



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB BLIDA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de

Master : En SCIENCE BIOLOGIQUE

Option : BIOCHIMIE

Thème

**Effets d'un régime riche en alpha-tocophérol sur quelques paramètres du stress oxydatif et sur l'histologie du tissu cardiaque chez des souris NMRI**

**Présenté par :**

Kherrobi Salima

Larinouna Rekia

Seddik Bouchra

**Devant le jury :**

M <sup>me</sup> SOUR S.	Maitre de conférences B	USDB1	Présidente
M <sup>me</sup> AMOKRANE A.	Maitre Assistante A	USDB1	Examinatrice
M <sup>me</sup> ROUAKI F.	Maitre de conférences B	USDB1	Promotrice
Dr BELKADI A.	Vétérinaire	CRD/ Gué de Constantine	Co-Promotrice

2018/2019

## *Remerciements*

En terminant notre mémoire de fin d'études, il nous est agréable d'adresser nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à élaborer ce travail.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements et le plus grand respect à notre encadreur Mme ROUAKI F. Maître de conférences B à l'université de Blida 1 pour sa compréhension, sa patience, sa disponibilité et ses précieux conseils qu'elle nous a témoignés tout au long de ce travail.

Notre gratitude à notre Co-promotrice Dr Belkadi A. responsable de l'animalerie du laboratoire CRD (SAIDAL- Gué de Constantine) pour sa précieuse aide et son soutien scientifique

Nos remerciements vont également à Mme SOUR S. Maître de conférences B à l'université de Blida 1, qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. On tient à vous exprimer tout notre respect.

Nous tenons à exprimer nos chaleureux remerciements à Mme AMOKRANE A. Maître Assistante A à l'université de Blida 1 pour l'honneur qu'elle nous a fait de vouloir examiner ce modeste travail, on lui manifeste notre haute considération.

On n'oubliera pas de remercier le Dr Boudour H. Médecin du service d'Anatomie Pathologie à l'hôpital Fars Yahia de Kolea pour son aide lors de la lecture des lames histologiques, ainsi qu'à toute l'équipe de laboratoire

Nos remerciements vont à Mr BENMALEM A. Ingénieur de laboratoire de Biotecnologie végétale pour sa précieuse aide

Nous ne n'oublierons pas de remercier toute l'équipe de l'animalerie du laboratoire CRD (SAIDAL- Gué de Constantine) pour sa précieuse aide.

Enfin, on adresse nos chaleureux remerciements à tous les enseignants qui nous ont suivis pendant tout long de notre cursus éducatif.

## ***DÉDICACES***

A Ma raison de vivre, d'espoir  
A ma source de courage, à ceux que j'ai de plus cher  
Ma mère, mon père  
Mes grands parents  
Mes sœurs Amel, Wassila et Sara  
Mes frères Walid, Lotfi et Mohamed  
Mon fiancé Hessen  
Pour leur amour, leur confiance  
Et leur sacrifice sans limite  
A toute ma famille  
A mes chers nièces et neveux  
A mes chères amies  
Isra  
Maroua  
Manal  
Imane

***Bouchra***

## ***DÉDICACES***

A ceux qui m'ont donné leur vie, à qui je voudrais offrir la mienne en guise de reconnaissance : mes  
parents.

A mes sœurs et à mon frère qui n'ont jamais cessé de m'encourager.

A toutes mes amies en particulier Chahrazed Houari , ma copine de l'enfance , et Bouchra Hamzaoui dont  
la disponibilité quotidienne m'était d'une précieuse aide .

A ceux qui ne quitteront jamais mes pensées ... je dédie ce travail

***Salima***

## ***Dédicace***

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 tous les sacrifices et les efforts fournis jour et nuit pour mon bien être et ma réussite. Votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour atteindre à cet objectif.

A mes chères grandes mères

Qui m'ont accompagné par leurs prières, que Dieu leur accorde une longue vie.

A ma très chère et unique sœur Sara et ma meilleure amie Meriem

Pour leur soutien et encouragements

A mon fiancé Mohamed

Pour sa présence à mes côtés et sa patience et son soutien, que Dieu te garde, ainsi à ma belle-famille. Enfin mes dédicaces à toute ma famille et mes chères amies et tous ceux qui sont chers de près et de loin.

***Rekia***

## RESUME

Ce travail avait pour objectif de déterminer les effets de la supplémentation en alpha-tocophérol à différentes doses (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T /Kg d'aliment) d'un régime équilibré, sur l'histologie du tissu cardiaque et quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif (la teneur en protéines, le taux en malondialdéhyde et l'activité enzymatique antioxydante de la catalase) chez les souris de souche NMRI.

Au terme de cette étude nous avons obtenus une augmentation non significative du taux en protéines et de la catalase accompagnée d'une diminution non significatif du malondialdéhyde du lot supplémente en 700 mg d'alpha tocophérol / kg d'aliment comparé au lot témoin, ce qui montre l'effet protecteur de l'alpha tocophérol à l'encontre des espèces réactives de l'oxygène. Concernant les lots supplémente avec 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d'alpha tocophérol / kg d'aliment, les résultats obtenus ont montré une baisse très significative de la concentration en protéines et une diminution non significative de la catalase accompagnée d'une élévation hautement significative du taux en malondialdéhyde, à ces doses l'alpha tocophérol n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais plutôt en tant que pro oxydant.

Enfin, l'analyse histologique du tissu cardiaque des souris traité par 700 mg d'alpha tocopherol / kg d'aliment a montré une architecture cellulaire normale. Cependant, à fortes doses nous avons obtenu des œdèmes, des altérations cellulaires et des congestions, l'ensemble de ces résultats on a déterminés les résultats histologiques.

**Mots clés :** Alpha tocophérol, pro oxydant , antioxydant , cœur , souris

## ABSTRACT

The objective of our work is to determine the effect of supplementation with alpha-tocopherol ( $\alpha$ -T) at different doses (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 and 1200 mg of  $\alpha$ -T / kg feed), on histology of cardiac tissue and biochemical parameters of oxidative stress: protein content, malondialdehyde and catalase antioxidant enzyme activity in NMRI mice.

After this trial period, we obtained a non-significant increase in the protein content and catalase accompanied by a non-significant decrease in the malondialdehyde of the batch supplemented with 700 mg of  $\alpha$ -T / kg of feed compared to the control group, which shows the protective effect of  $\alpha$ -T against ROS. for lots supplemented with 900, 1000, 1050, 1100, 1150 and 1200 mg of  $\alpha$ -T / kg of feed the results obtained show a very significant decrease in protein concentration, accompanied by a highly significant increase in the rate in malondialdehyde and a non significant decrease in catalase and in this case  $\alpha$ -T acted as a pro oxidant.

Finally, the histological analysis of the heart of mice treated with 700 mg of  $\alpha$ -T / kg of feed showed a cellular architecture with a normal appearance, however, at high dose the results showed the presence of edema, cellular alteration and congestions. All these results confirm the results of the b assay.

**Keywords:** Alpha tocopherol, prooxidant, antioxidant, heart, mouse

## المخلص

يهدف هذا العمل إلى تحديد تأثير مكملات ألفا توكوفيرول بجرعات مختلفة (700 ، 900 ، 1000 ، 1050 ، 1100 ، 1150 و 1200 ملغ  $\alpha$ -T / كغ من الأغذية ) على الأنسجة القلبية والمعلومات البيوكيميائية للإجهاد التأكسدي: محتوى البروتين ، malondialdehyde (MDA) ونشاط انزيم مضادات الأوكسدة الكاتالاز في الفئران من سلالة NMRI

بعد هذه الفترة التجريبية حصلنا على زيادة غير معتبرة في نسبة البروتين و نشاط الكاتالاز، يرافقه انخفاض غير معتبر في معدل MDA عند إضافة 700 مغ من ال  $\alpha$ -T/كغ من الغذاء مقارنة بالشاهد . مما يدل على التأثير الوقائي لل  $\alpha$ -T ضد ROS . بالنسبة للكميات المكتملة بـ 900 , 1000 , 1050 , 1100 , 1150 و 1200 ملغ  $\alpha$ -T /كغ من الغذاء) ، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها انخفاضاً كبيراً في تركيز البروتين ونقصان غير معتبر في الكاتالاز مصحوبة بزيادة كبيرة للغاية في معدل MDA وفي هذه الحالة كان  $\alpha$ -T بمثابة مادة دافعة للأوكسدة .

أخيراً، أظهر التحليل النسيجي لقلب الفئران التي عولجت بـ 700 ملغ من  $\alpha$ -T /كغ من الغذاء أن بنية الخلية لها مظهر طبيعي ، بينما في الجرعات العالية أظهرت النتائج وجود تورم ، تغيرات خلوية و إحتقان. كل هذه النتائج تؤكد نتائج الفحص الكيميائي الحيوي. كلمات البحث : ألفا توكوفيرول ، دافع للأوكسدة ، مضادات الأوكسدة ، القلب ، الفأر

# sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## **Partie I : Etude bibliographique**

### **Chapitre I : Stress oxydatif**

I.1 Définition .....	3
I.2. Les radicaux libres.....	3
I.3. Différentes espèces réactives.....	3
I.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène .....	4
I.3.2. Les espèces réactives de l'azote.....	4
I.4. Sources de stress oxydatif.....	5
I.4.1 Sources endogènes .....	5
I.4.2 Sources exogènes .....	6
I.5. Action des radicaux libres.....	6
I.5.1. Les lipides .....	7
I.5.2. Les protéines .....	8
I.5.3. L'ADN.....	8
I.6. Implication pathologique liées aux stress oxydatif.....	9

### **Chapitre II : Les systèmes de défense antioxydants**

II.1. Les antioxydants endogènes.....	11
II.1.1. Le superoxyde dismutase (SOD) .....	11
II.1.2. La catalase .....	11
II.1.3. Glutathion peroxydase .....	12
II.1.4. Glutathion réductase.....	12
II.2. Les antioxydants exogènes	
II.2.1. La vitamine E.....	13
II.2.2. La vitamine C.....	13
II.2.3. Caroténoïde.....	13

II.2.4. Les flavonoïdes.....	14
II.2.5. La taurine .....	14

### **Chapitre III : La vitamine E**

III.1. Généralité .....	15
III.2. Propriété chimique de l'alpha tocophérol .....	16
III.3. Absorption et métabolisme de la vitamine E.....	16
III.4. Action antioxydante de la vitamine E.....	18
III.5. La régénération de la vitamine E .....	19
III.6. Activité prooxydante .....	19

### **Partie II : Etude expérimentale**

#### **Chapitre I : Matériel et méthodes**

##### **I.1. Matériel**

I.1.1. Matériel non biologique.....	21
I.1.2. Matériel biologique.....	21
I.1.2.1. Animaux étudiés.....	21
I.1.2.2. Préparation du régime.....	22
I.1.2.3. Sacrifice et prélèvement du cœur.....	23

##### **I.2. Methodes**

I.2.1. Dosage des protéines.....	23
I.2.2. Dosage de molondialdehyde.....	25
I.2.3. Dosage de la catalase.....	26

I.3. Realisation des coupes histologique.....	27
---	----

I.4. Etude statistique.....	30
-----------------------------	----

#### **Chapitre II : Résultats et discussion**

##### **II.1. modification physiologique**

II.1.1.Effets de la supplémentation de l'alpha tocophérol à différentes doses sur le poids corporel.....	31
II.1.2.Effets de la supplémentation en alpha tocophérol à différentes doses sur le poids cardiaque.....	33
II.2. Effets de la supplémentation en alpha tocophérol sur quelques paramètres de stress oxydatif et sur l'histologie du tissu cardiaque .....	34
Conclusion .....	43
Références bibliographiques	
Annexes	

## Liste des abréviations

**AGPI:** Acides Gras Polyinsaturés

**$\alpha$ -T:**  $\alpha$ - Tocophérol.

**$\alpha$  - TTP:**  $\alpha$ -Tocophérol Transfert Protéine.

**$\alpha$ -T $\cdot$ :** Radical  $\alpha$  Tocophéroxyl.

**BSA:** Sérum Albumine bovine.

**CAT:** Catalase

**ERO:** Espèces Réactives de l'Oxygène.

**ERA:** Espèces Réactives de l'Azotes

**ERON :** Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote

**GPx:** Glutathion Peroxydase.

**GSH:** Glutathion.

**GSSG:** Glutathion-Disulfure.

**GR:** Glutathion Réductase.

**HDL:** High density lipoprotéin.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde D'hydrogène.

**LDL:** Low density lipoprotein.

**LPL :** lipoprotéine lipase

**LPO :** lipoperoxydation

**LPS :** lipopolysaccharide

**LOO $\cdot$ :** radical peroxyde d'acide gras

**MDA:** Malondialdehyde.

**NaCl:** Chlorure de Sodium.

**NADPH:** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène.

**NOS:** Nitrique Oxyde Synthase.

**NADP<sup>+</sup>:** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

**O<sub>2</sub> $\cdot^-$  :** Anion Superoxyde.

**OH $\cdot$ :** Radical Hydroxyl.

**ONAB:** Office National des Aliments de Bétail

**ROO $\cdot$  :** Radical Peroxyl.

**RS:** Régime Standard

**SOD:** Superoxyde Dismutase

**TBA:** Acide Thiobarbiturique

**VLDL:** Lipoprotéines de très basse densité

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Le transport électronique à travers la chaîne respiratoire mitochondriale et la production des ROS.....	05
<b>Figure 2</b> : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.....	07
<b>Figure 3</b> : Principales classes de dommages de l'ADN.....	09
<b>Figure 4</b> : Les maladies liées au stress oxydatif.....	10
<b>Figure 5</b> : La structure des différents isomères de la vitamine E.....	15
<b>Figure 6</b> : La localisation d' $\alpha$ tocophérol dans la bicouche lipidique de la membrane.....	16
<b>Figure 7</b> : Absorption, transport et distribution de la vitamine E.....	17
<b>Figure 8</b> : La forme oxydée de la vitamine E.....	18
<b>Figure 9</b> : La régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique.....	19
<b>Figure 10</b> : Expérimentation animal.....	21
<b>Figure 11</b> : cassette d'inclusion.....	27
<b>Figure 12</b> : automate de deshydratation.....	27
<b>Figure 13</b> : Appareils d'enrobage (d'inclusion).....	29
<b>Figure 14</b> : microtome.....	29
<b>Figure 15</b> : Coloration Hématoxyline / Eosine.....	30
<b>Figure 16</b> : Variation du poids corporel chez les souris en croissance.....	31
<b>Figure 17</b> : Evaluation des poids cardiaque chez les souris en croissance.....	33
<b>Figure 18</b> : Effet de la supplémentation en 700 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment sur la teneur en protéines, l'activité de la catalase le taux en MDA au niveau du tissu cardiaque chez des souris en croissance, par rapport aux lots RS.....	35
<b>Figure 19</b> : Micrographie du cœur (40 $\times$ , <i>H&amp;E</i> ) montrant :(A) : architecture normal chez le lot "témoin" : RS, et (B) chez souris supplémentés avec 700 mg d' $\alpha$ -T / kg d'aliment.....	37
<b>Figure 20</b> : Effet de la supplémentation en 900, 1000, 1050, 1100,1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliments sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cardiaque chez les souris en croissance, par rapport aux lots RS.....	39
<b>Figure 21</b> : Micrographie du cœur du lot RSE900 (40 $\times$ , <i>H&amp;E</i> ) montrant la présence de congestion (A), micrographie du cœur du lot RSE1000 (40 $\times$ , <i>H&amp;E</i> ) montrant la présence d'un oedème (Oe) , avec une congestion (c), d'infiltration lymphocytaires (IL) et d'altération de myocyte (AM) (B).....	41

