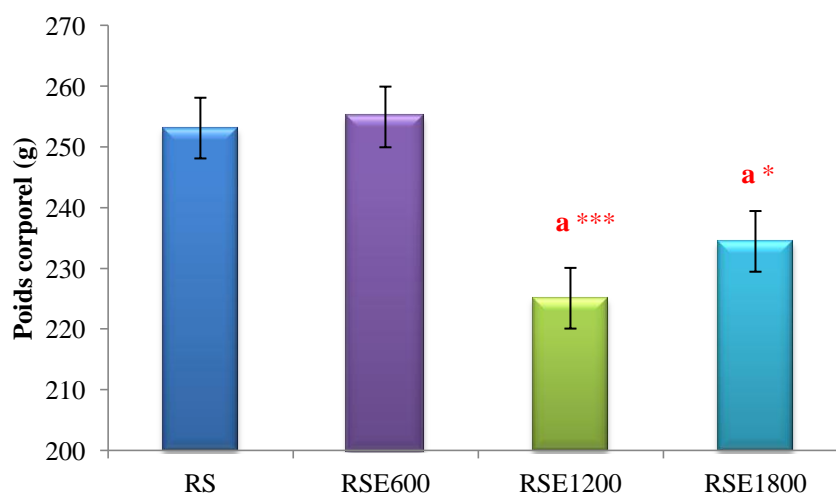


Figure 17: Variation du gain de poids corporel en gramme chez les rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités; a: comparaison avec le lot RS, b: comparaison avec le lot RSE₆₀₀, c: comparaison avec le lot RSE₁₂₀₀, d: comparaison avec le lot RSE₁₈₀₀).

Les résultats que nous avons obtenus lors du suivi du poids corporel des rats, ont été affectés par l' α -T. En effet, nous remarquons une augmentation non significative de la croissance des rats supplémentés en 600 mg d' α -T (RSE₆₀₀) par rapport au lot témoin (RS). En 1991, Asghar *et al.* ont réalisés une étude sur des porcs nourris d'un régime alimentaire supplémenté en α -T (100 et 200 UI), ceci a permis d'améliorer le taux de croissance respectivement de 4 et 6%, par rapport aux témoins.

D'après Garrido-Polonio *et al.* (2004), l'administration de 600 mg d' α -T/kg d'aliment prévient la perte de poids protégeant ainsi les organes contre les dommages causés par les radicaux libres, elle inhiberait la peroxydation des lipides membranaires en captant les radicaux peroxy lipidiques et par conséquent, elle est converti en radical α -tocopheroxyl.

Nekoubin *et al.* (2012), ont eux aussi obtenu une augmentation du poids corporel de angelfish (poissons ange de mer) nourris avec un régime supplémenté en vitamine E à niveaux croissants pendant 60 jours, d'ailleurs le meilleur résultat de la performance de croissance a été obtenu à 600 mg de vitamine E / kg par rapport au lot témoin.

En 2016, Muchlisin *et al.*, ont révélé également que le fait de supplémenter un régime alimentaire pendant 60 jours avec 600 mg d' α -T donne de meilleures performances par rapport au groupe témoin, entraînant une croissance plus importante chez des poissons (fingerlings).

D'autres recherches faites en 1986 par Abdo *et al.* ont montré que le poids corporel moyen chez les rats mâles traités par la vitamine E à une dose de 500 mg α -T /kg étaient semblables à ceux du groupes témoins. Trois années auparavant, Wheldon *et al.* avait aboutie à des résultats similaires, ces auteurs ont montré que pendant 2 ans, un régime alimentaire quotidien supplémenté à 500, 1000 ou 2000 mg d' α -T / kg d'aliment, chez des rats Charles River n'affecte pas leurs croissance comparativement aux témoins.

Concernant le lot RSE₁₂₀₀, nous avons obtenu une diminution significatif ($p < 0,001$) du poids corporel comparé au lot RS, et non significative par rapport au lot RS₆₀₀. En effet, dans notre étude l'administration de l' α -T à une dose de 1200 mg/ Kg d'aliment aux rats a provoqué une diminution du poids corporel. Ce résultat peut être

expliqué par la diminution des prises quotidiennes en aliment, ce qui suggère que l' α -T à cette dose (1200 mg/ Kg d'aliment) présente des effets néfastes sur la croissance corporelle du fait de la dégradation importante des lipides et des protéines. Notons que nos résultats corroborent avec ceux de Yang et Desai (1977), qui ont observés une diminution de 18% du poids corporel chez des rats femelles de souche Wistar nourris avec un régime supplémenté en 1300 UI d' α -T / kg de poids corporel / jour sur une période de 8 mois.

En 1983, Bieri et *al.*, ont rapporté qu'une forte consommation de vitamine E permettait de réduire l'absorption intestinale de la vitamine A, vitamine qui favorise la croissance.

Nos résultats ne corroborent pas par contre avec ceux d'Eder et *al.* (2002), ces auteurs ont montré que la croissance n'a pas été affectée chez des rats mâles Sprague-Dawley en croissance nourris avec des régimes supplémentés en 1000 mg d' α -T / kg d'aliment sur une période de 8 semaines.

Concernant, le poids corporel des rats supplémentés avec 1800 mg/Kg d'aliment (lot RSE₁₈₀₀), nous avons obtenu une augmentation non significative par rapport aux lot RSE₁₂₀₀ et lot RSE₆₀₀, avec une diminution significatif comparé au lot RS ($p < 0,05$). Nous constatons que l'augmentation de la croissance corporel à des doses élevés comme celle observée pour le lot RSE₁₈₀₀, est vraisemblablement due l'accumulation du radical α -T[•] aux niveaux des tissus et que ce radical n'a pas pu être régénéré suite à l'épuisement des agents réducteurs comme la vitamine C, de ce faite l' α -T[•] présente des effets pro-oxydants comme a été décrit par certains auteurs *in vitro* (Bowry et *al.*, 1992) et *in vivo* (Kontush et *al.*, 1996).

Cependant , McCuaig et Motzok (1970), ont constaté que la croissance des poussins nourris avec un régime équilibré et supplémenté à 10,000 IU α -T/kg d'aliment, n'a pas été affectée. Par contre une dépression de la croissance a été observée chez des poussins dont le régime alimentaire est supplémenté à 2,200 IU de vitamine E/kg pendant 50 jours (March et *al.*, 1975).

En outre Nockels et *al.* (1976), ont rapporté que le taux de supplémentation de la vitamine E variant de 8000 à 64 000 UI / kg de régime alimentaire pendant 5

semaines ont donné lieu à un poids corporel significativement réduite chez des poussins.

Yang et Desai (1977), ont également montré que le traitement de rats pendant 8 mois avec des doses importantes en vitamine E (2.500, 10.000 et 25.000 IU d' α -T/kg d'aliment) induisait une baisse significative de la croissance, et que cette baisse est également retrouvée après 16 mois de traitement.

En 1986, Abdo et *al.*, ont signalé également que la croissance des rats au niveau le plus élevé de la vitamine E testé (2000 mg/kg) ne diffère pas significativement de celle des témoins, ce qui suggère que la croissance est insensible à des doses élevées de vitamine E, ce qui ne corrobore pas avec nos résultats.

Selon Ortuño et *al.* (2000), aucune différence significative du taux en croissance n'a été observée chez la daurade royale (*Sparus aurata* L) après 45 jours entre les différents lots nourris d'un régime équilibré et supplémenté en doses croissantes en α -T (600, 1200 et 1800 mg de vitamine E/ kg du régime).

Eder et *al.* (2002), ont constaté eux aussi que la croissance n'a pas été affectée chez des rats mâles Sprague-Dawley en croissance nourris avec des régimes supplémentés en trois doses différentes de vitamine E (100, 1000 et 10 000 mg d' α -T/kg d'aliment) pendant 8 semaines.

Enfin Kiron et *al.* (2004), n'ont obtenu aucune différence du poids corporel chez des poissons alimentés avec des régimes supplémentés avec 1500 mg α -T/kg d'aliment.

B. Variation du poids cérébrale

La variation du poids du tissu cérébrale des rats témoins et traités par les différentes doses d' α -T, sont représentés dans la Figure 18 et Annexe 04.

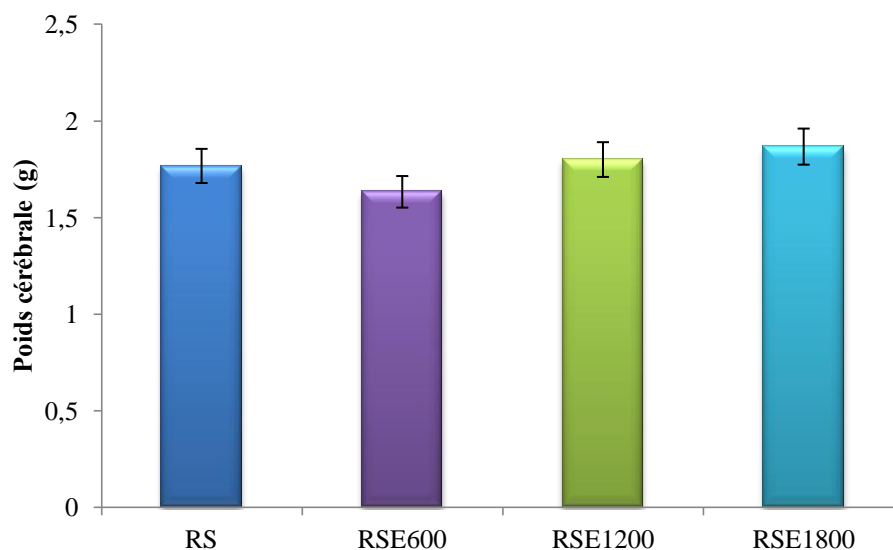


Figure 18: Evaluation des poids cérébrale chez les rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités).

L'étude du poids cérébrale révèle une diminution non significative chez le lot RS₆₀₀ par rapport au lot RS. Nous supposons que l'administration de 600 mg d' α -T/kg d'aliment protège le cerveau vis à vis des dommages causés par les radicaux libres et les produits réactifs de la lipopéroxydation. En outre, l' α -T inhibe la peroxydation des lipides membranaires en captant les radicaux peroxy lipidiques (Kleme et Levy, 2015).

En 2010, Nascimento et *al.* ont montré que l'administration de 250 mg/Kg de rat/jour d' α -T sur une période de 7 semaines chez des rats Wistar adultes induisait la diminution du poids du tissu cardiaque comparé à celui du témoin.

Ainsi chez le lot RSE₁₂₀₀, on a enregistré une augmentation non significative du poids cérébrale comparé aux lot RS₆₀₀ et RS; on note également une augmentation non significative du poids cérébrale du lot RSE₁₈₀₀ par rapport aux lots RSE₁₂₀₀, RSE₆₀₀ et RS; ceci peut être expliqué par l'accumulation du radical α -T \bullet et des ERO dans le cerveau conduisant à l'hypertrophie cérébrale du lot RSE₁₈₀₀, l'accumulation est plus élevée vue que la dose est augmentée par rapport au lot RSE₁₂₀₀. Ce résultat corrobore avec ceux de Hill et Hamed, 1960, qui ont étudié les effets indésirables des hypervitaminoses E chez les animaux après administration d'environ 1 g d' α -T/kg de poids corporel. L'hypervitaminose E a diminué le poids du thymus et a augmenté le

poids des surrénales chez les rats et provoqué une dégénérescence des glandes surrénales et l'inhibition de la croissance des poulets

Cependant Yang et Desai (1977), ont montré que le traitement de rats pendant 8 mois avec des doses importantes en vitamine E (2.500, 10.000 et 25.000 IU d' α -T/kg d'aliment) induisait une baisse du poids du cœur et de la rate, ils expliquent cette baisse par la perte de poids corporel des rats.

Par contre, en 1983, Wheldon *et al.*, ont remarqué que le poids relatif du foie a significativement augmenté avec 1000 mg d' α -acétate de tocophéryl /kg de poids corporel / jour chez seulement les rats femelles.

Enfin Abdo *et al.* (1986), ont observé une hypertrophie du foie chez des rats femelles nourris avec un régime supplémenté avec 500 et 2000 mg d' α -T/ kg, indiqué par une augmentation significative du poids du foie, mais aucune modification histopathologique n'a été observée.

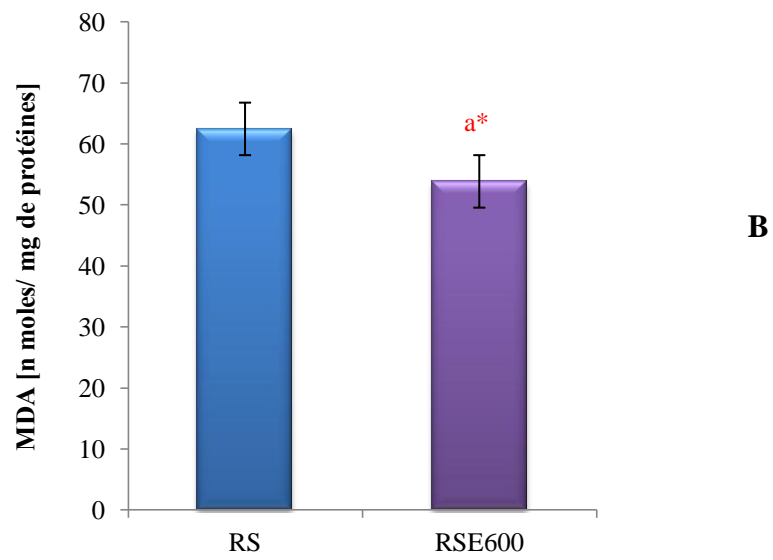
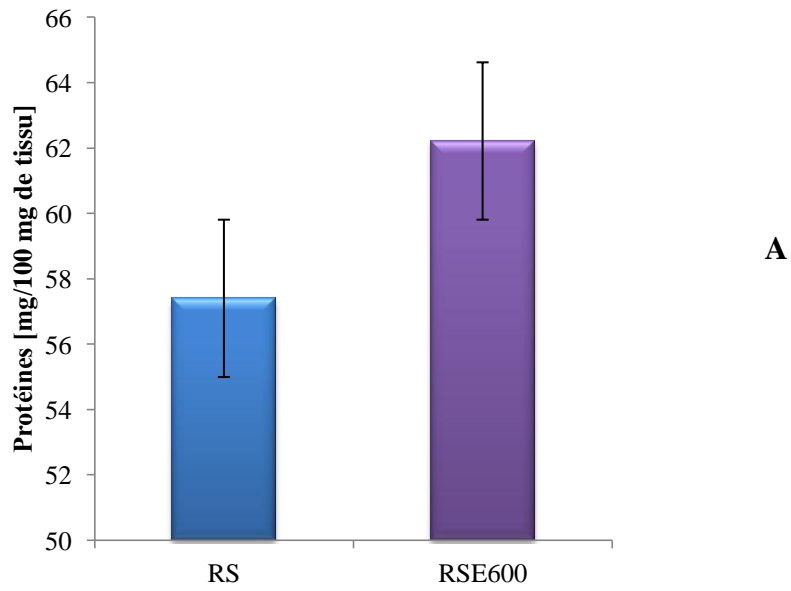
2. Effet de la supplémentation en α -T sur quelques paramètres du stress oxydant

2.1. Effets des différents régimes sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale

Les résultats obtenus lors de la mesure de quelques paramètres intervenant au cours du stress oxydatif, à savoir les protéines, le MDA et la CAT, ont montré des variations de la concentration des protéines cérébrales, du MDA, et de l'activité enzymatique de la CAT (Annexe 05) chez les rats témoins et ceux traités par différentes doses d' α -T.

A. Effets de la supplémentation en 600 mg d' α -T/kg d'aliment sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale

Concernant les résultats obtenus lors du dosage de quelques paramètres du stress oxydatif, ils révèlent une augmentation non significative du taux en protéines (figure 19.A), accompagnée d'une diminution significatif du MDA ($p < 0,05$) (figure 19.B), parallèlement nous avons notés une diminution non significative de l'activité de la CAT du lot RSE₆₀₀ par rapport au RS (figure 19.C).



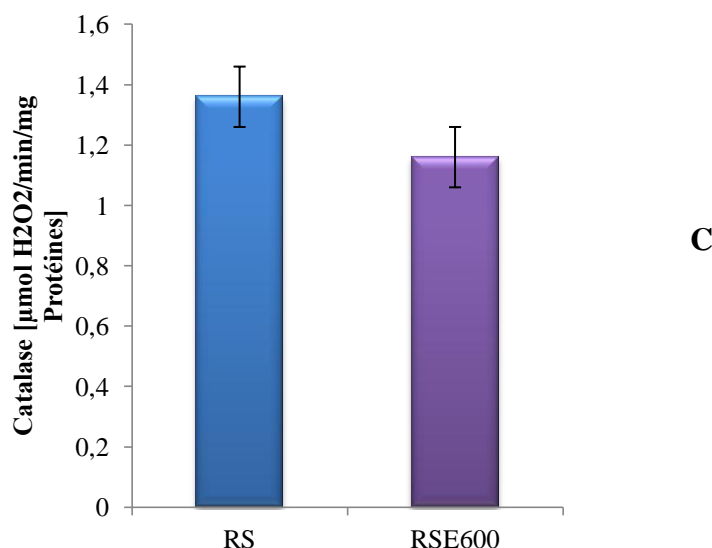


Figure 19. (A à C): Effet de la supplémentation en 600 mg d' α -T/kg d'aliments: RSE₆₀₀, sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale chez des rats en croissance, par rapport aux lots RS. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités; **a**: comparaison avec le lot RS, **b**: comparaison avec le lot RSE₆₀₀, **c**: comparaison avec le lot RSE₁₂₀₀).

L'augmentation non significative des protéines que nous avons obtenu est due probablement aux effets protecteurs de l' α -T, qui ont permis de diminuer l'oxydation des protéines cérébrales. Déjà en 1954, Tappel, a montré des changements *in vivo* des protéines catalytiques et structurales dus à une carence en vitamine E, ces changements résultent directement de la réaction des produits d'oxydation des AGPI avec les protéines.

En 1977, Csallany et *al.* ont observé qu'après 8 semaines de régime carencé en vitamine E chez des souris, le taux en lipofuscine hépatique est significativement plus élevé chez les témoins que chez les lots supplémentés en vitamine E, déduisant que cette vitamine a un rôle protecteur vis-à-vis des radicaux libres lors d'un stress oxydatif.

Des observations réalisées par Wartanowicz et *al.* en 1984 de 100 sujets humains sains âgés de plus de 60 ans, recevant 200mg de vitamine E sous forme de comprimés sur une durée d'une année, ont révélé une diminution du niveau des peroxydes lipidiques dans le sérum.

En 1988, Niki *et al.* ont étudié les phénomènes d'oxydation des érythrocytes et ont mis en évidence que lors de l'attaque radicalaire, l' α -T positionné au niveau de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire agissait majoritairement sur ces molécules réactives.

Selon Bowry et Stocker (1993), l' α -T est biologiquement et chimiquement la forme la plus active de la vitamine E, qui doit son effet biologique à sa fonction antioxydant liposoluble, en neutralisant la majorité des radicaux libres. C'est ainsi que l'étude menée par Wagner (1996), *in vivo* a montré qu'en présence d'un stress oxydatif puissant, le taux d'oxydation des lipides cellulaires été ralenti par la vitamine E.

De même Barja *et al.* (1996), ont observé que chez des cobayes nourris avec un régime dont le taux en vitamine E était faible pendant 5 semaines, induisait une élévation significative des lipopéroxydes hépatiques; par contre une teneur optimale en vitamine E permettait une diminution considérable en TBA-RS.

En 2000, Léger a confirmé que la fonction antioxydante de la vitamine E permet d'éviter l'oxydation des structures auxquelles elle se trouve associée, et de protéger ainsi non seulement le caractère essentiel des AGPI, mais aussi l'intégrité de la structure des protéines et des nucléotides.

Kadium *et al.* (2015) ont montré que la supplémentation en vitamine E pourrait inverser significativement les dommages oxydatifs en diminuant les dommages des protéines telles que la carbonylation / nitration ainsi que la coupure des brins d'ADN au niveau du cerveau et du foie de poulet.

Nos résultats ont également montré une baisse significative du taux en MDA cérébrale et une diminution non significative de l'activité de la CAT par rapport au RS, due au fait que la vitamine E protège *in vivo* les structures sensibles à l'oxydation: les lipides dans les membranes et les lipoprotéines, les protéines et les bases nucléotidiques des brins d'ADN en neutralisant les ERO.

Selon Pryor (2000), l' α -T est capable de protéger contre la peroxydation des lipides par l'activité de piégeage de l'oxygène, en neutralisant la peroxydation lipidique et les lipides membranaires insaturés.

Bozkurt (2002), a signalé que les teneurs en MDA sont diminuées dans le sang et le muscle squelettique des rats ischémiques après traitement avec l' α -T.

Dans une autre étude, réalisée en 2003 par Flora et *al.*, ces derniers ont rapporté des taux réduits en TBA-RS (Thiobarbituric acid reactive substances) chez des rats exposés à 0,1% d'acétate de plomb par voie orale pendant 3 mois et puis traités 5 jours consécutifs avec l' α -T administré par voie intramusculaire à une dose de 5 mg / kg de poids corporel par jours.

McAnulty et *al.* (2005), ont montré que l'administration de 100 mg d' α -T / kg par jour à des rats arthritiques, à diminué de manière significative les taux d'homocystéine sérique, expliquant que la vitamine E pourrait indirectement affecter le métabolisme de l'homocystéine en réduisant le stress oxydatif et prévenir ainsi la destruction oxydante de l'acide folique, impliqué dans la reméthylation de l'homocystéine.

En 2008, Polat et *al.*, révèlent que l'administration de 10 mg d' α -T / kg par voie intra-péritonéale chez un groupe de rats mâles Sprague Dawley ischémiques à entraîné des réductions significatives des taux de MDA mais une augmentation significative des niveaux de la CAT hépatique par rapport au groupe de contrôle. Ce qui ne concorde pas avec nos résultats concernant les niveaux de la CAT cérébrale.

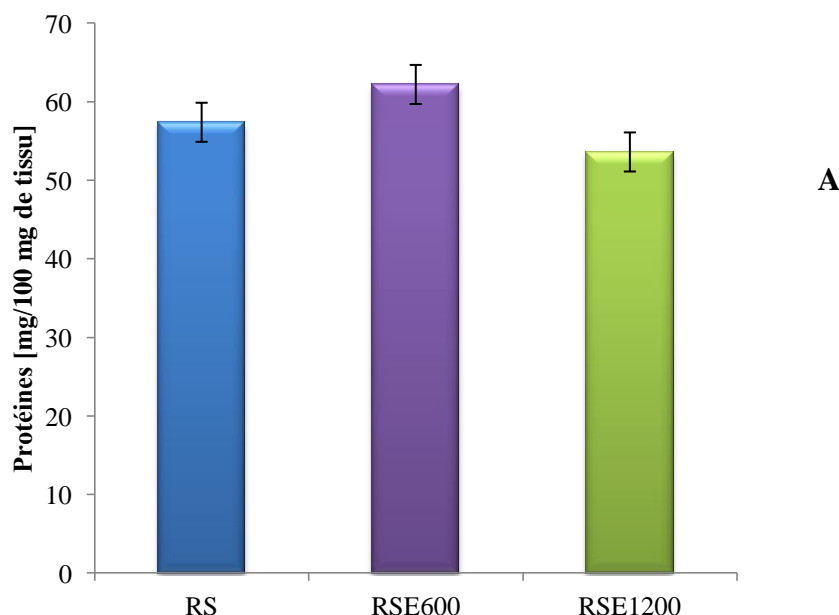
Le traitement de rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley par administration intramusculaire bihebdomadaire de 100 et 300 mg/kg d' α -T sur des périodes de 2, 3 et 6 semaines, ont montré une diminution de la teneur en lipoperoxydes, mais sans changements significatifs de l'activité enzymatique de CAT (Hajiani et *al.*, 2008).