<b>Figure 22</b> : Micrographie du cœur du lot RSE1050 (40×, <i>H&amp;E</i> ) montrant la présence, d'œdème (Oe) et altération de myocyte (A), et micrographie du cœur du lot ERS1100 (40×, <i>H&amp;E</i> ) montrant la présence des œdèmes (Oe) et de congestion (C).....	41
<b>Figure 23</b> : micrographie du cœur du lot ERS1150 (40×, <i>H&amp;E</i> ), montre la présence des œdèmes (Oe), de congestion ( C ) ,d'infiltration lymphocytaire (IL) et de vaisseau altéré (AL).....	42
<b>Figure 24</b> : : micrographie du cœur du lot ERS1200 (40×, <i>H&amp;E</i> ) montre la présence de congestion (C) et de polynucléaires neutrophiles.....	42

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Les espèces radicalaires et non radicalaires .....	04
<b>Tableau II</b> : la préparation de différentes doses.....	22
<b>Tableau III</b> : mode opératoire de l'automate.....	28

# **Introduction**

### Introduction

L'oxygène moléculaire présente la particularité d'être un élément indispensable et toxique à la fois pour l'Homme, via sa transformation en anions superoxydes, pour générer d'autres espèces réactives oxygénées (ROS) (Daum-badouard, 2006) et il peut également générer d'autres radicaux libres à partir de l'azote, classés dans la famille des espèces réactives d'azote (NOS) (Li et *al.*, 2013).

Les radicaux libres (RL) sont des atomes ou des molécules fortement réactives avec des électrons non appariés dans leur orbitale externe (Omodanisi et *al.*, 2017),

( Singh et *al.*, 2015). ils sont issus de sources endogènes comme la mitochondrie, les cellules phagocytaires, et de sources exogènes comme la pollution, l'alcool, les métaux de transitions (Phaniendra et *al.*, 2015). Cependant, l'excès de la production des ROS peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule: les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Jie et *al.*, 2013) entraînant des pathologies comme l'athérosclérose, le diabète, les maladies cardiovasculaires, pancréatiques et maladies du foie, la fibrose cardiaque, des maladies neurologiques et le cancer.

Pour contourner les dommages causés par les ROS, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants qui 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). Ces derniers sont synthétisés par l'organisme comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), ou le plus souvent apportés par l'alimentation comme la vitamine E, les caroténoïdes, l'acide ascorbique (Laguerre et *al.*, 2007).

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), est un antioxydant lipophile clé essentiel chez les humains, protecteur des acides gras polyinsaturés (AGPI) et les membranes cellulaires en empêchant la peroxydation lipidique (Raederstorff et *al.*, 2015). Durant la réaction antioxydante, l' $\alpha$ -tocophérol est converti en radical  $\alpha$ -tocophéroxyl beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy) (Valko et *al.*, 2006). Cependant, l'effet pro-oxydant de l' $\alpha$ -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 peroxy ou avec des acides gras polyinsaturés dans les LDL. Cette réaction mène à l'accumulation des hydroperoxydes et des diènes conjugués (Mukai,1993).

L'objectif de cette étude consiste à évaluer quelques marqueurs de la balance oxydants/antioxydants chez des souris Albinos, nourris pendant 5 semaines avec un régime standard supplémenté en (700, 900, 1000, 1050, 1100,1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment), nous souhaitons contribuer à une meilleure compréhension de l'effet de ce supplément sur des souris et sur le tissu cardiaque.

# **Partie I : Etude Bibliographique**

## I. stress oxydatif

### I.1. Définition

Le stress oxydatif est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les réactions des espèces pro oxydantes, cela est dû à un déséquilibre lié soit à une production massive d'espèces réactives, soit à une diminution de la capacité anti-oxydante de l'organisme (Defragine et *al.*, 2007). Cette rupture d'équilibre peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, d'inactivation des systèmes enzymatique (superoxyde dimustase, catalase et glutathion peroxydase) ou d'intoxication par des métaux lourds (Fe, Cu, Mg) (Bonjean et *al.*, 2002).

### I.2 Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est toute espèce moléculaire instable et très réactive, qui contient un ou plusieurs électrons non appariés dans l'orbitale externe (Lobo et *al.*, 2010) ce qui l'amène à capturer les électrons d'autres substances afin de se neutraliser (Kalam et *al.*, 2012). Par ailleurs, il existe d'autres dérivées oxygénées réactives dont leur toxicité est très importante tel que l'oxygène singulet, l'ozone, le peroxyde d'hydrogène, et le peroxydinitrite, qui ne sont pas des radicaux libres (Lev et *al.*, 2007).

### I.3 Différente espèce réactive

Les espèces réactives comprennent deux classes de molécules (Tableau I), les Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA), sont des espèces chimiques transitoires hautement réactives et potentiellement dommageables (Kalam et *al.*, 2012).

**Tableau I :** Les espèces radicalaires et non radicalaires

Espèces radicalaires	Espèces Non radicalaires
Superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )	Oxygène singlet ( $^1O_2$ )
Radical Hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ )	Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )
Monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ )	Ozone ( $O_3$ )
Dioxyde d'azote ( $NO_2^{\bullet}$ )	Acide hypochloreux ( $HOCl$ )
Peroxyde, alkoxyde ( $ROO^{\bullet}$ , $RO^{\bullet}$ )	Peroxydinitrite ( $ONOO^-$ )
Peroxyde lipidique ( $LOO^{\bullet}$ )	Peroxyde lipidique ( $LOOH$ )

(Valko et *al.*, 2007).

### I.3. 1. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

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 ROS sont produites par la réduction de l' $O_2$  d'une part, lors de la production par la mitochondrie d'énergie mobilisable par la cellule, d'autres parts dans diverses réactions enzymatiques. Ces ROS incluent les radicaux libres et les composés réactifs oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans leur couche externe) comme le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'oxygène singulet ( Kalem et *al.*,2012).

### I.3. 2. Espèces réactives de l'azote (NOS)

L'oxyde nitrique (NO) est un radical qui est généré dans les tissus biologiques par des synthèses spécifiques d'oxyde nitrique (NOS), qui métabolisent l'arginine en citrulline avec formation de NO. L'oxyde nitrique est un radical réactif abondant qui agit comme une molécule de signalisation biologique oxydative importante dans de nombreux processus physiologiques variés, notamment la

neurotransmission, la régulation de la pression artérielle, les mécanismes de défense, le relâchement des muscles lisses et la régulation immunitaire (Valko et *al.*, 2007).

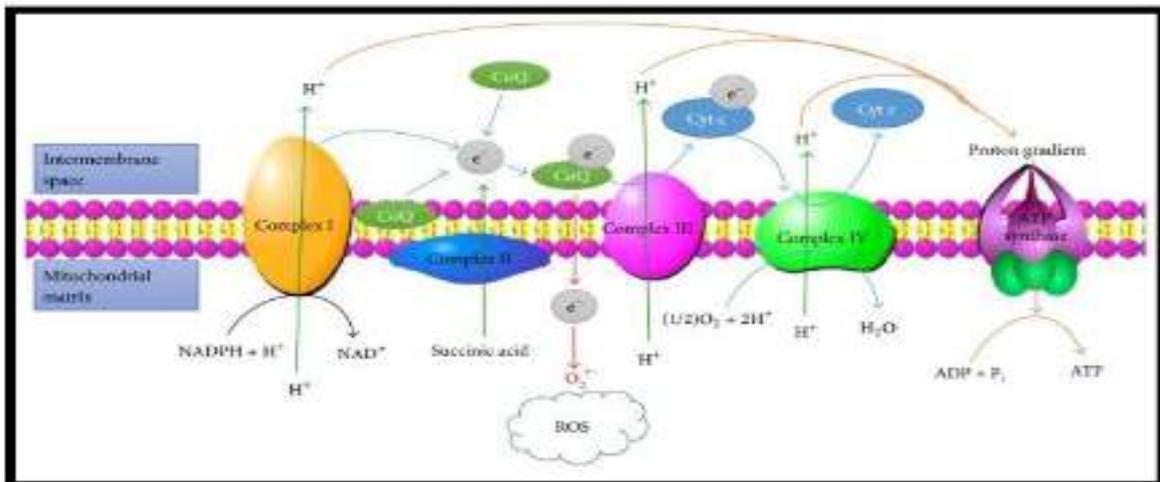
## I.4 Sources de stress oxydatif :

Les ROS et NOS peuvent apparaître ou se former suite à des facteurs exogènes ou endogènes

### I.4. 1 source endogène

Il existe de nombreuses sources d'ROS dans l'organisme dont l'importance varie en fonction des tissus (Droge, 2002) :

- le système enzymatique : la NADPH oxydase et les chaînes respiratoires sont considérées comme une source majeure des ROS ( Bijan et *al.*,2008) (Figure 1).



**Figure 1** : Le transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale et la production d'ERO. Les complexes I – IV sont situés dans la membrane interne de la mitochondrie. Tout d'abord, les complexes I et II peuvent accepter les électrons du NADPH et de l'acide succinique, puis les transporter vers la coenzyme Q (CoQ), tout en libérant des protons. Ensuite, le complexe III peut transférer des électrons de CoQ au cytochrome C (Cyt c). Enfin, le complexe IV envoie des électrons à O<sub>2</sub>, produisant de l'H<sub>2</sub>O. Au cours de ce processus, un gradient de proton est formé, ce qui favorise la synthèse de l'ATP. Si le complexe III ne peut pas recevoir d'électrons de CoQ, ceux-ci seraient acceptés par O<sub>2</sub>, ce qui pourrait produire des ROS et entraîner un stress oxydatif

- Les cellules phagocytaires : activation de macrophages de polynucléaires (Favier, 2006), ces cellules libèrent des produits toxiques, qui incluent le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Baskaran *et al.*, 2017).
- La β-oxydation dans les peroxysomes (Cadenas et Davies, 2000).

### I. 4. 2 sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs capables de donner naissance à des espèces oxygénées réactives :

- Les rayonnements UV et les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ , et de molécules génératrices de radicaux libres (Opara, 2006).
- L'oxyde d'azote et le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) sont à l'origine d'une auto-oxydation des acides gras poly-insaturés (AGPI) des alvéoles pulmonaires (Favier, 2003)
- Une alimentation pauvre en antioxydants, l'action des substances oxydantes : solvants, pesticides, anesthésique, tabac (Lehurch-Michel et *al.*, 2001).
- Les ions de métaux lourds, tels que le fer, le cuivre, le cadmium et le mercure, peuvent induire la génération de radicaux réactifs et provoquent des lésions cellulaires (Birben et *al.*, 2012).

### I.5 Action des radicaux libres

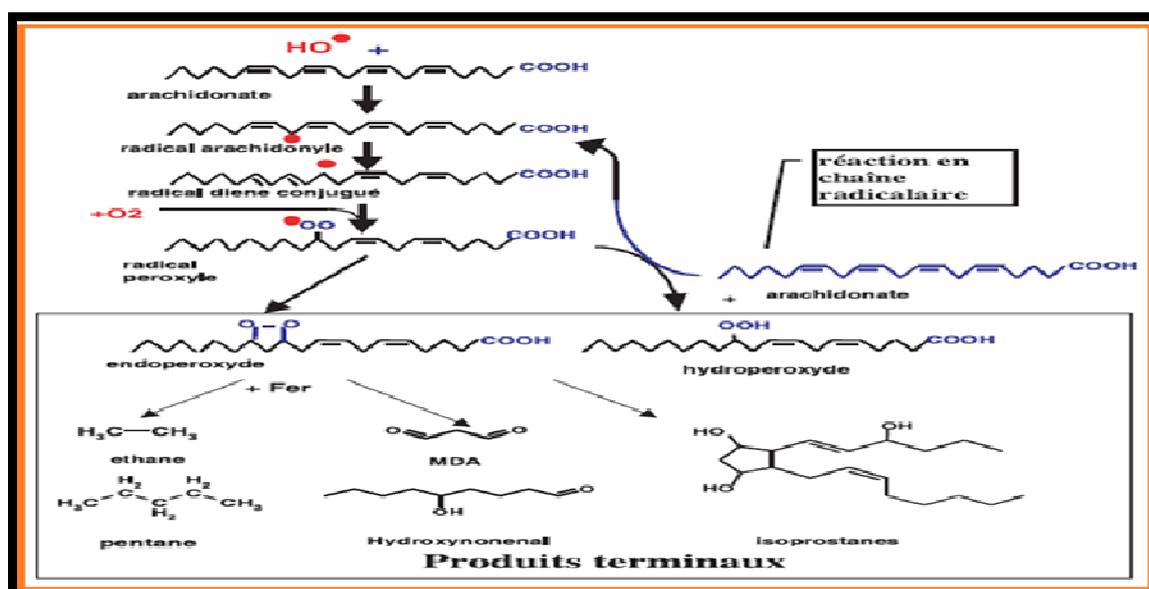
Les radicaux libres sont capables d'entraîner des modifications chimiques altérant gravement les structures protéiques, lipidiques ainsi que les nucléotides (Tessier et Marconnet, 1995).