De même, Das et *al.* (2015), ont montré également une diminution du MDA érythrocytaire suite à l'administration de l' α -T (10 mg / 100 g de poids corporel) par voie intramusculaire à des rats intoxiqués par l'acétate de plomb (25 mg / kg poids corporel). Durant la même année, Elgaml et *al.* ont rapporté que l' α -T était capable de protéger les reins contre la toxicité de l'acétate de plomb, et cela a été prouvé par la réduction du taux de MDA élevé.

Nous pouvons conclure à l'issu des résultats que la supplémentation en 600 mg d' α -T / Kg d'un régime équilibré a protégé les protéines ainsi que l'activité de la CAT en diminuant le taux en MDA; il a été d'ailleurs rapporté lors de l'étude réalisée par Abd El-Rahman (2016), que l'administration de la vitamine E entraîne une diminution significative du taux en MDA et une augmentation de la CAT, GPx, et la SOD.

B. Effets de la supplémentation en 1200 mg d' α -T/kg d'aliment sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale

Chez les rats supplémentés en 1200 mg d' α -T/Kg d'aliment (Lot RSE₁₂₀₀), nous avons obtenu un déséquilibre de la balance oxydante / anti-oxydante au niveau du tissu cérébrale; ce déséquilibre est marqué par une baisse non significative de la concentration en protéines par rapport aux lots RS et RSE₆₀₀ (figure 20. A), une élévation non significative du taux en MDA par rapport au lot RS et hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au lot RSE₆₀₀ (figure 20. B) et une baisse significative ($p < 0,05$) de l'activité enzymatique de la CAT comparé au lot RS et hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au lot RSE₁₂₀₀ (figure 20. C).



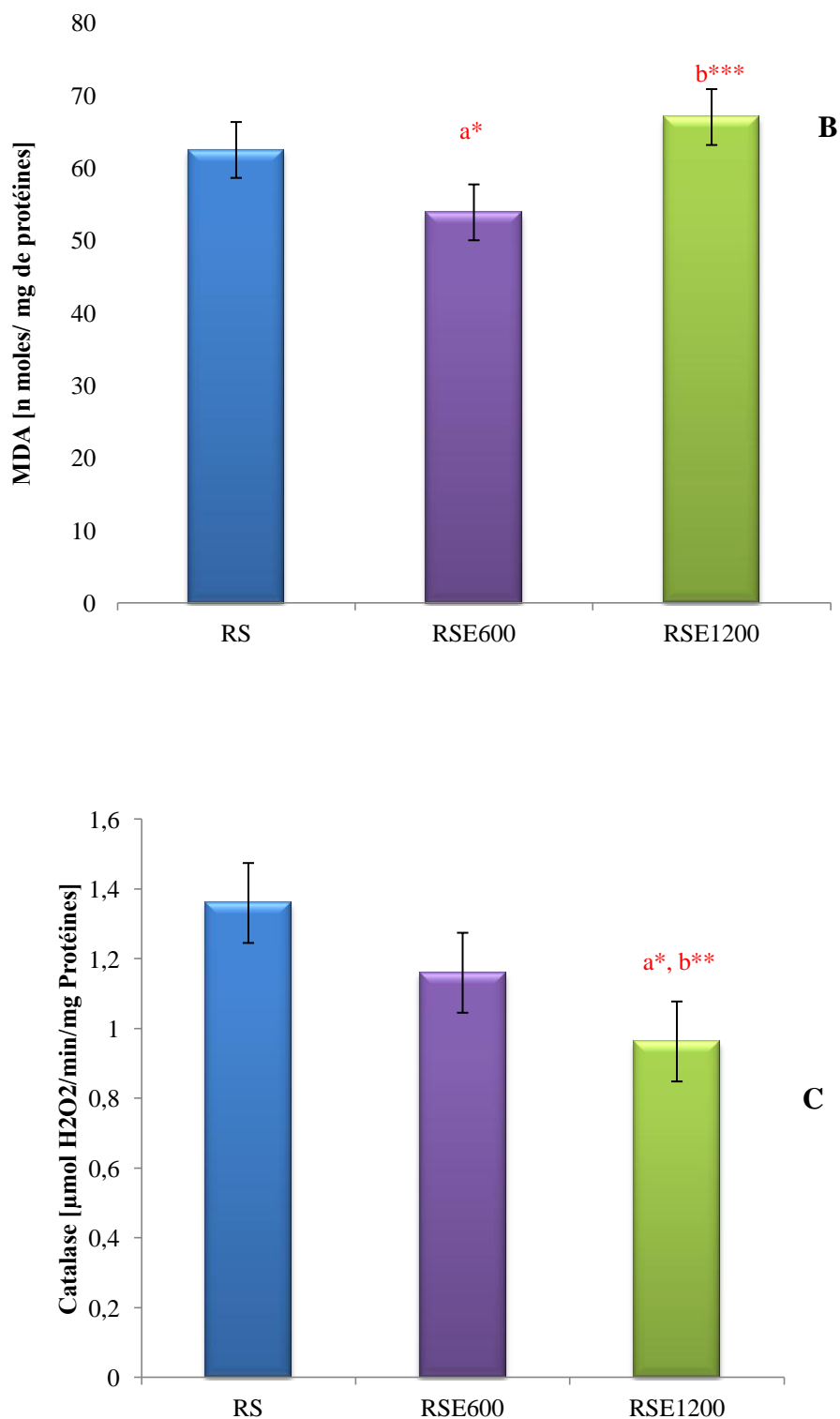


Figure 20. (A à C): Effet de la supplémentation en 1200 mg d' α -T/kg d'aliments: RS₁₂₀₀, sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale chez les rats en croissance, par rapport aux lots RS et RSE₆₀₀. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 entre témoin et groupe traités; a: comparaison avec le lot RS, b: comparaison avec le lot RSE₆₀₀, c: comparaison avec le lot RSE₁₂₀₀).

Il est connu que les protéines sont des cibles importantes des dommages oxydatifs médiés par les ROS, ce qui explique la baisse protéique obtenue, même si celle-ci n'est pas significative, ce résultat suggère un effet pro-oxydant de la vitamine E à la dose de 1200 mg d' α -T/kg d'aliment vis à vis des protéines. Selon Robbins et Kumar (1994), l'oxydation accrue des protéines dans le cerveau peut être due à la diminution de GSH qui protège contre l'oxydation, la dénaturation et la précipitation des protéines.

Un nombre important d'auteurs ont montré le lien entre une dose importante de vitamine E et les paramètres oxydants et antioxydants cellulaires, effectivement Wissam et *al.* (1997), ont remarqué que la vitamine E a un effet significatif sur les niveaux hépatiques de produits d'oxydation chez des souris Swiss-Webster, le foie du groupe alimenté avec de l'huile de poisson et ne recevant pas la vitamine E avait des niveaux significativement plus élevés de TBA-RS, de diènes conjuguées et de protéines carbonylées que ceux du groupe supplémenté avec 1 g *dl* d'acétate- α -tocophérol; d'ailleurs Sharma et *al.* (1999), ont eux aussi obtenu une élévation des radicaux libres et ont expliqué ce fait par la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx): enzymes protégeant les tissus de la peroxydation lipidique; mais qu'en présence de la vitamine E et en une concentration adéquate, celle-ci permettait la prévention de la production de radicaux libres et donc protégeait ces enzymes antioxydantes.

D'autres recherches ont annoncé que les résultats les plus fréquents de modifications oxydatives des protéines sont une diminution de l'activité enzymatique, une stabilité plus faible face à la chaleur, une hydrophobicité augmentée et une susceptibilité plus forte à la dégradation protéolytique (Stadtman et Levine, 2000).

En 2005, Tezel et *al.*, ont, quand eux, travaillé sur les modifications oxydatives importantes au niveau des protéines de la rétine, et ont déduit que ces modifications étaient l'une des conséquences de la génération de radicaux libres dans le modèle de glaucome chez le rat. Dans cette même étude, ces auteurs ont annoncé que l'oxydation protéique a été décrite comme l'un des mécanismes les plus importants dans les lésions cérébrales responsables de dysfonctionnement dans plusieurs maladies neurodégénératives, y compris la maladie d'Alzheimer.

Certains auteurs comme Stocker et Keaney, (2004), explique que si le MDA, est produit en excès dans un tissu, celui-ci 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. Notons que les résultats obtenus par ces auteurs sont similaires aux nôtres à savoir l'augmentation du taux en MDA accompagnée de la diminution de la teneur en protéine pour le lot RS₁₂₀₀.

Esteves et *al.* suggèrent en 2005, que la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines sont directement liés puisque les mécanismes et les voies de réaction sont affectés par les mêmes pro-oxydants et antioxydants.

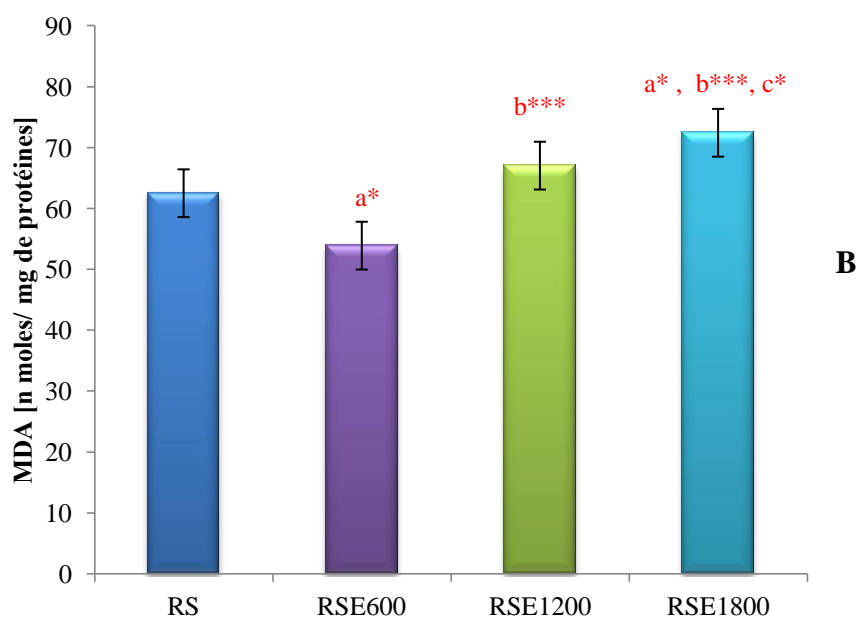
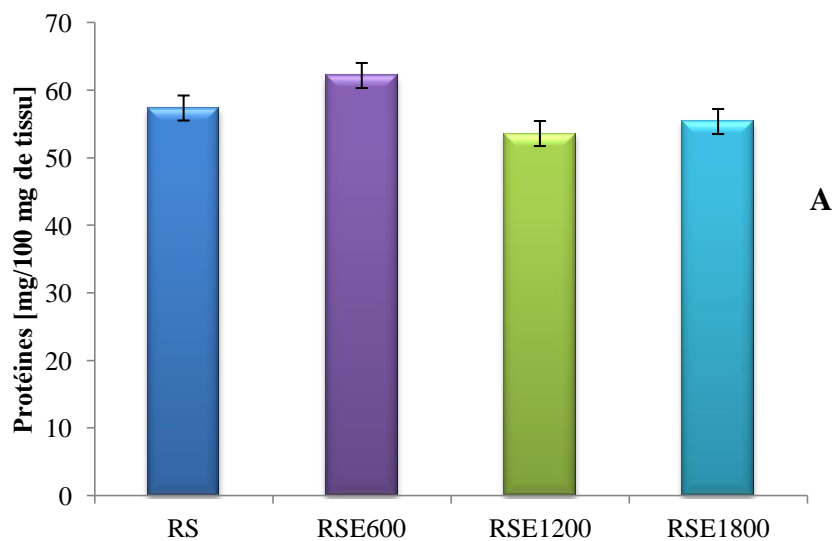
Lors d'un stress oxydatif, la CAT réagit de deux façons différentes lors d'un stress oxydatif intense; elle est soit stimulée et son activité se voit augmenter, ou alors, inhibée et au contraire son activité diminue. Des études plus précises, touchant à l'effet du radical $\bullet\text{OH}$ généré *in vivo* lors de la décomposition de H_2O_2 , qui peut endommager les protéines hépatiques et donc inactiver certaines enzymes comme les enzymes anti-oxydantes (CAT et GPx) et de ce fait, augmenter les niveaux hépatiques des protéines carbonylées (Emel et Saadet, 2007).

En finalité, nous pouvons conclure que l' α -T à une dose de 1200 mg/kg d'aliment a eu un effet négatif sur la balance oxydant/antioxydant du tissu cérébrale, du fait de l'augmentation du taux en MDA et la diminution de l'activité de la CAT et probablement d'autres enzymes non dosées dans la présente étude, telles que la SOD et la GPx, l'étude réalisée en 2013 par Ferreira et *al.* explique que la baisse de la capacité antioxydante à un lien direct avec l'augmentation des processus d'oxydation.

C. Effets de la supplémentation avec 1800 mg d' α -T/kg d'aliment sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale

Les résultats que nous avons obtenu lors du dosage de la variation de quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif (MDA, CAT et protéines) des rats supplémentés en 1800 mg d' α -T/Kg d'aliment (lot RSE₁₈₀₀), montrent une baisse non significative de la concentration en protéines par rapport aux lots RS, RSE₆₀₀ et RSE₁₂₀₀ (Figure 21.A), accompagnée d'une élévation significative ($p < 0,05$) du taux en MDA comparée aux lots RS et RSE₁₂₀₀, et hautement significative ($p < 0,001$) par

rapport au lot RSE₆₀₀ (Figure 21.B), nous avons également noté une baisse significative ($p < 0,05$) de l'activité enzymatique de la CAT comparée au lot RS et très significative ($p < 0,01$) par rapport au lot RSE₆₀₀ (Figure 21.C).



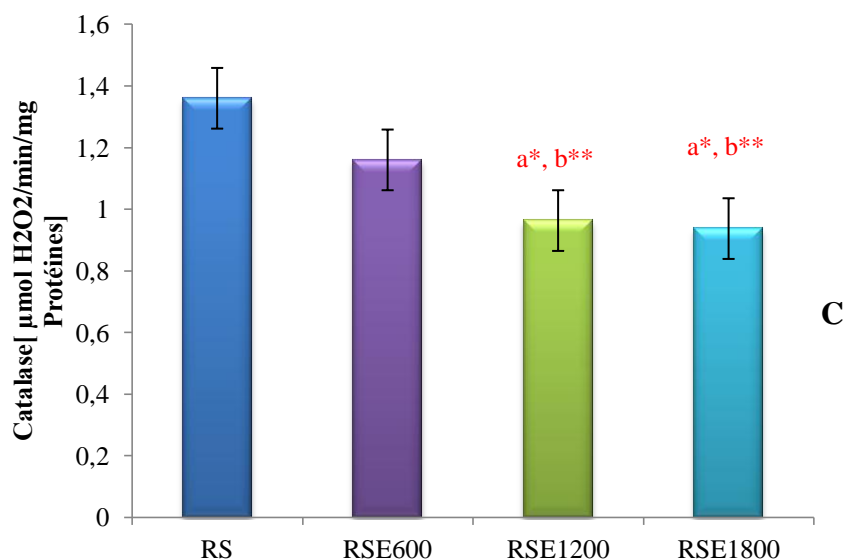


Figure 21. (A à C): Effet de la supplémentation par 1800 mg d' α -T/kg d'aliments: RS₁₂₈₀, sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cérébrale chez les rats en croissance par rapport aux témoins: RS, le lot RSE₆₀₀ et RSE₁₈₀₀. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités; **a**: comparaison avec le lot RS, **b**: comparaison avec le lot RSE₆₀₀, **c**: comparaison avec le lot RSE₁₂₀₀).

Il est connu que lors d'un stress oxydatif sévère, l' α -T génère une quantité élevée en radical α -T[•], ce dernier va se combiner avec un autre radical libre formant ainsi un « produit non radicalaire », d'où l'interruption de la réaction en chaîne de la lipoperoxydation. Alors que lors d'un stress oxydatif modéré, la concentration de radicaux libres n'est pas importante au point où l'ensemble des radicaux α -T[•] produits lors du processus 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 ya apparition de l'effet pro-oxydant de l' α -T car le radical α -T[•] va arracher un électron aux acides gras des phospholipides des membranes et donc propager la réaction en chaîne de la lipoperoxydation, si au contraire la concentration de l'acide ascorbique est adéquate par rapport à la concentration de l' α -T supplémentée, dans ce cas là, nous aurons un effet antioxydant, car l'ensemble des radicaux α -T[•] générés lors de l'effet antioxydant de l' α -T, ont pu être régénérés par l'acide ascorbique.

En 1975, Dymsha et Park, ont traité des rats sevrés avec un régime supplémenté en 35 000 mg/kg d'aliment; après 8 semaines, ces auteurs ont obtenu une baisse significative de la teneur en protéines de ces rats par rapport aux témoins. Ils concluent qu'à court terme, une telle dose est préjudiciable aux rats. Il a d'ailleurs été rapporté que la vitamine E agit comme pro-oxydant en induisant la baisse de l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD, GPx et CAT), aboutissant par conséquent à l'augmentation de la peroxydation lipidique (Bowry et *al.*, 1992), ainsi la capacité qu'a l' α -T en tant que piègeur de radicaux libres est dépendante de la dose (Wagner et *al.*, 1996). D'ailleurs en 2003, Giray énonce que l'efficacité de la vitamine E est dépendante de la durée du traitement ainsi que de la dose administrée.

En 1996, Kontush et *al.* ont montré que dans les états d'oxydation modérée et en l'absence d'autres co-antioxydants tels que l'ascorbate, 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*. Ils ont postulé que dans les circonstances mentionnées ci-dessus, le radical α -T \bullet ne pouvait pas former des composés stables en se combinant avec un autre radical libre ou en faisant don d'un électron libre à un autre antioxydant. Par conséquent, elle interagit avec d'autres macromolécules telles que des lipides, ce qui génère plus de radicaux libres.

Selon Azzi et Stocker (2000) et Hisar et *al.* (2003), une supplémentation importante en vitamine E induit une activité pro-oxidante sur la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la protéine kinase C.

Nos résultats corroborent avec ceux d'Hajjani et *al.* (2008), qui ont réalisé une étude qui avait pour objectif d'examiner l'effet pro-oxydant de la vitamine E face à son effet antioxydant et ceci en fonction du temps et de la dose en vitamine E sur des rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley par administration intramusculaire bihebdomadaire de 100, 300 et 600 mg / kg de vitamine E sur des périodes de 2, 4 et 6 semaines. Ils ont observé que la vitamine E a un effet antioxydant quand elle est administrée à de faibles doses et sur des périodes courtes et permet l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. Par contre à fortes doses et sur des périodes assez longues, la teneur en MDA augmente accompagnée d'une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes. Ils émettent l'hypothèse que la vitamine E régule les enzymes antioxydantes par un effet chimique direct. Ces auteurs expliquent

cette régulation que au niveau de la membrane cellulaire, le groupement phénolique OH de l' α -T dans l'interface membrane-eau, réagit ainsi avec des molécules hydrosolubles comme l'ascorbate. Donc il est théoriquement possible que la vitamine E exerce un effet dose dépendant sur les enzymes antioxydantes.

A l'issue de ce traitement (1800 mg d' α -T/Kg d'aliment) et sur une période de 8 semaines, nous avons obtenu un effet pro-oxydant de l' α -T, démontré par la baisse de l'activité de la CAT et de la teneur en protéines mais également par l'élévation du taux en MDA. L'augmentation de la concentration du radical α -T \bullet a propagé la peroxydation lipidique, ceci s'est traduit par l'augmentation de la teneur en MDA, 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, un stress modéré s'est installé.

3. Effet de la supplémentation en α -T à différentes doses sur l'histologie du tissu cérébral

L'examen histologique des différents lots traités montre pour les lots RS (Fig 21. a) et RSE₆₀₀ (Fig 21. b), un parenchyme cérébral à aspect normal contenant des neurones pyramidaux au niveau du cortex cérébral et présentant de petits noyaux ronds qui leurs sont associés, connus comme des cellules satellites nommées oligodendrocytes de la matière grise; ces observations suggèrent des propriétés antioxydantes de l' α -T à une dose modérée. En effet, selon Ferry et *al.*, (2012), la vitamine E est l'un des antioxydants les plus puissants, elle protège les membranes cellulaires des effets de la peroxydation, elle a donc un rôle de stabilisateur des membranes, y compris les membranes neuronales. Elle 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 la vitamine E a la capacité d'éviter l'apparition de 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).

La fonction antioxydante de la vitamine E permet d'éviter l'oxydation des structures auxquelles elle se trouve associée, de protéger ainsi non seulement le

caractère essentiel des AGPI, mais aussi l'intégrité de la structure des protéines et des nucléotides (Léger, 2000). De plus elle a un rôle dans la relaxation des vaisseaux sanguins et elle empêche l'agrégation des plaquettes (Verhagen et *al.*, 2006)

Concernant l'histologie du tissu cérébral du lot RSE₁₂₀₀, celui-ci révèle la présence d'un œdème avec une importante congestion siégeant en périphérie du parenchyme cérébral avec distension des deux feuillets méninges (la dure-mère et la pie-mère) (Fig 22. a, b) et la présence également d'un amas de cellules lymphocytaires (Fig 23. a, b); en revanche, les coupes histologiques obtenues du tissu cérébral des rats supplémentés avec 1800 mg d' α -T / kg d'aliment (lot RSE₁₈₀₀) (Fig 24. a et b), montrent la présence d'un foyer nécrotique avec densification et de dystrophie neuronales (Fig 25. a, b) ce qui indique que l' α -T a eu des effets néfastes à des doses de 1200 et 1800 mg d' α -T / kg d'aliment. En 2008, Defraigne et Pincemail, ont montré que les antioxydants comme la vitamine C ou E se transforment eux-mêmes en radicaux libres lors de la neutralisation de certains dérivés toxiques de l'oxygène. Ainsi, 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. De même, en 2012, Ferry et *al.* expliquent que si la teneur membranaire en vitamine E était faible par rapport aux lipides et à la production des radicaux libres, seule l'existence d'un renouvellement rapide de l' α -T permet son efficacité; ce qui participe probablement au rôle pro-oxydant. Ainsi l'étude faite par Robert et *al.*, (2007), a montré que la prise de suppléments de vitamine E augmente légèrement le risque des hémorragies cérébrales.

La présence de zones nécrosées, suggèrent l'effet pro-oxydant de l' α -T causant ainsi des dommages importants au niveau du cerveau. Le principal site des dommages des radicaux libres dans les cellules cérébrales sont les mitochondries; en effet, selon Singal et *al.*, (1983), l'attaque extensive des radicaux libres contribue aux dommages de l'ADN dans les mitochondries qui ne peuvent plus fonctionner d'une manière normale ce qui induit la mort cellulaire.