#### I.5. 1. Les lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont caractérisés par un ou plusieurs éléments de structure chimique ( $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ ) sont sensibles à l'oxydation par les métaux et les radicaux libres oxygénés. Cette attaque déclenche une réaction en chaîne appelée «lipoperoxydation membranaire» (Therond, 2006) (figure 2).

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) pour donner un radical lipidique : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ) qui se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras. Les peroxydes issus de cette cascade de réactions peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en alcanes (éthane, éthylène, pentane ...) et en malondialdéhyde (MDA), une molécule mutagénique pour les cellules bactériennes et eucaryotes.

La réaction de peroxydation se termine lorsque deux radicaux lipidiques se rencontrent ou lorsque le radical lipidique interagit avec un antioxydant liposoluble tel que la vitamine E et par fois par l'intervention de la glutathion peroxydase (Niki et *al.*, 2005 ; Halenget *al.*, 2007).



**Figure 2 :** Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003)

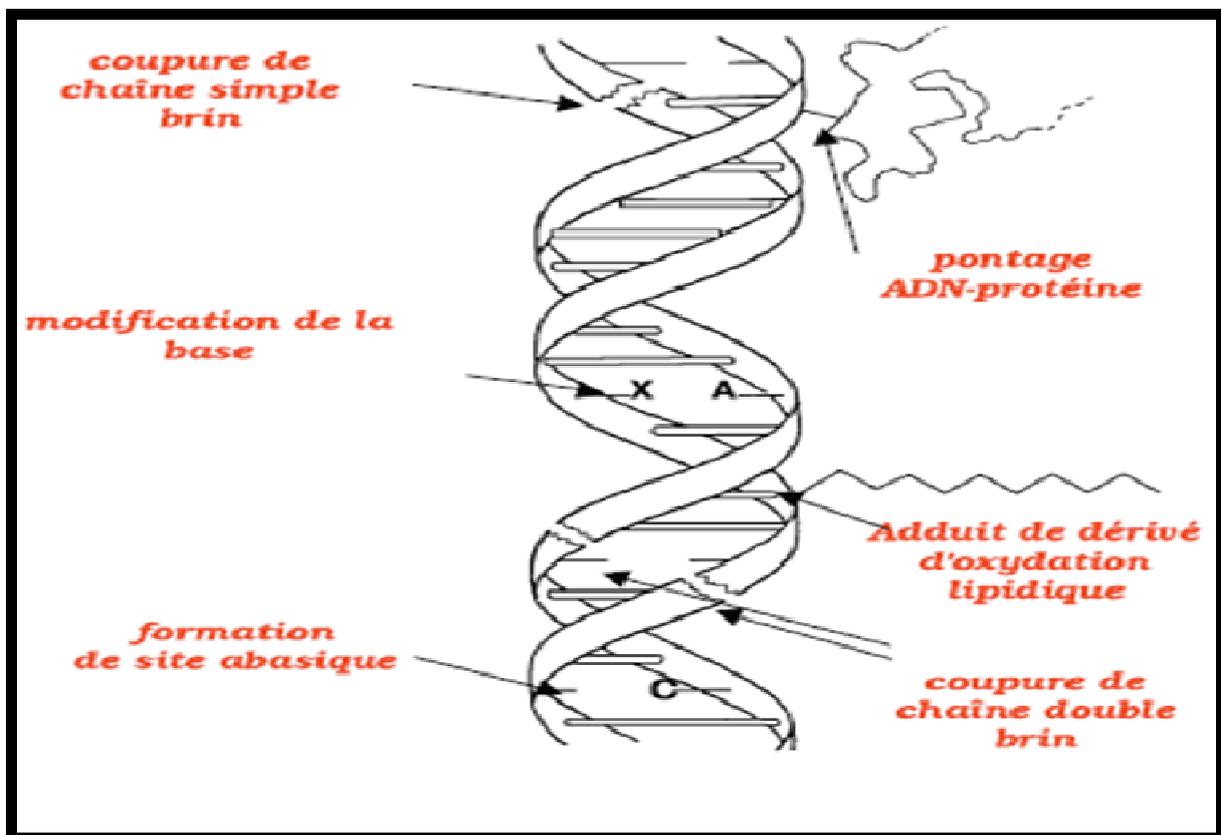
## I.5. 2 Les protéines

Selon Delattre et *al.*, (2005). les acides aminés et les protéines sont une cible pour les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) ; les dommages créés sont de plusieurs types :

- Oxydation de la chaîne polypeptidique suivie d'une fragmentation et /ou de la formation de liaisons croisées intra ou inter chaînes, la formation des réticulations protéine-protéine, et l'oxydation des structures protéiques qui conduit finalement à une perte de fonction.
- oxydation des chaînes latérales des acides aminés, mais également nitration de certaines entre elles,
- acides aminés qui sont particulièrement vulnérables à l'attaque des ERO sont la proline, l'arginine, la lysine et la thréonine. L'oxydation de leurs chaînes latérales conduit à la formation de groupes carbonyle (aldéhydes et cétones) (Burton et *al.*, 2011).

### I.4. 3. ADN

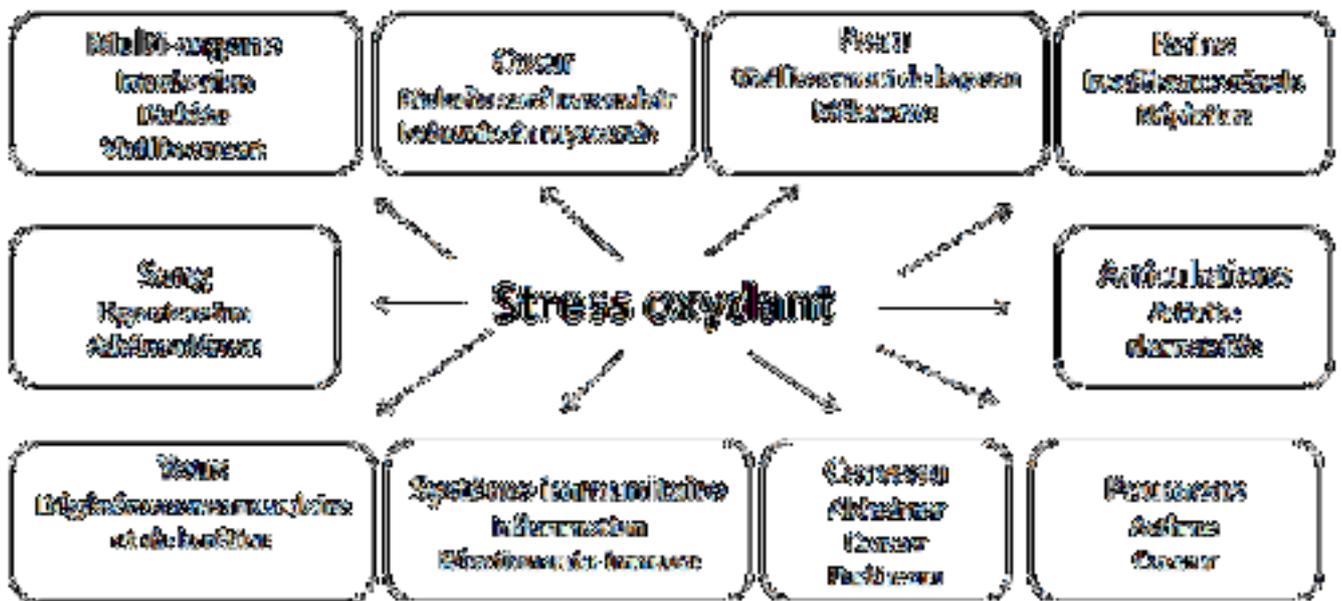
Selon Favier (2003, 2006). l'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène, les sites radicalaires créés au sein de la molécule d'ADN peuvent induire la formation de quatre grandes classes de lésion : modifications des bases nucléiques puriques et pyrimidiques, apparition des sites abasiques suite à l'altération de la liaison entre la base et le désoxyribose, formation des pontages ADN-protéines, et des ruptures de brins qui vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases translésionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome qui peuvent avoir de graves conséquences sur la synthèse des protéines, soit une impossibilité de copier de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par un apoptose (figure 3).



**Figure 3** : Principales classes de dommages de l'ADN (Favier ,2003)

## I.6 Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, le cancer, les troubles cardiovasculaires, la grippe, le syndrome de Down, l'hépatite, l'arthrite rhumatoïde, les maladies neurologiques, les ulcères, la pneumonie, la cataracte, le glaucome et vieillissement (figure 4) (Pandey et Rizvi , 2011) .



**Figure 4** : Les maladies liées au stress oxydatif (Pandey et Rizvi, 2011)

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Robert, 2006).

### II. Antioxydants

Un antioxydant est une molécule ou enzyme capable, en petite quantité, de protéger les cellules des dégâts causés par des radicaux et de prévenir ou retarder l'oxydation d'un substrat libre. Il est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de l'organisme des taux non toxique des radicaux libres. On peut distinguer deux types de systèmes antioxydants (Halliwell, 1991).

#### II.1 Antioxydants endogènes

La production physiologique des ERO est contrôlée au sein des cellules par les systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

Selon (vergani et *al.*, 2004). l'activité des enzymes antioxydantes dépend de cofacteurs minéraux dont le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe).

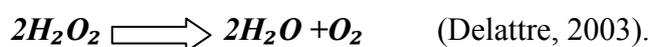
##### II.1.1 Les Superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) représentent un système de défense majeur contre les dommages oxydatifs par la conversion enzymatique d' $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ . Il existe trois types de SOD dans les tissus de mammifères: contenant du zinc (SOD1) localisé dans le cytosol, contenant du manganèse SOD (SOD2) localisée dans la matrice mitochondriale et SOD extracellulaire (SOD3). SOD1, SOD2 et SOD3 sont chacune fortement exprimées dans le rein normal, principalement dans les tubules rénaux, par rapport aux autres organes. Une étude récente suggère que la SOD1 est une enzyme antioxydante majeure dans la régulation du stress oxydatif au cours d'une lésion rénale progressive (Sung et *al.*, 2013)



##### II.1.2 Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme dépendante du Fe, responsable de la réduction de  $H_2O_2$  en l'eau, est exprimée dans la plupart des cellules, organes et tissus et à de fortes concentrations dans le foie et les érythrocytes. Elle peut aussi être une enzyme clé dans la défense antioxydante dans le rein lors d'une altération. (Sung et *al.*, 2013)



### II.1.3 Glutathion peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase est une enzyme dépendante du sélénium qui peut convertir le peroxyde d'hydrogène en eau. Dans la réaction de glutathion peroxydase, le glutathion est oxydé en disulfure de glutathion, qui peut être reconverti en glutathion par la glutathion réductase dans un processus consommant du NADPH (droge, 2002)



### II.1.4 Glutathion réductase

La glutathion réductase (GR) a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH produisant du NADP<sup>+</sup> qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (Smith et *al.*, 1988).



## II.2. Antioxydants exogènes

Lorsque la production des RL devient trop élevé, nos réserves antioxydants peuvent devenir insuffisantes pour neutraliser les effets néfastes de ces RL, dans ce cas, une autre source exogène nous est indispensable pour combler les insuffisances dues au manque des antioxydants endogènes.

### II.2.1 La Vitamine E

La vitamine E appelée aussi  $\alpha$ -tocophérol, est apporté par les aliments, elle a un rôle stabilisateur des lipides membranaires, elle agit en inhibant la peroxydation des AGPI (Salle, 2005). en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables et se transforme à son tour en radical  $\alpha$ -tocophéroxyle ( $\alpha\text{-T}^{\bullet}$ ) (Blokhina et *al.*, 2003). puis il sera régénéré par la vitamine C (Favier, 2003).

### II.2.2 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont un groupe de pigments végétaux formés de longues chaînes aliphatiques alternant simples et doubles liaisons et permettant une délocalisation des électrons le long de cette chaîne (Halliwell et Gutteridge, 2008).

## Chapitre II : Les systèmes de défense antioxydants

---

les  $\beta$  carotènes sont des précurseurs de rétinol ( vitamine A), ce sont des puissants anti radicalaires, ils désactivent les radicaux peroxydes  $ROO\cdot$  et alkyles  $R\cdot$  et ils captent l'oxygène singulet, ils protègent également contre les réactions de photosensibilisation ( Delattre et *al.*, 2005).

### II. 2. 3 La Vitamine C

L'acide ascorbique (ascorbate, vitamine C) est un antioxydant hydrosoluble que l'on trouve chez les animaux et les plantes, l'ascorbate est un capteur efficace et un antioxydant réducteur, capable de donner ses électrons aux ERO et de les éliminer et donner le radical ascorbyle qui est relativement stable. Ce radical peut perdre son électron et être transformé en acide déshydroascorbique ou régénéré sous sa forme réduite en obtenant un électron d'un autre agent réducteur, tel que GSH (Kohen, 2002

### II. 2.4 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe important de composés polyphénoliques, ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. ils ont une grande capacité antioxydante, en effet, ils sont capable de protéger les lipides contre les dommages oxydatifs (Kumar et *al.*, 2013). de piéger les RL directement par le don d'un atome d'hydrogène (Procházková et *al.*, 2011).