En 2010, Nascimento et *al.*, ont étudié 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 1000 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 ainsi que la présence d'œdèmes. Ces auteurs déduisent qu'une telle dose d' α -T induit une cardiotoxicité chez les rats wistar sains traduite par des changements au niveau du tissu cardiaque accompagnés de nécrose des cardiomyocytes. Ils rapportent également que les effets néfastes obtenus dans cette étude sont dues à des doses non physiologiques d' α -T. Ainsi la fonction antioxydante de l' α -T dépend des conditions du stress (modérées ou fortes) et la présence de co-antioxydants. En effet Upston et *al.*, 1999, ont montré que l'augmentation de la concentration en α -T aboutit à l'augmentation des radicaux α -T qui peuvent amorcer la cascade de peroxydation lipidique. Quand le système antioxydant est équilibré, cette action pro-oxydante de l' α -T est inhibée par les co-antioxydants. Cependant, les concentrations élevées d' α -T, ne peuvent plus être efficacement désintoxiquées par les co-antioxydants (Stocker, 1999). C'est ce mécanisme cité par Stocker qui a été observé dans la présente étude, d'où une toxicité plus importante chez le groupe RSE₁₈₀₀ que chez le groupe RSE₁₂₀₀.

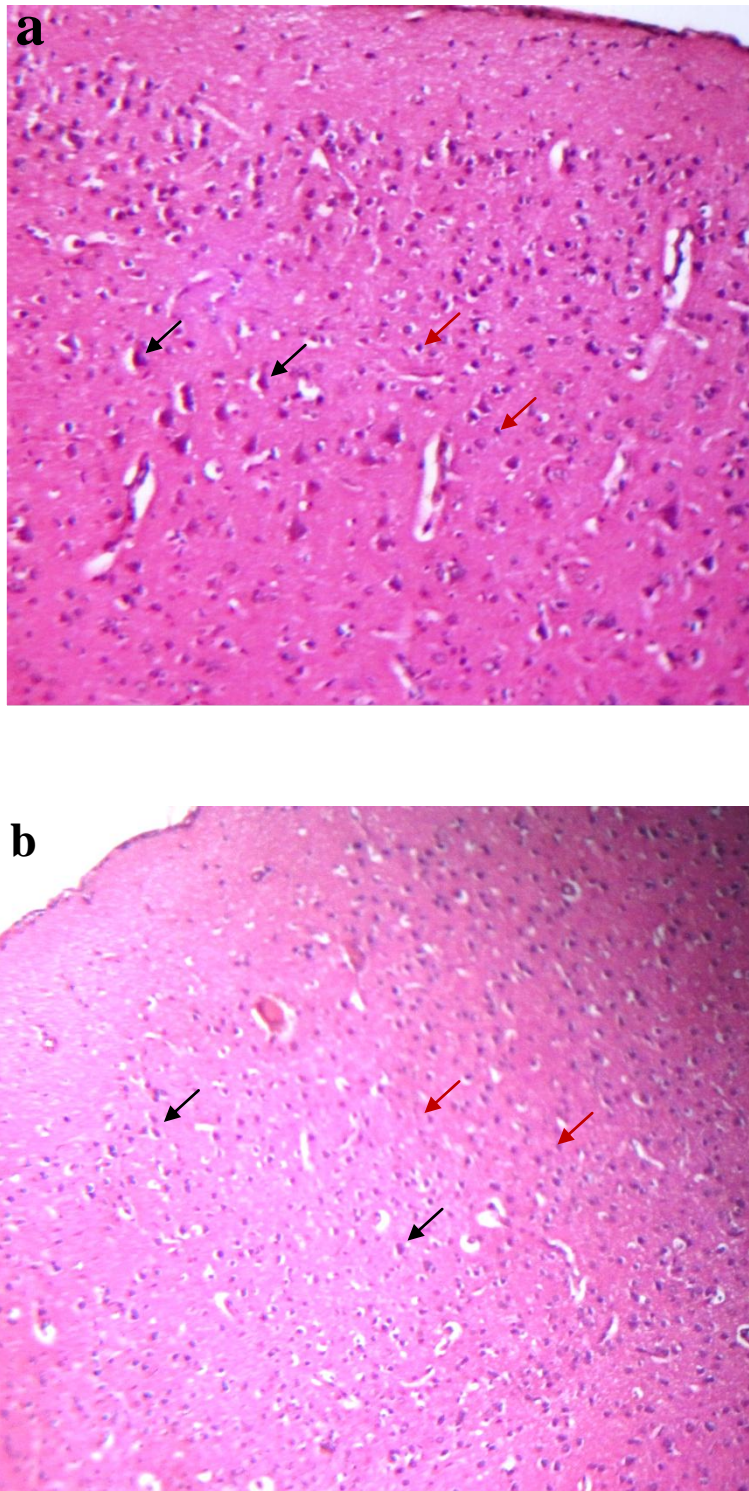


Figure 21 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale (10×, *H&E*) montrant: (a) architecture normal chez le lot “témoin” : RS, et (b) chez rats supplémentés avec 600 mg d’ α -T / kg d’aliment: RSE₆₀₀. flèche noire: neurone pyramidale, flèche rouge: oligodendrocytes.

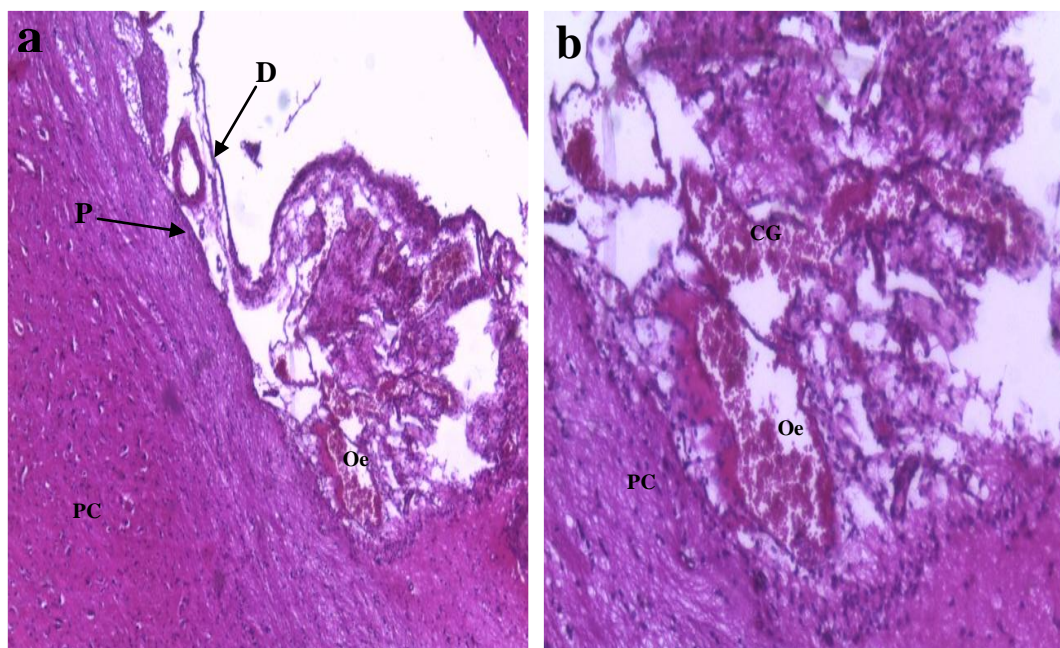


Figure 22 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE₁₂₀₀, montrant la présence d'un œdème avec une congestion en périphérie du parenchyme cérébrale avec distension des deux feuillets méninges (la dure-mère et la pie-mère); (a): (10×, *H&E*), (b): (40×, *H&E*). PC: parenchyme cérébrale, D: dure-mère, P: pie-mère, Oe: œdèmes, CG: congestion.

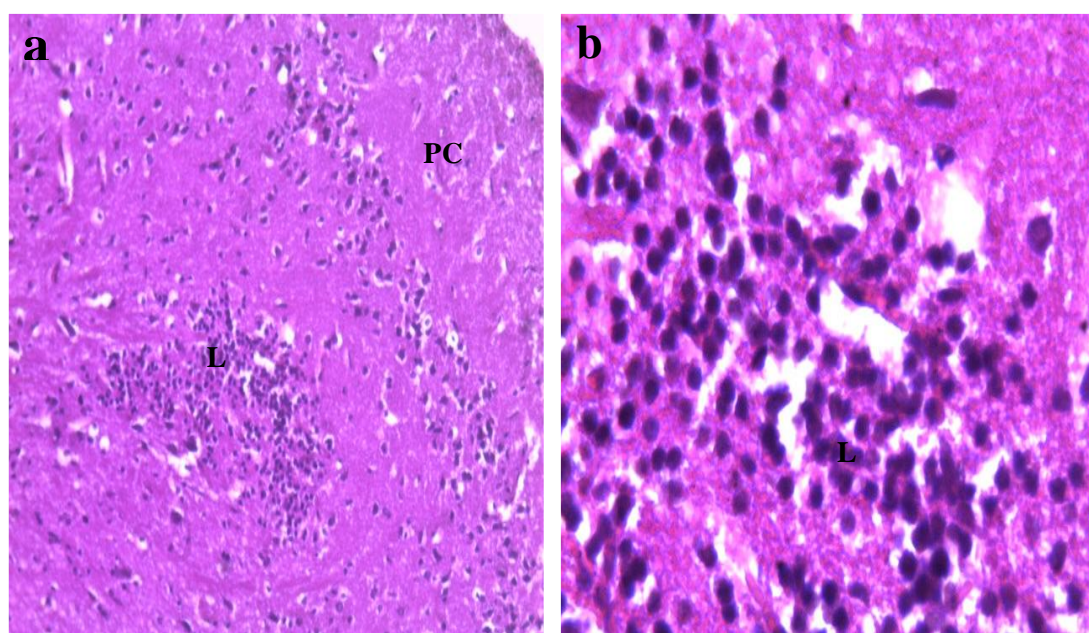


Figure 23 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE₁₂₀₀, montrant présence d'un amas de cellules lymphocytaires; (a): (10×, *H&E*), (b): (40×, *H&E*). PC: parenchyme cérébrale, L: amas de lymphocytes.

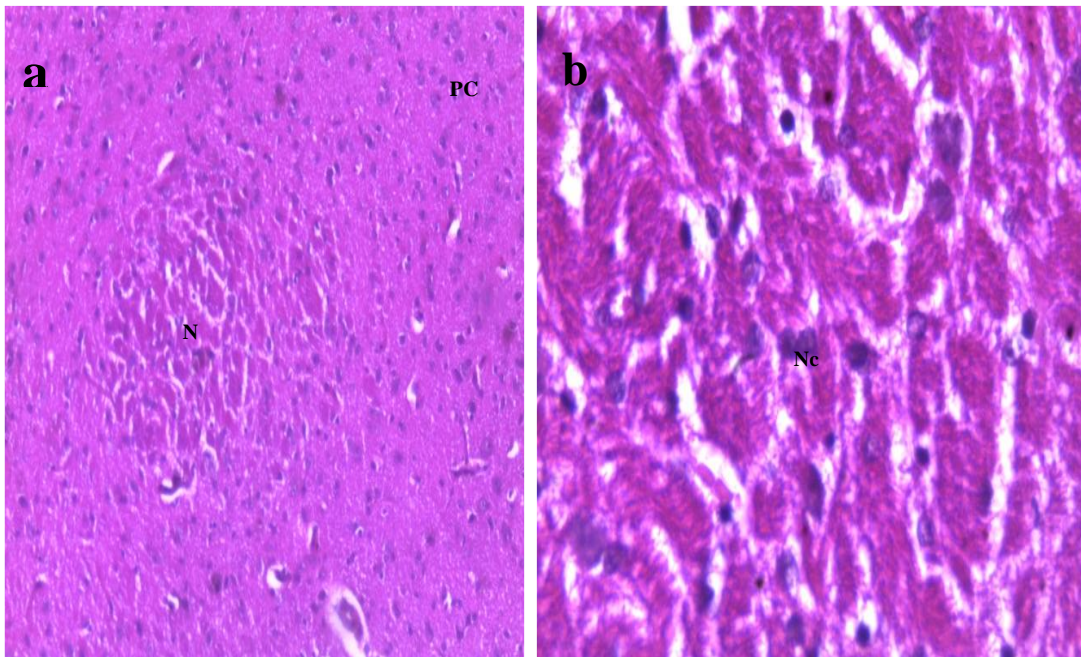


Figure 24 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE₁₈₀₀, montrant la présence d'un foyer nécrotique; (a): (10×, *H&E*), (b): (40×, *H&E*). PC: parenchyme cérébrale, N: foyer nécrotique, Nc: cellules nécrotiques.