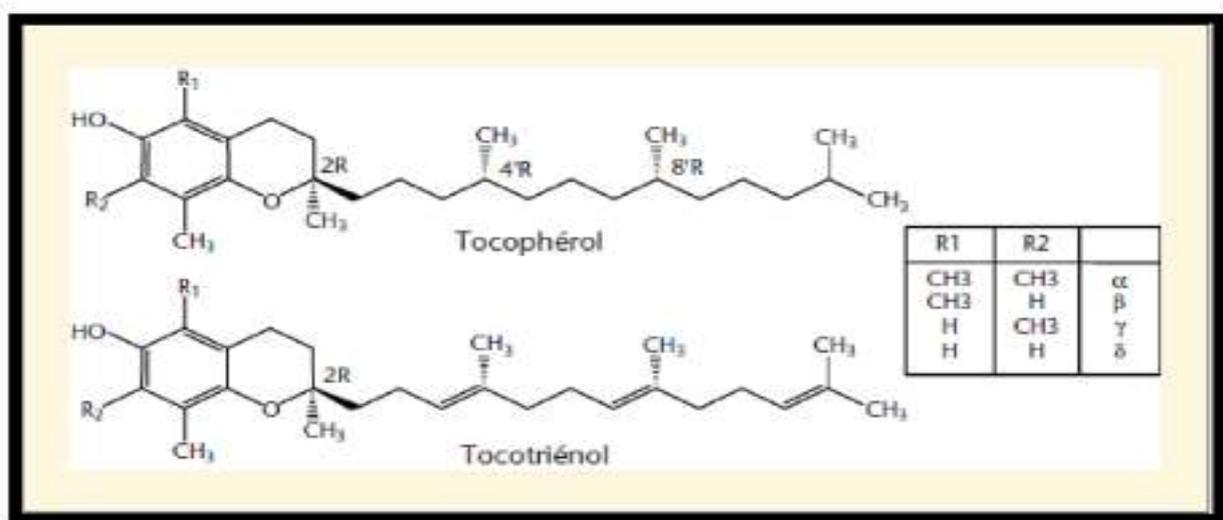
### II. 2. 5 La taurine

La taurine (acide 2-aminoéthanesulfonique) est un acide aminé soufré, présent à des concentrations milli molaires dans de nombreux tissus animaux, il peut agir en tant qu'antioxydant direct en éliminant les espèces réactifs d'oxygène. A côté de son rôle dans les défenses antioxydantes, elle participerait aussi dans le maintien de l'homéostasie du calcium l'osmorégulation et la stabilisation des membranes (Yu et Kim, 2009)

### III. La vitamine E

#### III.1 Généralité

La vitamine E est une vitamine liposoluble avec un haut pouvoir antioxydant (Lien et *al.*, 2008). elle existe sous de multiples formes naturelles, qui comprennent : l' $\alpha$ -tocophérol, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol, et de  $\delta$ -tocophérol ainsi que les formes de tocotriénols de chacun d'entre eux (Cook-Mills et *al.*, 2010) (Figure 5).



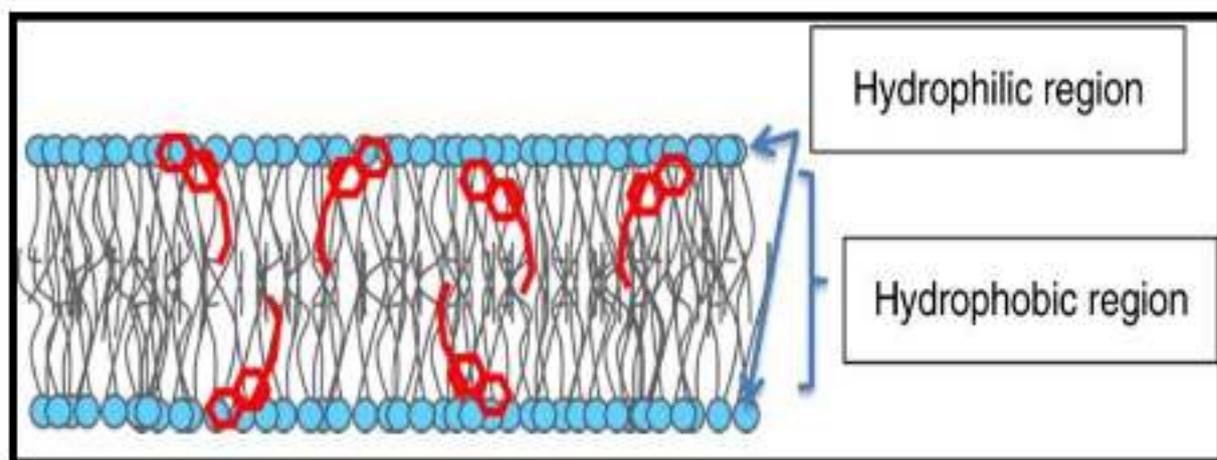
**Figure 5** : La structure des différents isomères de la vitamine E ( Lindrier , 2011)

La vitamine E n'étant pas synthétisée par l'Homme, celui-ci doit donc subvenir à ses besoins via son alimentation, parmi ces aliment, les graines, les noisettes, les huiles végétales ; 50 à 70% de la vitamine E provient des matières grasses végétales ;15 à 20% des légumes et des fruits ; environ 10% de la viande, du poisson et des œufs, 2 à 10% du pain, des céréales et des pommes de terre et moins de 2% des produits laitiers( Léger,2000)

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

Au niveau cellulaire, la vitamine E est présente à forte concentration dans les membranes et surtout les membranes mitochondriales (Molenaar et *al.*, 1973 ). La vitamine E est orientée, les groupes

de tête chromanol polaire sont exposés à la surface de la membrane et la queue se fixe au sein des membranes lipidiques ( Hofius et *al.* , 2003) (figure 6).



**Figure 6 :** La localisation d' $\alpha$  tocophérol dans la bicouche lipidique de la membrane (Raederstorff et *al.*, 2015).

### III. 2 Propriétés chimiques de l' $\alpha$ -T

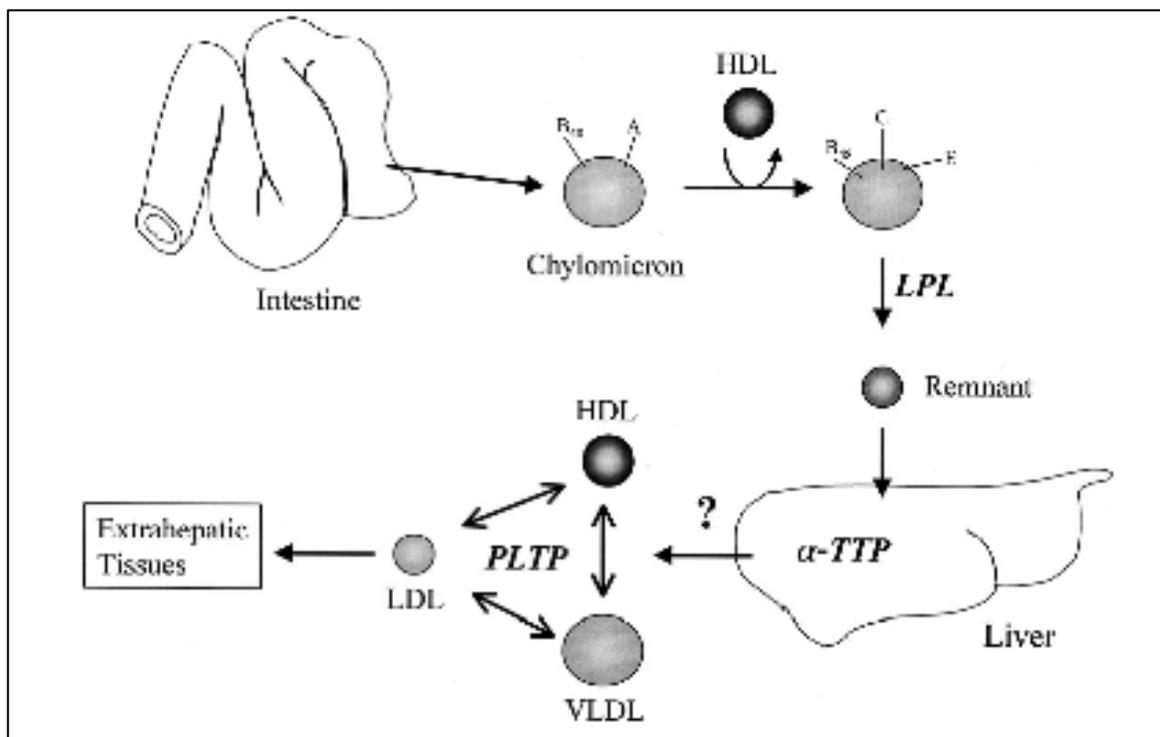
La structure chimique d' $\alpha$ -T est composée d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri méthyle auquel est rattachée une chaîne latérale à 16 atomes de carbone, de structure isoprénique (figure 5).

L' $\alpha$ -T pure est un liquide visqueux huileux et jaunâtre qui s'oxyde facilement lorsqu'elle est exposée à la lumière, à l' $O_2$  et aux métaux de transition (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).

### III. 3 Absorption et métabolisme de la vitamine E

La vitamine E nécessite, en raison de son caractère hydrophobe, des mécanismes de transport spéciaux dans l'environnement aqueux du plasma, et au niveau des cellules. Chez l'homme, la vitamine E est absorbée dans la partie proximale de l'intestin en fonction de la quantité de lipides alimentaires, de bile et d'estérases pancréatiques. Elle est émulsionnée avec les composants liposolubles de l'aliment. La lipolyse et l'émulsion des gouttelettes lipidiques formées conduisent ensuite à la formation spontanée de micelles mixtes, qui sont absorbées par la membrane passive de la muqueuse avec les triglycérides, les phospholipides, le cholestérol et les tocophérols sont réassemblés en chylomicrons par le Golgi des cellules de la muqueuse. Les chylomicrons sont stockés sous forme de granules de sécrétion et éventuellement excrétés par exocytose dans le compartiment lymphatique d'où ils atteignent la circulation

sanguine par le canal thoracique. Ils sont ensuite transformés en chylomicrons résiduels, par la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme attachée à la surface de l'endothélium capillaire (Azzi et Stocker, 2000) (Figure 7).



**Figure 7 :** Absorption, transport et distribution de la vitamine E (Azzi et Stocker. 2000).

Le devenir des différentes formes de vitamine E est alors très différent : le  $\gamma$ -tocophérol sera excrété dans la bile, alors que l' $\alpha$ -T sera majoritairement incorporé dans les VLDL naissants. Cet assemblage est assuré par  $\alpha$ -T Transfer Protein, une protéine cytosolique du foie qui permet l'incorporation d' $\alpha$ -T au sein des VLDL, avant leur relargage dans la circulation sanguine (Cuvelier et al., 2003).

La protéine du transfert plasmatique des phospholipides, qui est connue pour favoriser l'échange de phospholipides et d'autres composés amphiphiles entre les structures lipidiques, facilite l'échange du  $\alpha$ -T entre les HDL et les LDL (Desrumaux et al., 1999).

Approximativement la moitié du  $\alpha$ -T plasmatique est présente dans les LDL et l'autre moitié est distribuée entre les VLDL et les HDL (Cuvelier et al., 2003).

### III. 4 Action antioxydant de vitamine E

La vitamine E est reconnue comme antioxydant, elle inhibe la peroxydation lipidique par la captation de radical peroxyde formé avant qu'il attaque le lipide, pour produire les hydroperoxydes (LOOH).

La partie non-hydrophobe de l' $\alpha$ -T contient le groupement hydroxyle (OH), dont l'atome d'hydrogène est facilement amovible (Sachdeva et *al.*, 2014). Les tocophérols perdent cet atome, qui est donné au peroxyde, ce qui entraîne la formation de radical tocophéroxyl (Figure 8) (zarka et *al.*, 2012). le radical résultant est relativement stable et dans des circonstances normales, insuffisamment réactif pour initier la peroxydation lipidique elle-même, qui est un critère essentiel d'un bon antioxydant.

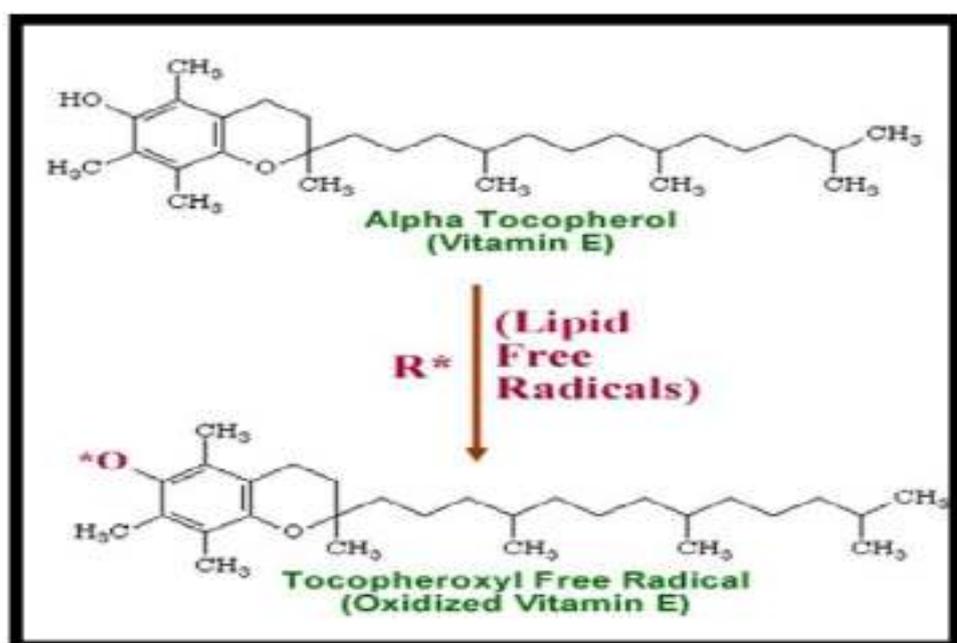
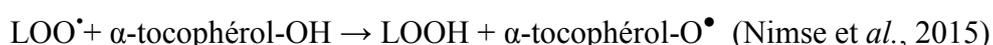
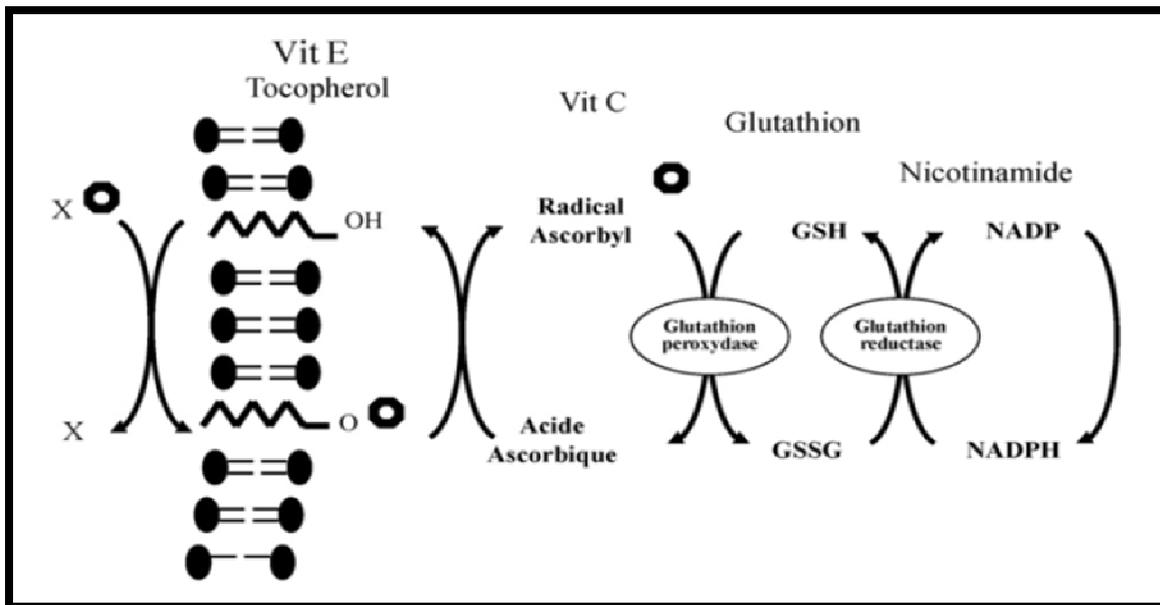


Figure 8 : La forme oxydée de la vitamine E (Biswas, 2016).