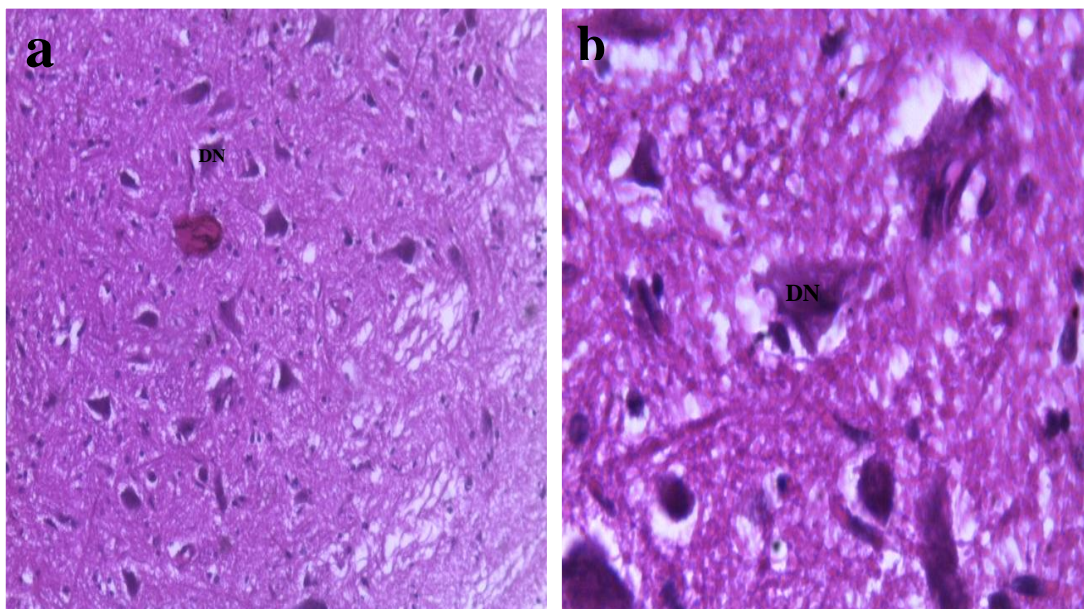


Figure 25 (a et b). Micrographie du parenchyme cérébrale du lot RSE₁₈₀₀, montrant la présence d'une densification et dystrophie neuronales; (a): (10×, *H&E*), (b): (40×, *H&E*). DN: densification neuronale.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Dans la présente étude, notre travail consiste à évaluer l'effet de la supplémentation en α -T à différentes doses (600, 1200 et 1800 mg d' α -T /kg d'aliment) durant 8 semaines, sur la teneur cérébrale en protéines, le taux en malondialdéhyde (MDA) et l'activité enzymatique antioxydante de la catalase, ainsi que sur l'histologie cérébrale du rat Wistar en croissance.

Au terme de cette étude expérimentale, il ressort clairement que :

Sur le plan de la croissance corporel: nous avons obtenu une augmentation non significative de la croissance des rats supplémentés en 600 mg d' α -T/kg d'aliment. Concernant le lot RSE₁₂₀₀, les résultats ont montré une diminution significative ($p < 0,001$) du poids corporel, ce qui suggère que l' α -T à cette dose (1200 mg/ Kg d'aliment) présente des effets néfastes sur la croissance corporelle de ces rats; enfin pour le lot RSE₁₈₀₀ une augmentation non significative a été obtenue par rapport au RS.

Sur le plan du poids cérébral: son étude révèle l'absence de variation significative pour l'ensemble des lots supplémentés en α -T.

Sur le plan métabolique: les résultats obtenus montrent une augmentation non significative de la teneur en protéines, accompagnée d'une diminution significative du taux en MDA ($p < 0,05$), et non significative de l'activité de la CAT du lot RSE₆₀₀ par rapport au RS. Ces résultats indiquent l'effet bénéfique de l' α -T vis-à-vis des ERO au niveau du cerveau.

La supplémentation avec 1200 mg d' α -T/kg d'aliment a induit une baisse non significative de la teneur en protéines et significative ($p < 0,001$) de l'activité de la CAT, suivi d'une augmentation significative du taux en MDA ($p < 0,001$). D'autre part, nous avons obtenu chez le lot RSE₁₈₀₀, une augmentation non significative de la teneur en protéines, et significative ($p < 0,001$) du taux en MDA avec une réduction significative ($p < 0,01$) de l'activité de la CAT, dans ces deux cas l' α -T n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais a eu plutôt tendance à agir en tant que pro-oxydant: processus connu sous le nom de « tocophérol médiateur de peroxydation ».

Toutefois, les interactions métaboliques entre les enzymes de protection contre la peroxydation lipidique et l' α -T sont encore obscures, certains parlent d'effet direct d'autres d'effet indirect. Néanmoins nos résultats portant sur la supplémentation des régimes en α -T rejoignent les études faites par de nombreux auteurs et soutiennent l'effet pro-oxydant de l' α -T lorsqu'elle est supplémenteée à des doses élevés.

Sur le plan cellulaire: l'examen histologique des deux lots RS et RSE₆₀₀, montrent un parenchyme cérébrale normal, cependant chez le lot RSE₁₂₀₀, on a observé un œdème avec une importante cogestion en périphérie du parenchyme cérébrale, ainsi qu'une distension des deux feuillets méninges et présence d'un amas lymphocytaires. En revanche, l'histologie du lot RSE₁₈₀₀, révèle la présence d'un foyer nécrotique avec densification et dystrophie neuronales.

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 cérébrale par chromatographie en phase liquide à haute performance,
- voir l'effet d'une telle supplémentation sur d'autres paramètres antioxydant qui n'ont pas été dosé dans cette étude comme la GPx et la SOD,
- évaluer les effets de différents apports d' α -T sur les biomarqueurs de dommages oxydatifs de l'ADN.
- des dosages plus précis devraient être fait: marqueurs d'oxydation (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl, oxygène singlet, ainsi que le glutathion...).

Références bibliographiques

- Abd El-Rahman., H.S.M. (2016). The Effect of Olive Leaf Extract and A-Tocopherol on Nephroprotective Activity in Rats. **J Nutr Food Sci. 6:** 479.
- Abdo, K.M., Rao, G., Montgomery, C.A., Dinowitz, M., Kanagalingam, K., (1986). Thirteen week toxicity study of d-ct-tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. **Fd Chem. Toxic. 24:** 1043.
- Adelheid, W., Andrey, V. (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress *versus* Signal Transduction. **Biomolecules.5:** 472-484.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymol. 105:** 121 – 126.
- Albahrani, A.A., Greaves, R.F. (2016). Fat-Soluble Vitamins: Clinical Indications and Current Challenges for Chromatographic Measurement. **Clin Biochem Rev.37:** 27-47.
- Algeciras, S.A., Cook, W.J., Milz, T.C., Saenger, A.K., Karon, B.S. (2007). "Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-stick samples collected for determination of neonatal bilirubin". **Clinical Biochemistry.40:** 1311.
- Andreas, M., Papas, P.D. (2008). Vitamin E: A New Perspective. **Douglas Laboratories.**
- 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.
- Asghar, A., Gray, J.I., Miller, E.R., Ku, P.K., Booren, A.M. (1991). Influence of supranutritional vitamin E supplementation in the feed on swine growth performance and deposition in different tissues. **J. Sci. Food. Agr. 57:** 19–29.
- Atta-ur-Rahman, M., Choudhary, I. (2010). Frontiers in cardiovascular drug discovery. **Bentham Science Publishers.1:** 339.
- Azzi, A. (2007). Molecular mechanism of alphanatocopherol action. **Free Radic Biol Med.43:** 16-21.
- Azzi, A., Stocker, A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in lipid research. 39(3):** 231-255.
- Baraibar, M.A., Ladouce, R., Friguet, B. (2013). Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. **J. Proteomics.92:** 63–70.
- Barja, G., Cadena, S., Rojas, C., Perez-Compo, Lopez-Torres, M., Prat, J., Pamplona, R. (1996). Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxidation in guinea pig liver. **Lipids. 3:** 963-970.

- Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose, Immuno-analyse & Biologie spécialisée. **21**: 144–150.
- Bieri, J.G., L. Corash, Hubbard, V.S. (1983). Medical uses of vitamin E. N. **Engl. J. Med.** **308**: 1063–1071.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R.G., Gluud, C. (2007). Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers : a systematic review and meta-analysis. **JAMA.****297**: 842-857.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. **Annals of Botany.** **91**: 179-194.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Beaudeau, J.L., Peynet, J., Legrand, A, Delattre, J.(2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ?. **Ann. Biologica et Clinica.****59**: 453-459.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Delattre, J. (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. IN Delattre, J ., Durand, G ., Jardillier, J.C. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. **Médecine-sciences Flammarion**: 59-81.
- Borel, P. (2003). Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). **Clin Chem Lab Med.****41**: 979-94.
- BOUCHARD, P. (2014). Parodontologie & dentisterie implantaire. **médecine parodontale .1**: 682.
- Bowry, V.M., Igold, S., Stocker, R. (1992). Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a prooxidant. **Biochem. J.** **288**: 341 – 344.
- 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. **J. Am. Chem. Soc.** **115**: 6029-6044.
- Bozkurt, A.K. (2002). Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. **J Cardiovasc Surg.** **43**: 693-6.
- Brack, M. (2009). Évaluation du stress oxydatif. Revue scientifique internationale. **I.R.S. Institut de Recherche sur le Stress - Prévention - Formation.****14**: 30.

- Cadenas, E., Davies, J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. **Free Radical Biology and Medicine.29**: 222-230.
- Choe, E., Min, D.B. (2005)."Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods". **Journal of Food Science.70**: 142-159.
- Claude, B. (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires. **Editions TEC & DOC.11**- 656.
- Csallany, A.S., Ayaz, K.L., Su, L. C. (1977). Effect of dietary vitamin E and aging on tissue lipofuscine pigment concentration in mice. **J. Nutr. 107**: 1792-1799.
- Curtay, J.P., Robin, J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. **Nutrithérapie Info.1**-4.
- Cuvelier, C., Dotreppe, O., Istasse, L. (2003). Vitamine E : état des connaissances chez les carnivores domestiques. Métabolisme, besoins et apports. **Ann Méd Vét.147**: 367- 382.
- Das, K.K., Jargar, J.G, Saha, S., Yendigeri, S.M, Singh, S.B.(2015). α -tocopherol supplementation prevents lead acetate and hypoxia-induced hepatic dysfunction. **Indian J Pharmacol. 47(3)**: 285-91.
- Defraigne, J. O., Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. **Revue médicale de Liège. 63**: 10.
- Defraigne, J.O., Pincemail, J., (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. **Rev Med Liège. 63**: 10-19.
- Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. **Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405**.
- Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. **Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A).**1024.
- Denys, D., Marie, D., Mylène, G. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. **Cahiers de nutrition et de diététique.48**: 218-224.
- Dibi, A. (2014). Dermatite atopique de l'enfant : facteurs diététiques et environnementaux. **Research fr. 1**:734.
- Draper, H. H., Squirese, J., Mahmoudi, H., Wu, J., Agarwal, S., Hadley. M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of

malondialdéhyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medecine. 15:** 353-363.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.82:** 47-95.

Dymsza, H.A., Park, J.(1975). Excess dietary vitamin E in rats. **Fedn Proc Fedn Am Socs Exp Biol. 34:** 912–917.

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. **J. Nutr. 132:** 3400–3404.

Elgaml, S. A., Khalil, R., Hashish, E. A., El-Murr, A. (2015). Protective effects of selenium and Alpha-tocopherol against lead-induced hepatic and renal toxicity in oreochromis niloticus. **Journal of Aquaculture Research & Development. 2015.**

El-Sohemy, A., Baylin, A., Spiegelman, D., Ascherio, A., Campos, H. (2002). Dietary and adipose tissue gamma-tocopherol and risk of myocardial infarction. **Epidemiology.13:** 216- 223.