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

### III. 5 La régénération de la vitamine E

La vitamine E radicalaire est régénérée par la vitamine C à l'interface cytosolique de la membrane, et l'interaction entre l'ascorbate (Asc) et le radical tocophéroxyl serait facilitée par le positionnement d'un noyau chromanoxyle à proximité de la surface de la membrane (Figure 9), la queue du tocophérol est bien ancrée dans la double couche lipidique et le noyau chromanol « flotte » comme un cerf-volant au contact de l'interface phase aqueuse/phase lipidique afin de rendre accessible à l'ascorbate (Guilland, 2011).



**Figure 9:** La régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique (Xavier, 2009).

### III. 6 Activité pro-oxydante

Les effets de la vitamine E puissent ne pas être uniformément bénéfiques, voire même être nocifs (Burton,1994), plusieurs chercheurs ont montré que l' $\alpha$ -T à forte concentration peut avoir des effets néfastes et qu'elle agissait comme un pro-oxydant en absence de réducteurs de radical  $\alpha$ -T ( Landrier et *al.*, 2010) .

L'oxydation de l' $\alpha$ -T conduit à un radical  $\alpha$ -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' $\alpha$ -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' $\alpha$ -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.

*In vitro* des dommages oxydatifs de l'ADN sont induite en présence de  $\text{Cu}^{2+}$ , 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 ( $\text{Mn}^{+}$ ) 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).

## **Partie II : Etude Expérimental**

Au cours de cette étude qui s'est étalée du mois de Février au mois de juillet et qui avait pour objectif d'évaluer les effets de la supplémentation de différentes doses d' $\alpha$ -T sur quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif et sur l'histologie du tissu cardiaque ; à nécessité la réalisation d'une expérimentation animale au niveau de l'animalerie du centre de recherche et de développement (Saidal/ El-harrach), le dosage biochimique aux niveau de laboratoire de biotechnologie végétale de l'université de Blida 1,et enfin une préparation de coupe histologique cardiaque au niveau du service d'anatomie pathologie de l'hôpital Fares Yahia (Kolea)

### I.1 Matériel

#### I.1.1 Matériel non biologique (annexe I)

#### I.1.2 Matériel biologique

##### I.1.2.1 Animaux étudiés

40 souris males de souche NMRI Albinos âgés de trois semaines provenant de l'animalerie du centre de recherche et de développement ( Saidal/ El-harach), possède un système immunitaire peu sollicité, cette souche très sensible à toute contamination, est un outil de choix dans l'élaboration, ont constitué 8 lots repartir dans 8 cages à raison de 5 souris par cage. L'élevage a été conduit dans des conditions favorables à leur croissance : température 25C°, un cycle de lumière de 12lumiere/12 obscurité ils 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, l'expérimentation à duré 5 semaines (figure 10)

**Figure 10** : Expérimentation animal (photo original).

### I.1.2.2 Préparation du régime

L'aliment a été fournis par l'Office National des Aliments de Bétail (ONAB) (**annexe II**) et est apportée aux animaux sous forme de poudre dans des boites de Pétri à raison de 5 à 7g /jour/souris et changé chaque jour, l'eau est donné *ad libitum*.

Après sevrage et une semaine d'adaptation, la supplémentation de l' $\alpha$ -T à différentes doses allant de 700 à 1200 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment a été incorporée au régime (tableau II).

**Tableau II** : La préparation de différentes doses administré

RS	souris témoins nourris avec un régime standard
RSE <sub>700</sub>	souris nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 700 mg d' $\alpha$ -tocophérol /kg d'aliment
RSE <sub>900</sub>	souris nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 900 mg d' $\alpha$ -tocophérol /kg d'aliment
RSE <sub>1000</sub>	souris nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 1000 mg d' $\alpha$ -tocophérol /kg d'aliment
RSE <sub>1050</sub>	souris nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 1050 mg d' $\alpha$ -tocophérol /kg d'aliment
RSE <sub>1100</sub>	souris nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 1100 mg d' $\alpha$ -tocophérol /kg d'aliment
RSE <sub>1150</sub>	souris nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 1150 mg d' $\alpha$ -tocophérol /kg d'aliment
RSE <sub>1200</sub>	souris nourris avec un régime standard (RS) supplémenté avec 1200 mg d' $\alpha$ -tocophérol /kg d'aliment

### **I.1.2.3 sacrifice et prélèvement du Cœur**

A la fin de l'expérimentation (5 semaines), les souris de chaque lot sont pesées puis anesthésiées par l'éther éthylique et sacrifier par dislocation cervicale après 12 heures de jeûne.

La souris est placée sur le dos, écarter et fixer les 4 pattes de l'animal par des aiguilles en pinçant la peau et la découpant à l'aide des ciseaux fins juste au-dessus des organes sexuelles, jusqu'à atteindre la tête de la souris, fixer la peau sur la planche à disséquer, on découpe délicatement le tissu conjonctif, en utilisant la sonde cannelée afin de ne pas abîmer les organes internes. Les organes sont alors découverts, on peut facilement observer le foie, la rate, l'estomac, et les intestins.

Une fois le système digestif de la souris découvert on découpe la cage thoracique. On découvre alors les poumons et le cœur de la souris, on récupère le cœur, qu'on rince avec de l'eau physiologique et qu'on pèse.

Un premier fragment du cœur de chaque souris est conservé dans du formol à 10%, pour la réalisation des coupes histologiques. Les autres fragments du cœur sont maintenus à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant (les protéines cardiaques, le MDA et l'activité enzymatique de la catalase).

## **I.2 Méthodes**

### **I. 2-1 Dosage des protéines**

#### **A. Principe (*Lowry et al., 1951*)**

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, 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 cœur
- l'échantillon est broyé par un broyeur homogénéisateur de Potter Thomas pendant 1min
- 1ml de TCA à 1% est mis dans un tube en verre contenant 100  $\mu$ 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 (annexe III)**

#### **c) Dosage des protéines**

- 1ml de la solution A est ajouté à 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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).

### **C) Préparation du 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 (0-200 $\mu$ l), complétés avec de l'eau distillée (annexe IV)

)

### I.2-2 Dosage de malondialdéhyde

#### A. Principe (Draper, 1993)

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 cœur sont broyés en présence de 9 ml de tampon phosphate KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 M à pH=7,4)
- 1ml de TCA à 10 %, 100 µl de 500 ppm BHT 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.
- le 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:

$$[MDA] = \frac{DO \times 1000}{\epsilon \times l} \quad [n \text{ moles/ mg de protéines}]$$

- ❖ [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).

### I.2-3 Dosage de la catalase

L'activité de la catalase plasmatique est déterminée selon la méthode d'Aebi et *al.*, (1984).

#### A. principes

Le principe repose sur la décomposition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de la source enzymatique catalase. La disparition du peroxyde d'hydrogène est mesurée en spectrophotométrie à 240 nm.

#### B. modes opératoires

##### a) Préparation des solutions (annexes V)

##### b) Lecture de la Densité Optique

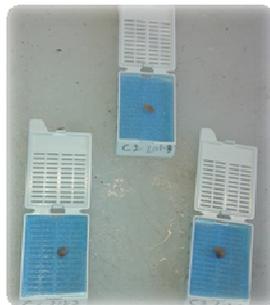
$$\text{Activité de la catalase} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min/mg prot}) = \frac{\frac{V}{v} \times 2.3 \times \log \frac{A_1}{A_2}}{X}$$

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

- ❖ V: volume de l'échantillon
- ❖ v: volume total
- ❖ Δt: temps de décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- ❖ A1: absorbance à t<sub>0</sub>
- ❖ A2: absorbance à t(3min)
- ❖ X : quantité des protéines mg/ml

### I.3 Réalisation des coupes histologiques (Martouja et Martouja, 1967)

Les fragments du cœur de chaque souris sont retirés du Formol 10 % et sont placés dans des cassettes d'inclusion (figure11)



**Figure 11** : Cassettes d'inclusion (photo originale)

#### A. Fixation

Les cassettes sont mis dans du formol 10 % pendant 24 h. Il est important de noter que la fixation est une étape critique de la préparation des tissus, puisqu'un tissu mal préservés ne peut être reconstruit.

#### B. Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés par un automate de déshydratation (circulation) (figure 12)



**Figure 12** : automate de déshydratation (photo originale)

Mettre dans des bains successifs d'alcools de concentration croissante (70%, 90% et 100%), puis dans 3 bains successifs de xylène et enfin dans deux bains de paraffine liquide pour laver les excès de solvant (tableau III)

**Tableau III** : mode opératoire de l'automate

Station	Réactifs	Temps
01	Formol	1H
02	Alcool 70	2H
03	Alcool 80	2H
04	Alcool 95	2H
05	Alcool 100	2H
06	Alcool 100	2H
07	Alcool 100	2H
08	Xylène	2H
09	Xylène	2H
10	Xylène	2H
11	Paraffine	2H
12	Paraffine	2H

### C. Inclusion/ enrobage

Dans un moule métallique on met au fond quelques gouttes de paraffine liquide à l'aide du distributeur de paraffine.

Le fragment est maintenu par des pinces en veillant au sens pour obtenir une coupe de tous les tissus, on rajoute de la paraffine liquide, le couvert de la cassette, puis de nouveau de la paraffine liquide, on place l'inclusion au plaque réfrigérante. Notons que les moules sont met au congélateur pour faciliter le démoulage (figure 13).



**Figure 13 :** Appareils d'enrobage (d'inclusion) (photo originale)

### D. les coupes

Après le refroidissement, maître en place du bloc sur le microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns) (figure14) les coupes sont réalisées se forme de ruban.

Le ruban est maintenu dans un bain marie puis récupéré sur les lames, il doit être séchées avant la coloration à l'étuve à 8°C pendant 30 à 45 min



**Figure 14 :** microtome (figure originale)

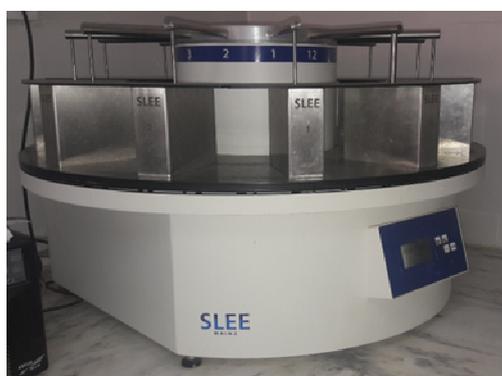
### E. Coloration

Les étapes de la coloration sont les suivantes : (figure 15)

- ✓ **Déparaffinage** : il se fait par le passage des coupes dans un bain de xylène pendant 20min, et sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer
  
- ✓ **Réhydratation** : c'est le passage dans des bain d'alcool de degrés décroissants de 100°C à 70°C, et se termine par un traitement à l'eau de rinçage.

- ✓ **Coloration à l'Hématoxyline-Eosine** : c'est une coloration universelle de routine qui permet de mettre en évidence les principaux éléments morphologiques des pièces (noyaux, cytoplasme, collagène) en associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Mayer (colorant basique) qui colore le noyau en bleu et l'éosine (colorant acide) colore le cytoplasme en rose. Elle se réalise selon les étapes suivantes :

Passage des lames à l'hématoxyline de Mayer pendant 2min pour colorer les noyaux en bleu, rincer à l'eau, faire un Passage dans l'acide ammoniac puis à l'Eosine pendant 5 min pour colorer les cytoplasmes en rose, rincer rapidement à l'eau et faire tremper à l'alcool puis au xylène pendant 20 min, enfin les lames sont séchées à l'air libre.



**Figure 15** : coloration Hématoxyline / Eosine (photo originale)

### F. Montage et observation

On place une goutte de xylène sur la lame, puis on dépose la lamelle que l'on fixe soigneusement avec une pince. Observation au microscope photonique à Gr: X40, prise de photos micrographiques.

#### I.4 Etude statistique

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

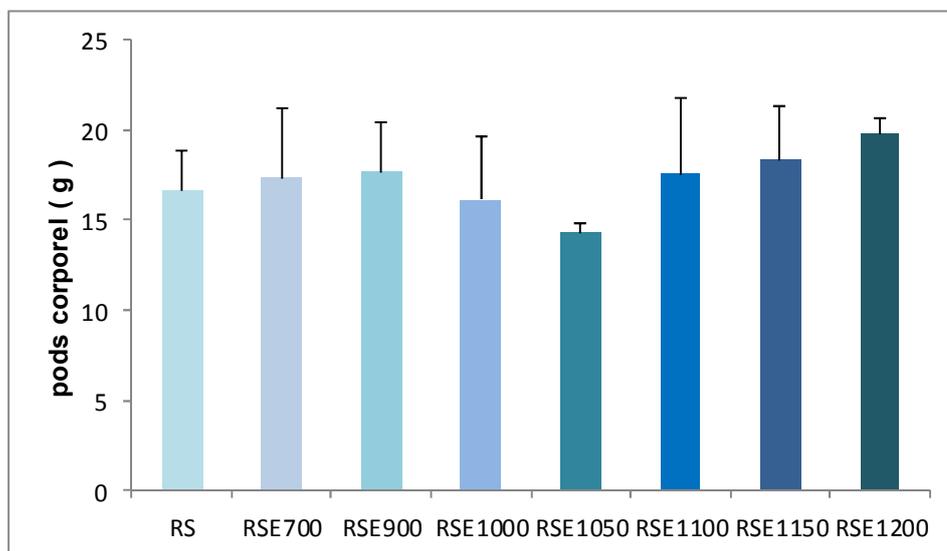
- ❖ significative lorsque ( $P \leq 0,05$ ),
- ❖ très significative comparant au témoin ( $P \leq 0,01$ ),
- ❖ hautement significative comparant au témoin ( $P \leq 0,001$ ).

Avec (P): seuil de signification

## II.1. Modifications physiologiques

### II.1-1 Effets de la supplémentation en l' $\alpha$ -T à différentes doses sur le poids corporel

La variation du poids corporel des souris témoins et traités par les différentes doses d' $\alpha$ -T, sont représentés dans la Figure 16 (annexe VI).



**Figure 16 :** Variation du poids corporel chez les souris, chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type

Les résultats que nous avons obtenus lors du suivi de la variation du poids corporel des souris nourries avec un régime contenant différentes doses d' $\alpha$ -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T /kg d'aliment) ; ont montré une légère augmentation non significative du poids corporel pour les lots RSE<sub>700</sub>, RSE<sub>900</sub>, ces résultats corroborent avec ceux de Garrido-Polonio et *al.* (2004), qui lors de leurs études ont montré que l'administration de 600 mg d' $\alpha$ -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 peroxydes lipidiques.

Nous avons noté une diminution non significative du poids corporel aux doses de 1000 et 1050 mg d' $\alpha$ -T / kg d'aliment.

Eder et *al.*, (2002), ont signalé que la croissance n'avait pas été affectée chez des rats mâles Sprague-Dawley en croissance nourris avec des régimes supplémentés en 1000 mg d' $\alpha$ -T / kg d'aliment sur une période de 8 semaines.

Des doses plus élevées de l' $\alpha$ -T ont été utilisées par d'autres auteurs à savoir Kiron et *al.* (2004), ces derniers ont confirmé qu'aucune différence du poids corporel n'a été obtenue chez des poissons alimentés avec des régimes supplémentés avec 1500 mg d' $\alpha$ -T / kg d'aliment.

Pour les lots auxquelles nous avons administré les doses de 1100,1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T / kg d'aliment, on a observé une ré-élévation non significative du poids corporel.

Ortuño et *al.* (2000), n'ont obtenus aucune différence significative du taux en poids corporel chez la daurade royale (*Sparus aurata* L) après 45 jours.

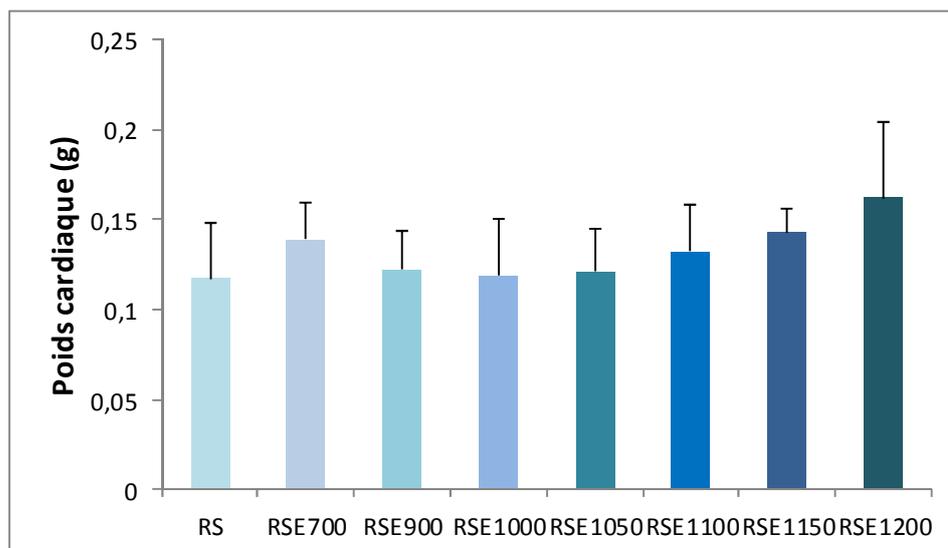
Nos résultats corroborent avec ceux de Abdo et *al.*(1986) qui ont montré que lors de l'administration de dose croissantes d' $\alpha$ -T ( 125, 500 et 2000 mg  $\alpha$ -T /kg d'aliment) à des rats mâles et ceci pendant 13 semaines n'a eu aucun effet sur le poids corporel, ils ont émis qu'ils n'y avait pas de lien entre les doses élevées en  $\alpha$ -T et la croissance pondérale.

En 2006, Ayse Ogutcu et *al.*, ont eux aussi réalisé une étude pendant 7 semaines sur des rats Wistar mâles nourris avec des doses élevées en  $\alpha$ -T et n'ont obtenus aucun changement significatif.

Nous pouvons conclure qu'effectivement les doses élevées d' $\alpha$ -T n'ont pas affecté la croissance des souris lors de notre étude.

### **II.1-2 Effets de la supplémentation en $\alpha$ -T à différentes doses sur le poids cardiaque**

Les résultats concernant la variation du poids du tissu cardiaque lors de la supplémentation de différentes doses d' $\alpha$ -T (700, 900, 1000, 1050, 1100,1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T /kg d'aliment), ont montré une augmentation non significatives par rapport au lot témoin RS (Figure17) .



**Figure 17:** Evaluation des poids cardiaque chez les souris. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  écart-type.

Les résultats de deux études réalisées, l'une en 2006 et l'autre en 2010, corroborent aux nôtres, toutes deux ont étudié l'effet de la supplémentation de l' $\alpha$ -T à doses élevées :

La première réalisée par Ayse Ogutcu et *al.* Qui n'ont obtenus aucun changement significatif du poids cardiaque du groupe traité à la vitamine E et ceci comparer au témoin et la seconde réalisé par Nascimento et *al.* Et qui avait pour objectif l'effet d'une dose pharmacologique d' $\alpha$ -T sur le tissu cardiaque de rats wistar adultes. Cette étude a montré que l'administration d'une quantité de 250 mg/kg de rat/ jour d'  $\alpha$ -T sur une période de 7 semaines induisait la diminution du poids de tissu cardiaque mais de manière non significative

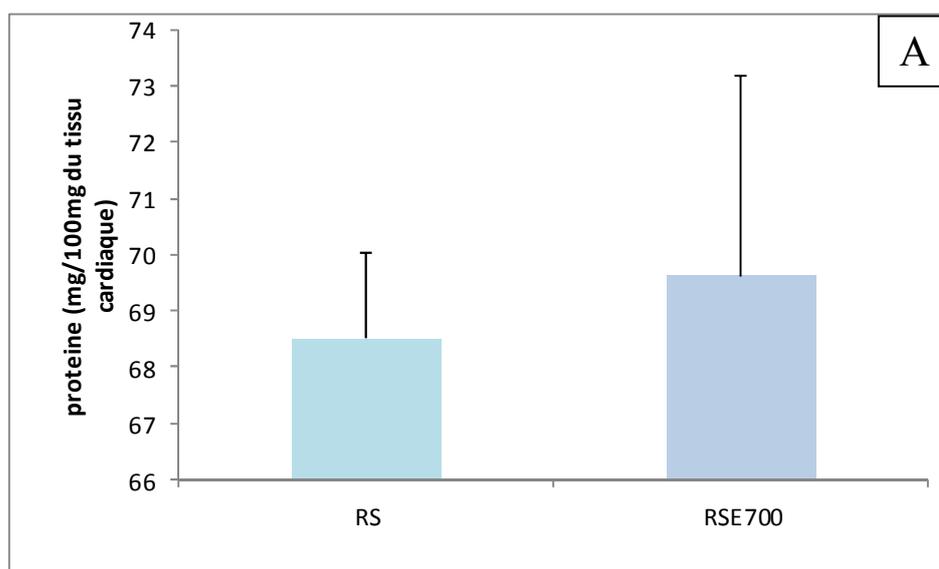
### II.2. Effet de la supplémentation en $\alpha$ -T sur quelques paramètres du stress oxydant et sur l'histologie du tissu cardiaque

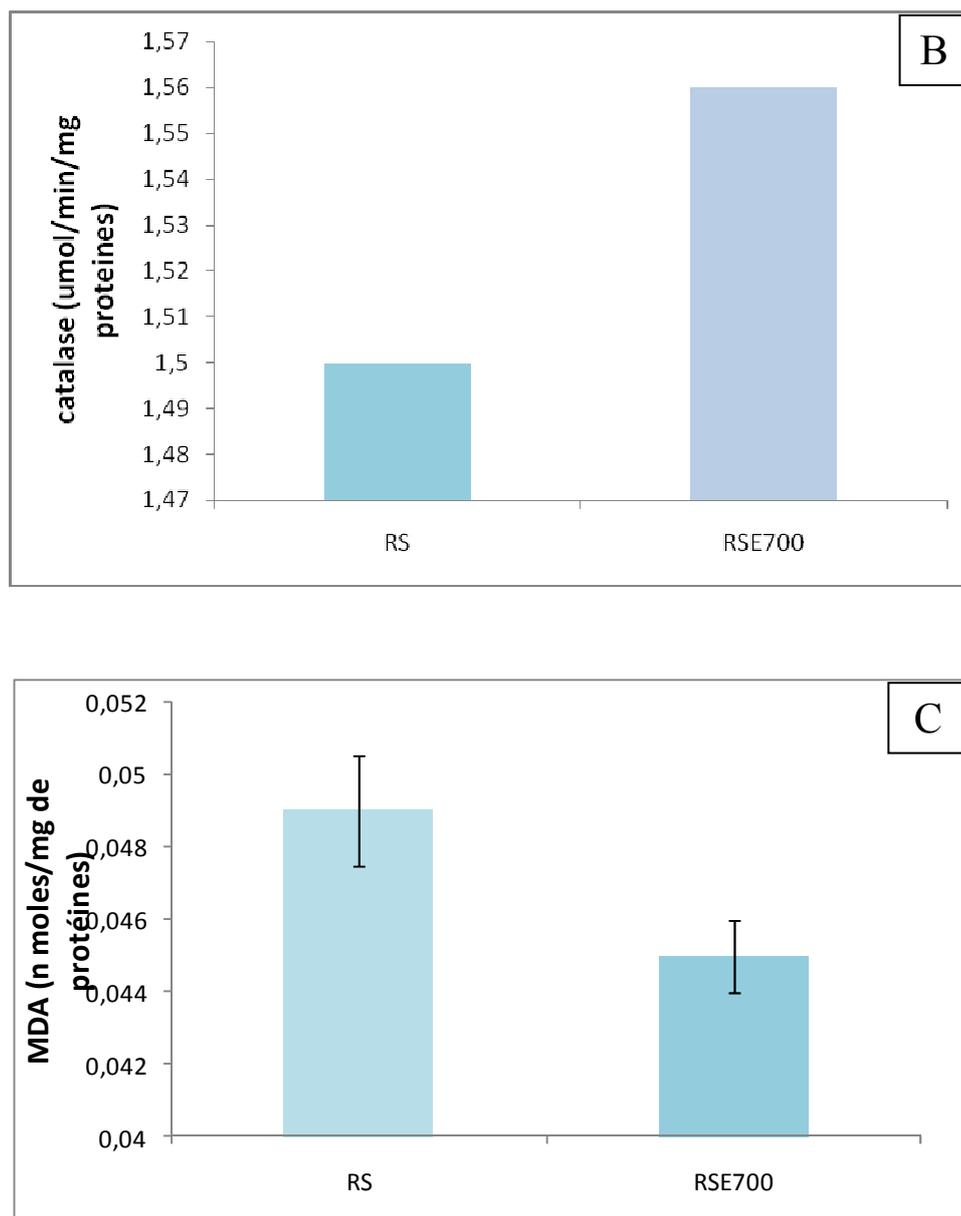
#### II.2. 1 Effets des différents régimes sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cardiaque

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 cardiaques, du MDA, et de l'activité enzymatique de la CAT (Annexe VI) chez les souris témoins et ceux traités par différentes doses d' $\alpha$ -T.

##### II.2.1. 1 Effets de la supplémentation en 700 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cardiaque

Les résultats obtenus lors du dosage des paramètres biochimiques (catalase, MDA et les protéines) du lot 700, ont révélé une augmentation non significative du taux en protéines (figure 18.A) et de la catalase (figure 18.B) accompagnée d'une diminution non significative du MDA (figure 18.C)





**Figure 18** : Effet de la supplémentation en 700 mg d'α-T/kg d'aliments sur la teneur en protéines (A), l'activité de la catalase (B) le taux en MDA (C) du tissu cardiaque chez des souris par rapport au lot RS. Chaque barre représente la moyenne ± écart type.

L'ensemble des résultats obtenu laisse supposer que la dose 700 mg d'α-T/ kg de régime n'a pas eu d'effets sur les paramètres biochimiques dosés et ce comparer au témoin.

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.

Selon Pryor (2000), l' $\alpha$ -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.

En 2008, l'étude d'Hajiani et *al.* a porté sur le traitement de rats males adultes de souche sprague-dawley par administration intramusculaire bihebdomadaire de 100 et 300 mg/kg de la vitamine E sur des périodes de 2, 3 et 6 semaines ont montré que la phase antioxydante été caractérisée par une augmentation légère de la vitamine E des concentrations plasmatiques, une diminution du MDA, plus une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes, mais sans changement significatifs de la catalase, ils expliquent ces variations comme le résultat de l'effet antioxydant de la vitamine E et son administration à certaines doses et sur des périodes courtes, permettait l'augmentation des enzymes antioxydantes.