Emel, Ş., Saadet., G. (2007). Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Comparative Biochemistry and Physiology.144:** 342–347.

Estévez, M., Ventanas, S., Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect on color and texture deterioration. **Journal of Food Science. 70(7):** c427-c432.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. **L'actualité Chimique.108-115.**

Ferreira, S. M., Fabian, L., Claudia, G., Brunzini, R.R., Llesuy, S.F. (2013). Brain antioxidant status in a high pressure–induced rat model of glaucoma. **Acta Ophthalmol. 91:** e64–e70.

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.**

Flora, S.J., Pande, M., Mehta, A. (2003). Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. **Chem Biol Interact.** **145(3):** 267-80.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. **L'actualité chimique.** 91-96.

Garrido-Polonio, C., Garcia-Linares, M.C., Garcia-Arias, M.T., Lopez-Varela, S., Garcia-Fernandez, M.C., Terpstra, A.H., Sanchez-Muniz, F.J. (2004). Thermally oxidized sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. **Br. J. Nutr.** **92:** 257-265.

Gerald, F., Combs, J.R. (2012). The Vitamins, 4th Edition. **Academic Press.**600.

Giraya, B., Kanb, E., Balic, M., Hincala, F., Basarana, N. (2003). The effect of vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in hemodialysis patients. **Clinica Chimica Acta.** **338:** 91–98.

Grandjean, D. (2005). Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. **Le Nouv Prat Vét.****22:** 11-15.

Gueteens, G., De Boeck, G., Highley, M., Van Oosterom, A.T., De Bruijn, E.A. (2002). Oxidative DNA damage: Biological significance and methods of analysis. **Crit. Rev. clin. Lab. Sci.****39:** 331-457.

Guineber, T.E., Durand, P., Prost, M., Grinand, R., Bernigault, R. (2005). Mesure de la résistance aux radicaux libres. **Sixièmes Journées de la Recherche Avicole.**554-558.

Hajiani, M., Golestani, A., Sharifabrizi, A., Rastegar, R., Payabvash, S., Salmasi, A.H., Dehpour, A.R., Pasalar, P. (2008). Dose-dependent modulation of systemic lipid peroxidation and activity of anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. **Redox Rep.** **13:** 60 – 66.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., ChaPelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. **Rev Med Liege.** **62(10):** 628-638.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2008). Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition. **Oxford University Press.**888.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine.Fifth Edition. **Oxford University Press.**944.

- Haufroid, Y., Collignon-Robe, N. J. (2004). [Ocular vasospastic syndrome]. **Revue medicale de Liege. 59(4):** 227-231.
- Heer, M., Titze, J., Smith, S. M., Baecker, N. (2015). *Nutrition, Physiology and Metabolism in Spaceflight and Analog Studies*. **Springer.**27-35.
- Herrera, E., Barbas, C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **J. Physiol. Biochem.**57: 43-56.
- Hill, H., Hamed, M. (1960). Vitamin E Metabolism. **Arch. Tierernahr. 618(5):** 10-129.
- Hisar, O., Beydemir, S., Gulcin, I., ArasHlsar, S., Yanik, T. (2003). Effect of Vitamin E on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme Activity from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Erythrocytes in vitro and in vivo. **Journal Of Applied Research In Veterinary Medicine. 1(4):** 266-271.
- Huet, O., Obata, R., Aubron, C., Spraul-Davit, A., Charpentier, J., Laplace, C., Nguyen-Khoa, T., Conti, M., Vicaut, E., Mira, J.P., Duranteau, J. (2007). Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock. **Crit Care Med.**35: 821-6.
- Jadot, G. (1981). Le rat de laboratoire. 1- Réactif biologique. **Masson.**
- Kadiam, C., Venkata, S., Lokanatha, V., Wudayagiri, R., Chiteti, R., Chinnasamy, T., Rajagopal, S. (2015). Newcastle disease virus (NDV) induces protein oxidation and nitration in brain and liver of chicken: Ameliorative effect of vitamin E. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 64:** 97–106.
- Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S. and 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:** 361 – 379.
- Kleme, M.L., Levy, E. (2015). Antioxidants & Redox Signaling. **22(7):** 614-631.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology. 30:** 620-650.
- Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschu, A. and Beisiegel, U. (1996) Antioxidant and prooxidant activity of a-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. **J. Lipid Res. 37:** 1436 – 1448.

Lacolley, P. (2007). *Biologie Et Pathologie Du Cœur Et Des Vaisseaux*. Ed. **John Libbey Eurotext Paris**. 677.

Lagrost, L., Masson, D. (2002). La protéine plasmatique de transfert des phospholipides (PLTP) : un nouveau facteur athérogène. **Med Sci (Paris)**. **18(4)**: 398-400.

Landes, N., Pfluger, P., Kluth, D., Birringer, M., Rühl, R., Böhl, G.F., Glatt, H., Brigelius-Flohé, R. (2003). Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. **Biochem Pharmacol**. **65**: 269-73.

Landrier, J.F., Gouranton, E., Reboul, E., Cardinault, N., El Yazidi, C., Malezet-Desmoulins, C., André, M., Nowicki, M., Souidi, M., Borel, P. (2010). Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. **J Nutr Biochem**. **21**: 1207–1213.

Lau, F.C., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A. (2007). Nutritional intervention in brain aging: reducing the effects of inflammation and oxidative stress. **Subcell Biochem**. **42**: 299-318.

Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species aging and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. **3**: 21-33.

Leger, C.L. (2000). La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardio-vasculaire, biodisponibilité. **Oléagineux. Corps Gras. Lipides**. **7 (3)**: 258-65.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. **La Presse médicale**. **30**: 1076-1081.

Li, J., Li, W., Jiang, Z. G., Ghanbari, H. A. (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. **International journal of molecular sciences**. **14(12)**: 24438-24475.

Lowry, O. M., Rosenbrough, R. P., Williams, A. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**. **226**: 497-509.

March, B.E., Wong, E., Seier, L., Sim, J., Biely, J. (1973). Hypervitaminosis E in the chick. **J. Nutr**. **103**: 371-377.

Mario, D., Lorena, L., Alvaro, T., Gabriela, E.F., Fernando, J.D., Gerardo, B. (2016). Antioxidant properties in a non-polar environment of difluoromethyl bioisosteres of methyl hydroxycinnamates. **Royal Pharmaceutical Society**.

- Martoja, R., Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux Techniques de l'Histologie animale. Paris: **Masson**. 345.
- McAnulty, SR., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Shooter, L.A., Holmes, S., Heward, C., Henson, D.A. (2005). Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. **J Nutr Biochem. 16(9):** 530-7.
- McCuaig, L. W., Motzok, I. (1970). Excessive dietary vitamin E. Its alleviation of hypervitaminosis A and lack of toxicity. **Poultry Sci. 49:** 1050-1052.
- Muchlisin, Z.A., Arisa, A.A., Muhammadar, A.A., Fadli, N., Arisa, I.I., Siti-Azizah, M.N. (2016). Growth performance and feed utilization of keureling (Tor tambra) fingerlings fed a formulated diet with different doses of vitamin E (alpha-tocopherol).**Arch. Pol. Fish. 24:** 47-52.
- Mukai, K. (1993). Synthesis and kinetic study of antioxidant and prooxidant actions of vitamin E derivatives. Vitamin E in health and disease. **Marcel Dekker, New York.** 97-119.
- Nascimento, M. C. MO., Matsubara, B. B., Matsubara, L. S., Correa, C. R., Pereira, E. J., Moreira, P. L., Carvalho, F. A., Burini, C. H., Padovani, C. R., Yeum, K. J., Ferreira, A. L. A. (2010). Pharmacological dose of a-tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. **Human and Experimental Toxicology. 30,** (10): 1540–1548.
- Nascimento, M.C.MO., Matsubara, B.B., Matsubara, L.S., Correa, C.R., Pereira, E. J., Moreira, P.L., Carvalho, F. A., Burini, C. H., Padovani, C. R., Yeum, K. J., Ferreira, A.L.A. (2010). Pharmacological dose of α -tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. **Human and Experimental Toxicology. 30 (10):** 1540–1548.
- Navarra, G., Tinti, A., Leone, M., Militello, V., Torreggiani, A. (2009). Influence of metal ions on thermal aggregation of bovine serum albumin : Aggregation kinetics and structural changes. **J. Inorg. Biochem.103:** 1729–1738.
- Nekoubin, H., Hosseynzadeh, M., Imanpour, M.R., Asgharimoghadam, A., Raki, M., Montajami, S. (2012). Effect of vitamin E (A-tocopheryl) on growth reproductive performance and survival rate of angel fish (Pterophyllum scalare). **World J. Zool. 7:** 285-288.

- Niki, E., Komuro, E., Takahashi, M., Urano, S., Ito, E., Terao, K. (1988). Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. **J Biol Chem.** **263(36)**: 19809-14.
- Nitta, Y., Kamiya, K., Tanimoto, M., Sadamoto, S., Niwa, O., Yokoro, K. (1991). Induction of transplantable tumors by repeated subcutaneous injections of natural and synthetic vitamin E in mice and rats. **Jpn. J. Cancer Res.** **82**:511.
- Nockels, C.F., Menge, D.L., Kienholz, E.W. (1976). Effect of excessive dietary vitamin E on the chick. **Poult.Sci.****55**: 649.
- Nwanguma, B.C., Achebe, A.C., Ezeanyika, L.U. and Eze, L.C. (1998). Toxicity of oxidized fats II: tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet. **Food Chem. Toxicol.** **37**: 413 – 416.
- Opara, E.C.(2006). Oxidative stress. **Dis Mon.****52**: 183-198.
- Oroian, M., Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International.****74**: 10–36.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J. (2000). High dietary intake of α -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology.** **10**: 293–307.
- Paul, J. L., Baudin, B. (2009). Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces. **Revue francophone des laboratoires.** **409**: 41-50.
- Peh, H.Y., Tan, W.S., Liao, W., Wong, W.S. (2015). Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. **Pharmacol Ther.****162**: 152-69.
- Pisoschia, A.M., Popa, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review. **European Journal of Medicinal Chemistry.****97**: 55–74.
- Polat, KY., Aydinli, B., Polat, O., Aydin, U., Yazici, P., Ozturk, G., Gundogdu, C., Kiziltunc, A. (2008). The protective effect of aprotinin and α -tocopherol on ischemia–reperfusion injury of the rat liver. **Transplant Proc.** **40**: 63–68.
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, **Free Rad. Biol. Med.** **28**: 141–164.
- Raman, A.V., Marla, J.B. (2011). Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: **Molecular Aspects of Cell Signaling.**195-208.

- Reboul, E., (2011). Absorption intestinale des vitamines liposolubles. **OCL. 18:** 53-58.
- Rietjens, I.M., Boersma, M.G., Haan, L.d., Spenkeliink, B., Awad, H.M., Cnubben, N.H., Zanden, J.J., Woude, H.V., Alink, G.M., Koeman, J.H. (2002). The pro-oxidant chemistry of natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology.11:** 321-333.
- Robbins, S.L., Kumar, V. (1994). Pathologic Basis of Disease. **WB Saunders Company, Philadelphia.** 591.
- Robert, J., Glynn, R. J., Ridker, P. M., Goldhaber, S. Z., Zee, R. Y., & Buring, J. E. (2007). Effects of Random Allocation to Vitamin E Supplementation on the Occurrence of Venous Thromboembolism Report From the Women's Health Study. **Circulation. 116(13):** 1497-1503.
- Sachdev, S., Davies, K.J.A. (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. **Free Radical Biology & Medicine.44:** 215–223.
- Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A., Perry, G. (2005). Metal ions and oxidative eprotein modification in neurological disease. **Ann Ist Super Sanità. 41:** 143-164.
- Sha, L., Hor-Yue, T., Ning, W., Zhang-Jin, Z., Lixing, L., Chi-Woon, W., Yibin, F. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **Int. J. Mol. Sci.16:** 26087–26124.
- Sharma, N., Desigan, B., Ghosh, S., Sanyal, S. N., Ganguly, N. K., Majumdar, S. (1999). Effect of antioxidant vitamin E as a protective factor in experimental atherosclerosis in rhesus monkeys. **Annals of nutrition and metabolism. 43(3):** 181-190.
- Singal, P.K., Kapur, N., Dhillon, K.S., Beamish, R.E. and Dhalla, N.S. (1983). Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. **Can. J. Physiol. Pharm. 60 :** 1390 – 1397.
- Sorge, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. **Comptes Rendus Biologies.327:** 649-662.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. **Ann NY Acad Sci 899:** 191-208.