Nombreuses sont les études qui mettent en évidence l'effet antioxydant de la vitamine E après induction d'un stress oxydatif, nous en citerons deux :

La première réalisée par Satoshi et *al.*, en 1989 a étudié les effets de la vitamine E sur les taux sériques de malondialdéhyde à la suite d'un exercice intense et exhaustif chez l'homme, elle a montré que la concentration en MDA dans l'essai de vitamine E était nettement inférieurs à celui du groupe témoin, ces auteurs ont déduit que la supplémentation alimentaire de la vitamine E peut inhiber la peroxydation lipidique après l'exercice exhaustif.

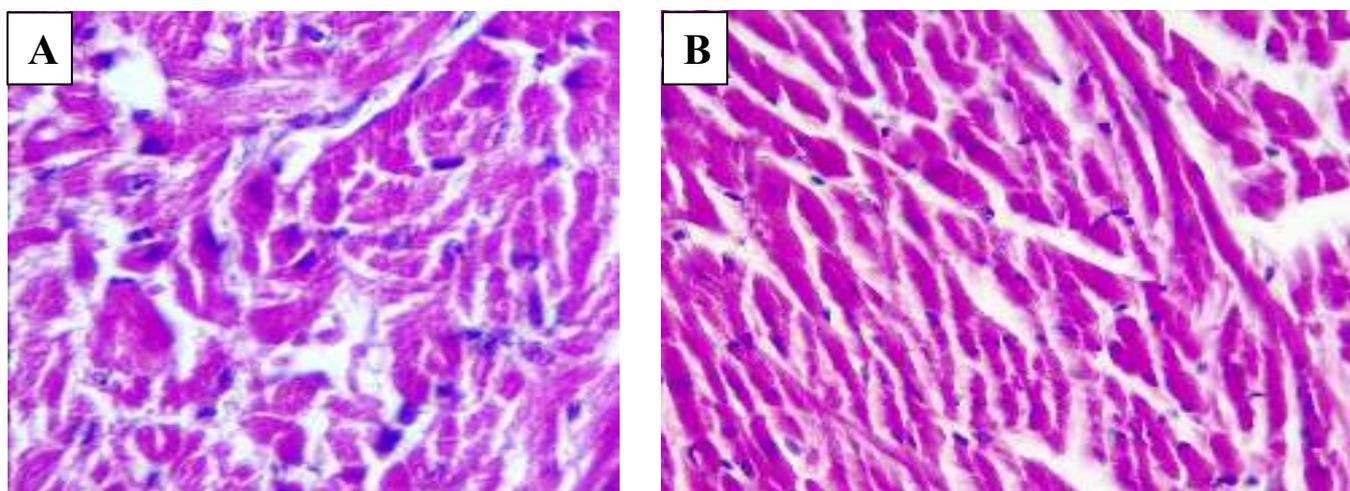
La seconde réalisé par Aperapar et Ashwani en 2003, ces auteurs ont réalisé une étude pendant dix semaines qui visait à évaluer le rôle d' $\alpha$ -T sur le système de défense antioxydant du cœur chez des souris males de souche BALB/*c* inhalant de la fumée de cigarette. Les résultats obtenus ont montré que l'inhalation de fumé de la cigarette durant la période d'expérimentation augmentait les niveaux des LPO cardiaque mesurés en terme de MDA formé. Cependant, la supplémentation en  $\alpha$ -T a entraîné une diminution des niveaux de LPO dans le cœur.

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'analyse des quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif rejoignent ceux obtenus lors de l'étude histologique à savoir l'absence de tous signes pathologiques tel que les altérations et les œdèmes ....

Effectivement les souris traitées avec 700mg d' $\alpha$ -T et les témoins ont montré une architecture cellulaire à aspect normal, (Figure 19) , ces observations suggèrent des propriétés antioxydantes de l' $\alpha$ -T à une dose modérée, en effet, en 2005 , Ayaz et *al.*, ont montré que la vitamine E agit en tant qu'antioxydant brisant la chaîne des radicaux peroxy, cette vitamine possède des propriétés de piégeage des radicaux libres. Leur étude réalisée sur des rats Wistar males et femelles auxquelles ils ont administré 50 UI / kg de vitamine E, pendant 15 jours a montré une protection du tissu cardiaque et aucun changements morphologiques tels que des vacuolites et dispersées limitées aux couches sous endocardiques n'a été observé.

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)

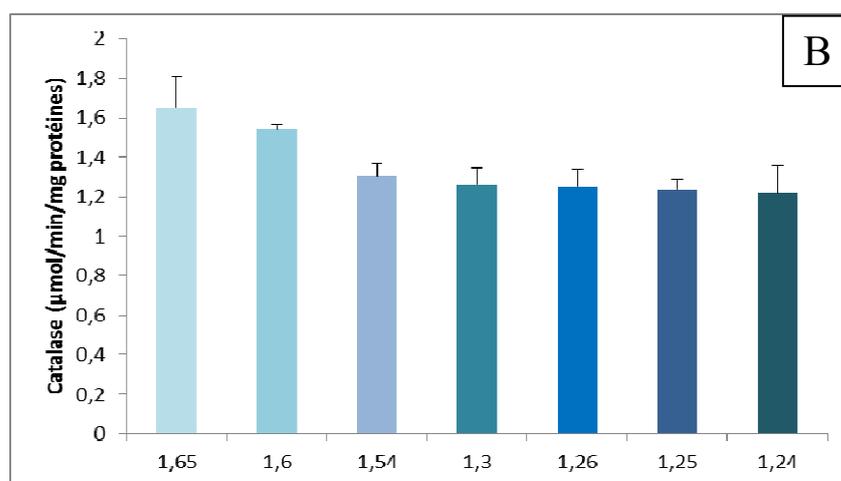
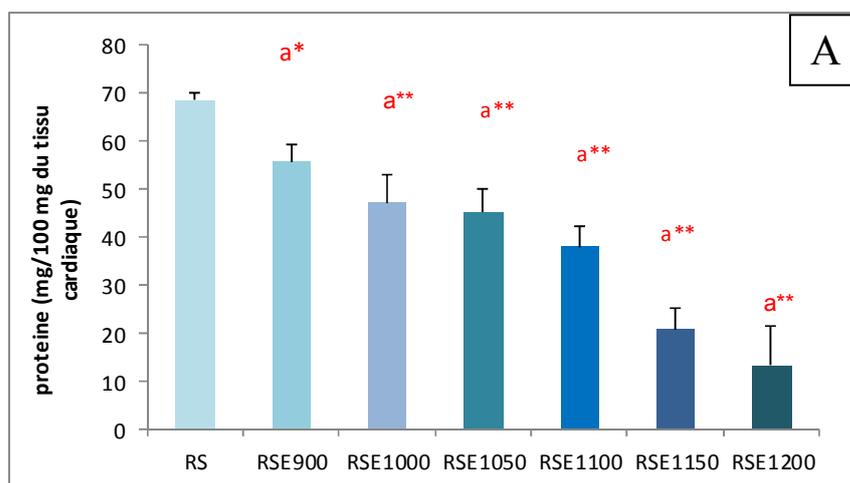
selon Ferry et *al.*, (2012), la vitamine E est l'un des antioxydants les plus puissants, elle protège les membranes cellulaires des effets de la peroxydation, elle a donc un rôle de stabilisateur des membranes.

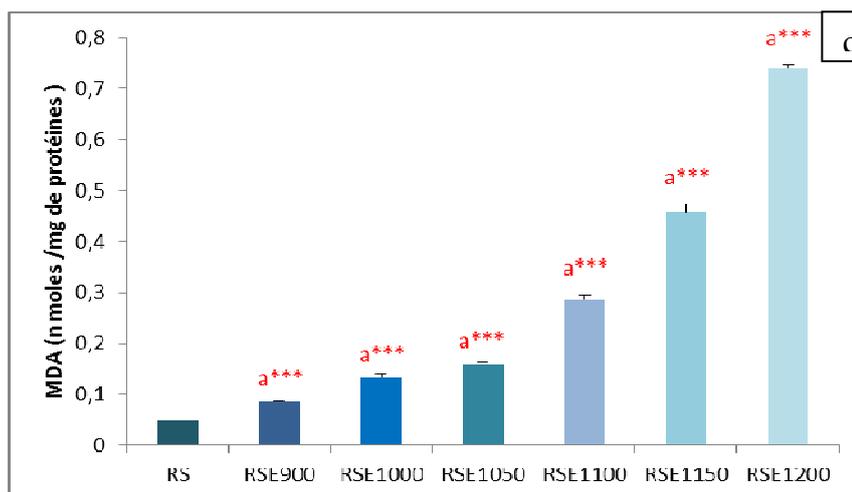


**Figure 19** : Micrographie du cœur (40 $\times$ , H&E) montrant :(A) : architecture normal chez le lot "témoin" : RS, et chez souris supplémentées avec 700 mg d' $\alpha$ -T / kg d'aliment (B)

### II.2.1.2 Effets de la supplémentation à doses croissantes d' $\alpha$ -T (900,1000, 1050,1100 ,1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment) sur la teneur en protéines, le taux en MDA et l'activité de la catalase au niveau du tissu cardiaque

Les résultats que nous avons obtenu lors du dosage de quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif (MDA, CAT et protéines) des souris supplémentées en 900,1000,1050,1100,1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T/Kg d'aliment , ont montré une baisse très significative de la concentration en protéines (Figure 20.A), accompagnée d'une diminution non significatif de la catalase (Figure 20.B) et élévation hautement significative ( $p < 0,001$ ) du taux en MDA et une (Figure 20.C) comparée aux lot témoin .





**Figure 20 :** Effets de la supplémentation en 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliments sur la teneur en protéines, l'activité de la catalase et le taux en MDA au niveau du tissu cardiaque chez les souris, 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)

Ces résultats révèlent un déséquilibre de la balance oxydante/antioxydante due à la présence des ERO à concentration importante au niveau du cœur des souris traitées avec des doses importantes en  $\alpha$ -T ; ces ERO peuvent endommager les protéines et induire une diminution ou bien une inactivation de certaines enzymes antioxydantes.

En 1992, Bowry et *al*. ont réalisé une expérience sur des LDL isolés du plasma humain enrichis en  $\alpha$ -T et en présence de AAPH (2,4-diméthyl-isovaléronitrile) : initiateur donnant des hydroperoxydes des lipides neutres, cette étude a montré que l' $\alpha$ -T avait la capacité d'agir comme pro-oxydant et d'augmenter la peroxydation lipidique. Il a été également rapporté par le même auteur 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. La même année, Palozza et Krinsky, ont énoncé que les niveaux accrus de  $\alpha$ -T induisent une augmentation de la concentration des radicaux  $\alpha$ -T, qui ne peuvent pas être efficacement détoxifiés par les co-antioxydants (acide ascorbique) ce qui peut initier le processus de peroxydation lipidique. Cela offre la possibilité de la toxicité pro-oxydante.

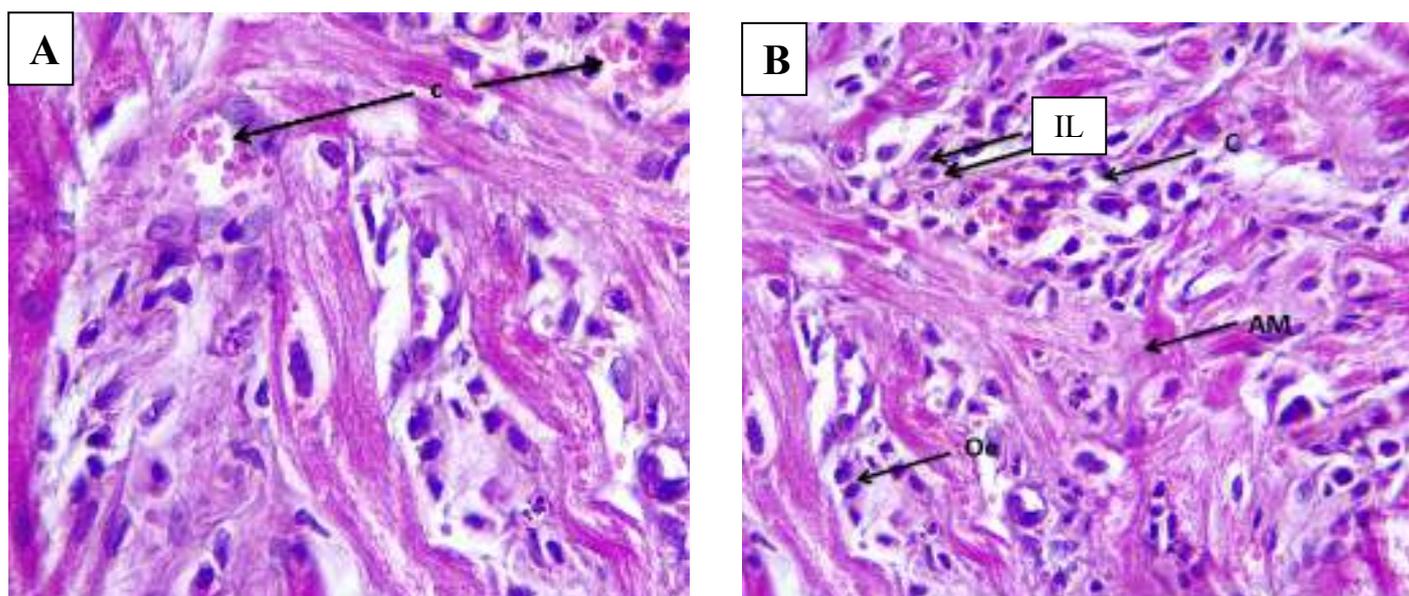
Deux années plus tard Burton rapporta que l' $\alpha$ -T pouvait induire une inhibition de la prolifération des cellules du muscle lisse et inhiber la protéine kinase C, un des principaux agents de signalisation (Burton,1994).

Une étude menée par Tafazoli et al., (2005) a été réalisée afin d'évaluer l'activité pro oxydante du radical tocophéroxyl, pour cela des microsomes hépatiques de rats mâles adultes SpragueDawley, ont été incubés avec 100 $\mu$ M d' $\alpha$ -T, les résultats ont montré que l'addition de cette quantité d' $\alpha$ -T a entraîné une peroxydation lipidiques des microsomes .