- 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. **TIBS**.**24**: 219.
- Stocker, R., Keaney, J.F. (2004). " Role of oxidative modifications in atherosclerosis". **Physiol. Rev.** **84**: 1381- 1478.
- Taibur, R., Ismail, H., Towhidul, I., Hossain, U.S. (2012). Oxidative stress and human health. **Advances in Bioscience and Biotechnology**.**3**: 997-1019.
- Tang, 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.
- Tanguy, M., Begué-Simon, A. M. (2009). Antioxydants: Deuxième partie: données cliniques d'efficacité. **Médecine.** **5(7)**: 303-307.
- Tappel, A.L. (1954). Studies of the mechanism of vitamin E action. II. Inhibition of unsaturated fatty acid oxidation catalyzed by hematin compounds. **Arch Biochem Biophys.** **50(2)**: 473-85.
- Tezel, G., Yang, X., Cai, J. (2005). Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. **Investigative ophthalmology & visual science.** **46(9)**: 3177-3187.
- 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.
- Traber, M.G. (2007). Vitamin e regulatory mechanisms. **Annu Rev Nutr.** **27**: 347-62.
- Traber, M.G., Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radic Biol Med.****43** : 4-15.
- Upston, J. M., Terentis, A. C., Stocker, R. (1999). Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. **The FASEB Journal,** **13(9)**, 977-994.
- Valko, M., Rhodes, C. J., 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.

- Verhagen, H., Buijsse, B., Jansen, E., Bueno-de-Mesquita, B. (2006). The state of antioxidant affairs. **Nutrition Today**. **41(6)**: 244-250.
- Vibha, R., Deep, G., Singh, R.K., Palle, K., Yadav, U.C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**. **148**: 83–193.
- Wagner, B.A., Buettner, G.R., Burns, C.P. (1996). Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. **Arch Biochem Biophys**. **334**: 261–267.
- Wartanowicz, M., Panczenko-Kresoxka, B., Ziemplanski, S., Kowalska, M., Okolska, G. (1984). The effect of tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people. **Ann. Nutr. Metab.** **28**: 186.
- Wheldon, GH., Bhatt, A., Keller, P., Hummler, H. (1983). D,1-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E): A long term toxicity and carcinogenicity study in rats. **Int J Vitam. Nutr. Res.** **53**: 287–296.
- Wissam , I., Ung-Soo, L., Che-Chung, Yeh., Joseph, S., Geza B., Ching -K, C. (1997). Stress oxydatif et le statut antioxydant du foie de souris: Effets de la diététique Lipid, la vitamine E et de fer. **J. Nutr.****127(7)**: 1401-1406.
- Xavier, L. (2009). Stress oxydant et antioxydants ?. **Cahiers de nutrition et de diététique**.**44**: 219-224.
- Yamashita, N., Murata, M., Inoue , S., Burkitt, M.J., Milne, L., Kawanishi, S. (1998). Alpha- tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper (II) ions. **Chem. Res. Toxicol.** **11**: 855–862.
- Yang, N.Y.J., Desai, I.D. (1977). Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats. **J. Nutr.** **197**: 1418-1426.

Annexes

Annexe 01

Tableau I: Constitution du régime alimentaire (g /100g):

Ingrédients	RS	RSE ₆₀₀	RSE ₁₂₀₀	RSE ₁₈₀₀
Mais	52.80	52.80	52.80	52.80
Son	10.80	10.80	10.80	10.80
Soja	32.10	32.10	32.10	32.10
Calcaire	01.50	01.50	01.50	01.50
Phosphate	00.80	00.80	00.80	00.80
C.M.V(Complément Méniralo-Vitaminique)	02.00	02.00	02.00	02.00
α -T	/	0,06	0,12	0,18

- **Mélange minéral contenu dans 100 g d'aliment:** KH_2PO_4 20,0 mg; CaCO_3 34,6 mg; CaHPO_4 26,55 mg; 13,70 mg de NaCl; 3,42 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,042 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,27 mg; $7\text{H}_2\text{O}$ 1,02 mg FeSO_4 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,15 mg; CaCO_3 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.

Annexe 02

I.1 Verrerie et autres :

- Pissette
- Compresse
- Lames de bistouri
- Ciseaux.
- écarteurs.
- Pinces.
- Plaque de contention.
- Flacons
- Micropipette (de 10µl à 1000µl),
- Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml)
- Tubes à essai.
- Tubes en verre.
- Portoirs.
- Bêchers de 50ml et 250ml,
- Erlenmeyer de 250ml
- Cuve de chromatographie.
- Boîtes de Pétri.
- Lames et lamelles.
- Embouts de contenance de 1000 µl.
- Embouts de contenance de 200 µl.
- Spatule.
- Entonnoir.
- Papier absorbant
- Cassettes d'inclusion.

I.2. Réactifs chimiques

- Vitamine E.
- Ether Ethylique.
- Triton X-100.
- Acide trichloracétique.

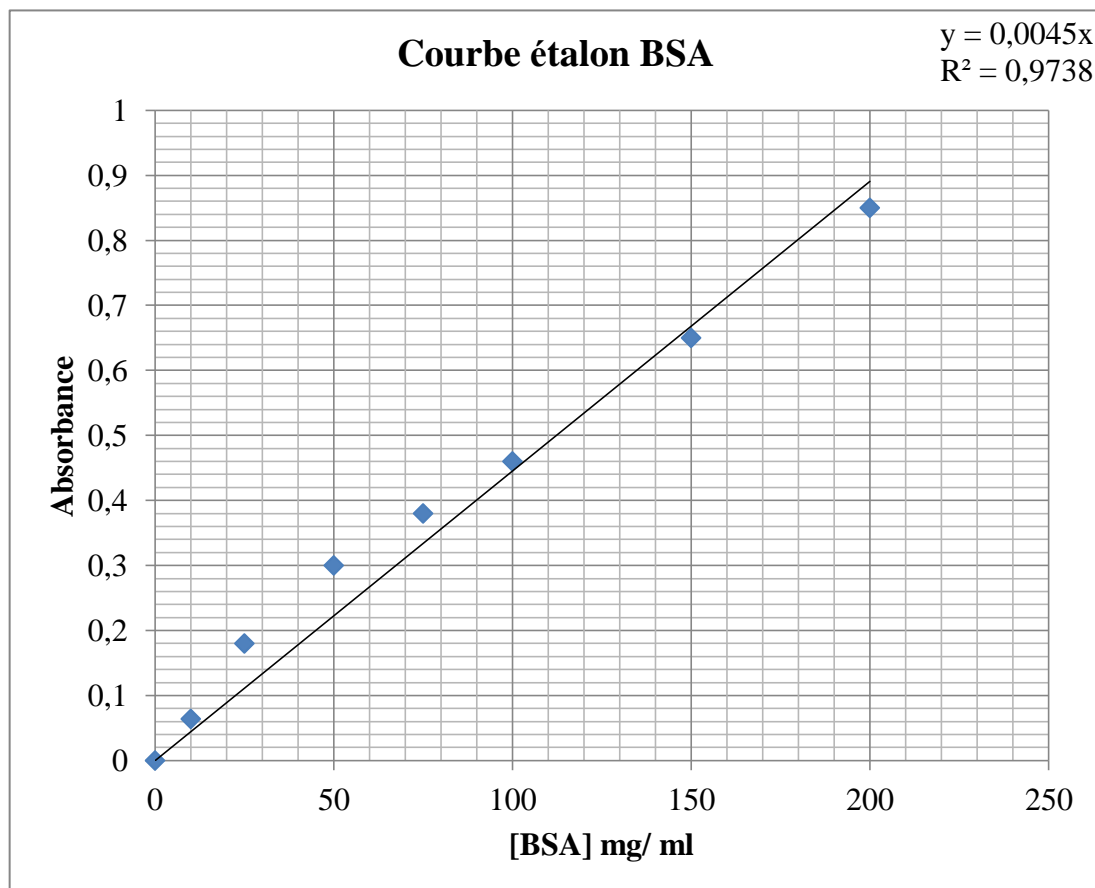
- Alcool.
- Hydroxyde de sodium NaOH.
- Tartrate de Na⁺ K⁺.
- Sulfate de cuivre CuSO₄.
- Sulfate de carbonate de sodium Na₂CO₃.
- Folin ciocalteu.
- Phosphate de potassium monobasique KH₂PO₄.
- Butyl-Hydroxtoluène (BHT).
- Phosphate disodique Na₂ HPO₄, 2H₂O.
- Peroxyde d'hydrogène H₂O₂.
- Eau distillée.

I.3. Appareillages :

Appareillages nécessaire pour le dosage des paramètres du stress oxydatif:

- Broyeur Homogénéiseur (Potter de Thomas).
- Balance de précision (KERN).
- Centrifugeuse (ROROFIX 32 A).
- Spectrophotomètre UV-visible
- Bain-marie
- Agitateur
- pH mètre
- Réfrigérateur
- Automates de traitement des tissus (Myr).
- Module de refroidissement de paraffine (Leica).
- Microtome (Leica).
- bain de flottaison de paillasse (Firlabo).
- Plaque chauffante (Stuart).
- Etuve (Sakura).
- Distillateur.
- Microscope optique (Zeiss).
- Appareil photo (Canon).

Annexe 03: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY (1951), l'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence



Annexe 04:

Tableau II: la variation du poids corporel et le poids cérébral chez les rats en croissance (témoins: RS, supplémentés en 600 mg d' α -T. kg^{-1} : RSE₆₀₀, 1200 mg d' α -T. kg^{-1} : RSE₁₂₀₀ et en 1800 mg d' α -T. kg^{-1} : RSE₁₈₀₀).

Paramètres	Lots expérimentaux			
	RS	RSE ₆₀₀	RSE ₁₂₀₀	RSE ₁₈₀₀
Poids Corporel (g)	253,1±4,063	254,93±34,90	225,06± 1,87 a***	234,43±9,036 a*
Poids cérébrale (g)	1,767±0,115	1,633±0,153	1,800±0,100	1,867±0,058

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 entre témoin et groupe traités; **a**: comparaison avec le lot RS, **b**: comparaison avec le lot RSE₆₀₀, **c**: comparaison avec le lot RSE₁₂₀₀.

Annexe 05:

Tableau IV: la variation de la teneur en protéines, taux en malondialdéhyde (MDA) et l'activité de la catalase (CAT) chez les rats en croissance (témoins: RS, supplémentés en 600 mg d' α -T. kg^{-1} : RSE₆₀₀, 1200 mg d' α -T. kg^{-1} : RSE₁₂₀₀ et en 1800 mg d' α -T. kg^{-1} : RSE₁₈₀₀).

Paramètres	Lots expérimentaux			
	RS	RSE ₆₀₀	RSE ₁₂₀₀	RSE ₁₈₀₀
Protéines [mg/ 100 g de tissu]	57,40±2,312	62,22±8,652	53,62±8,448	55,40±2,760
MDA [n moles/ mg de protéines]	62,46±5,323	a* 53,86 ±0,540	b*** 67,00±1,184	a* b*** c* 72,39±1,95
Catalase [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ Protéines]	1,360±0,201	1,160±0,046	a * b ** 0,963±0,050	a * b ** 0,937±0,040

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et groupe traités; **a**: comparaison avec le lot RS, **b**: comparaison avec le lot RSE₆₀₀, **c**: comparaison avec le lot RSE₁₂₀₀.