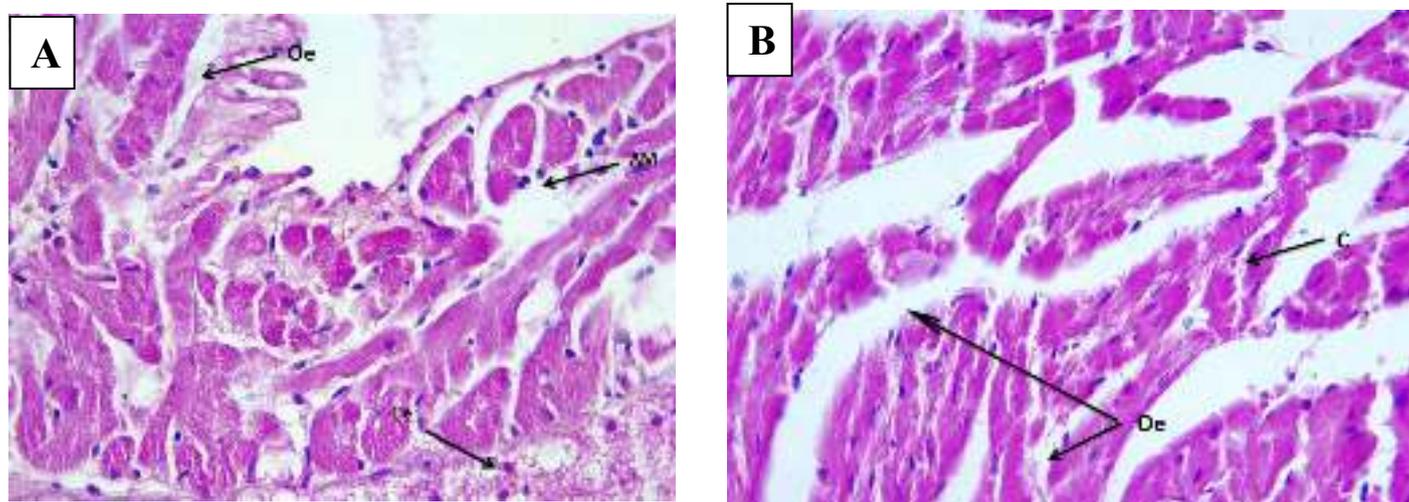
Dans notre cas l'étude des paramètres biochimiques dosés a montré que la toxicité de l' $\alpha$ -T a débuté à une dose de 900 mg d' $\alpha$ -T/Kg d'aliment, ces résultats ont été confirmé par l'étude histologique du tissu cardiaque, effectivement cette dernière a montré des altérations cellulaires, des infiltrations lymphocytaires et la présence d'œdèmes et des congestions.

Selon Carolina et al.,(2011), la supplémentation de dose pharmacologique en  $\alpha$ -T peut induire une cardiotoxicité chez le rat en bonne santé .en comparaison avec le groupe témoin, les résultats de son étude ont révélé une nécrose nucléaire marquée, une dégénérescence des myocytes et une désorganisation de la morphologie des myofibrilles chez les rats males Wistar âgé de 14 semaines et traiter pendant 7 semaines avec une dose de 250mg d' $\alpha$  T/kg de poids corporel/jour .

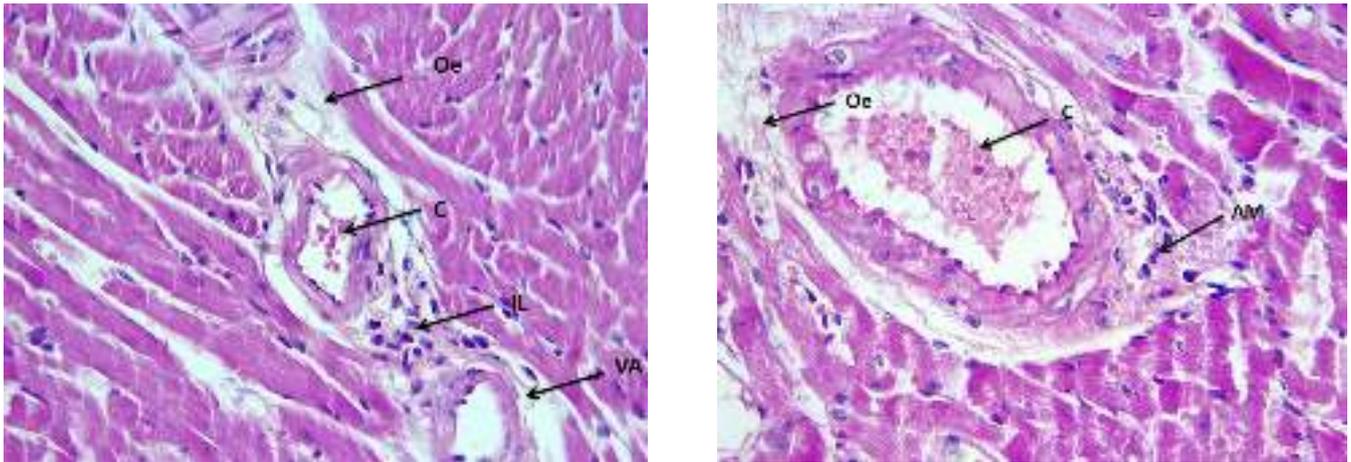
En 2010, Nascimento et al., ont étudié l'effet d'une dose pharmacologique d' $\alpha$ -T sur le tissu cardiaque de rats Wistar adultes. Deux groupes ont été constitués, un groupe témoin et un autre qui recevait par gavage 250 mg d' $\alpha$ -T /kg de poids de rat/jour pour des rats dont le poids variait de 350 à 400 g, soit environ une quantité d' $\alpha$ -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  $\alpha$ -T, des dommages cellulaires importants sont apparents et montrant une désorganisation morphologique des myocytes ainsi que la présence d'oedèmes. Ces auteurs déduisent qu'une telle dose d' $\alpha$ -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' $\alpha$ -T. Ainsi la fonction antioxydante de l' $\alpha$ -T dépend des conditions du stress (modérées ou fortes) et la présence de co-antioxydants.



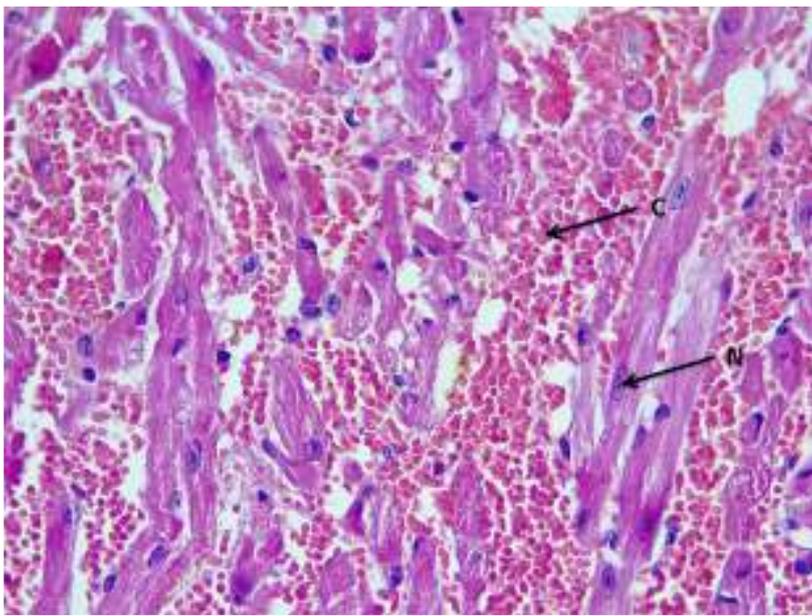
**Figure 21 :** Micrographie du cœur du lot RSE900 (40×, *H&E*) montrant la présence de congestion (A), micrographie du cœur du lot RSE1000 (40×, *H&E*) montrant la présence d'un oedème ( Oe ), avec une congestion (c), d'infiltration lymphocytaires (IL) et d'altération de myocyte (AM) (B)



**Figure 22 :** Micrographie du cœur du lot RSE1050 (40×, *H&E*) montrant la présence, d'œdème (Oe) et altération de myocyte (A), et micrographie du cœur du lotERS1100 (40×, *H&E*) montrant la présence des œdèmes (Oe) et de congestion (C) .



**Figure 23** : micrographie du cœur du lot ERS1150 (40×, *H&E*), montre la présence des œdèmes (Oe), de congestion ( C ), d'infiltration lymphocytaire (IL) et de vaisseau altéré (AL) .



**Figure 24** : micrographie du cœur du lot ERS1200 (40×, *H&E*) montre la présence de congestion (C) et de polynucléaires neutrophiles

# **Conclusion**

## Conclusion

Dans la présente étude, notre travail consistait à évaluer l'effet de la supplémentation en  $\alpha$ -T à différentes doses (700 , 900 , 1000 , 1050 , 1100 , 1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T /kg d'aliment) durant 5 semaines, sur la teneur en protéines, le taux en malondialdéhyde (MDA) et l'activité enzymatique antioxydante de la catalase, ainsi que sur l'histologie du tissu cardiaque de souris NMRI .

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 souris supplémentés en 700 , 900 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment. Concernant le lot RSE1000, les résultats ont montré une diminution non significatif du poids corporel; enfin pour les lost RSE1050, 1100, 1150 et 1200 d' $\alpha$ -T/kg d'aliment, une augmentation non significative a été obtenue par rapport au RS, nous pouvons conclure que l'ensemble des doses utilise n'ont eu aucun effet sur la croissance des souris.

**Sur le plan du poids cardiaque :** son étude révèle l'absence de variation significative pour l'ensemble des lots supplémentés en  $\alpha$ -T par rapport au lot témoin.

**Sur le plan métabolique:** les résultats obtenus montrent une augmentation non significative du taux en protéines, accompagnée d'une diminution non significatif du MDA et de catalase du lot RSE700 par rapport au témoin, ces résultats indiquent l'effet bénéfique de l' $\alpha$ -T vis-à-vis des ERO au niveau du cœur.

La supplémentation avec 1000, 1050, 1100 , 1150 et 1200 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment, a induit une baisse très significative de la concentration en protéines accompagnée d'une élévation hautement significative ( $p < 0,001$ ) du taux en MDA et une diminution non significatif de la catalase comparée au lot témoin.

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

**Sur le plan cellulaire:** l'examen histologique des deux lots RS et RSE700 montre un tissu cardiaque conservé. Cependant chez le lot RSE900 on a observé la présence de quelques infiltrats leucocytaires, des altérations cellulaires et des œdèmes.

En revanche, l'étude histologique des lots RSE1000, RSE1050, RSE1100, RSE1150 et RSE1200 révèlent une cardiotoxicité par le faite qu'elle soit marqué par une abondance d'œdèmes, d'altérations et une discrète congestion.

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

- doser l' $\alpha$ -T au niveau cardiaque 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' $\alpha$ -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...).

Abdo, K.M., Rao, G., Montgomery, C.A., Dinowitz, M., Kanagalingam, K. (1986). Thirteen week toxicity study of d- $\alpha$ -tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. *Fd Chem. Toxic.* 24: 1043

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.* 105: 121 – 126.

AshwaniKoul, Aperapar Singh. (2003).effect of  $\alpha$ -tocopherol on the cardiac antioxidant defense system and atherogenic lipids in cigarette smoke-inhaling mice , 15:513–522.

Ayaz, SA. , Bhandari, U., Pillai KK.(2005). Influence of DL  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin-E against doxorubicin-induced biochemical and histological changes in the cardiac tissue of rats. *indian journal of pharmacology*, 37(5), 294-299.

Azzi A, Gysi R, Kempna P, et al. ( 2002). Regulation of gene and protein expression by vitamin E. *Free Radic Res .* 36(1):30–35.

Baskaran, A., Chua, K. H., Sabaratnam, V., Ravishankar Ram, M., & Kuppusamy, U. R. (2017). *Pleurotus giganteus* (Berk. Karun & Hyde), the giant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulated RAW 264.7 cells via STAT 3 and COX-2 pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1).

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.

Biswas P. *Vitamins /Slideshare*. 2016.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*. 91: 179-194.

Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., Pincemail J. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 233-239.

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.

Burton, G. W. (1994). Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53(02), 251–262.

- Burton G.J., Jauniaux E. (2011). Oxidative stress/*Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*; 25(3): 287–299
- Cadenas, E., Davies, J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging.*Free Radical Biology and Medicine*.29: 222-230.
- Claude, B. (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires. Editions TEC & DOC.11- 656.
- Cook-Mills, J., & A. McCary, C. (2010). Isoforms of Vitamin E Differentially Regulate Inflammation. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 10(4), 348–366.
- Comhair S.A., Erzurum S.C. (2002).Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases.*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283: 246-255.
- 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.
- Cuvelier C, Dotreppe O, Istasse L.(2003) .Vitamine E : état des connaissances chez les carnivores domestiques. Métabolisme, besoins et apports. *Ann MédVét* . 147:367-382.
- Daum-badouard C. (2006). Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation.Thèse. Université Joseph Fourier-Grenoble.
- Defraigne J.O., Degrune F., Malherbe C., Paquot N., Pincemail J., Voussure S. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*. 21: 66-75.
- Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : oxydation des acides aminés et les protéines. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405
- Desrumaux C, Deckert V, Athias A, Masson D, Lizard G, Palleau V, Gambert P, Lagrost L.( 1999). Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular endothelium dysfunction by delivering a-tocopherol to endothelial cells. *The FASEB Journal*;13:883–892.
- Draper, H. H., Squires, J., Mahmoudi, H., Wu, J., Agarwal, S., Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of
- Droge, W. (2002).Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*82: 47-95.

- 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.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108 – 115.
- Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr*, 64 : 390-39
- 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.
- 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.
- Goudable J. Favier A. (199), Radicaux libres oxygène et antioxydants. *Nulre Clin Metabole* ;11 :115-20
- Guilland, J.-C. (2011). Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 18(2), 59–67.
- 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. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 91, 14s-21s.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press. 888.
- Hajiani, M., Golestani, A., Shariftabrizi, 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.
- Hofius, D., & Sonnewald, U. (2003). *Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology*. *Trends in Plant Science*, 8(1), 6–8.
- Kalam S, Singh R, Mani A, Patel J, Naem KF, Pandey A. (2012). Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, 1: 18-34.
- 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

- Kohen R, Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30 : 620–650.
- Kumar K., Pandey A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview/*The Scientific World Journal*. 2013: 16 pages
- Laguerre, M., Javier López-Giraldo, L., Lecomte, J., Pina, M., & Villeneuve, P. (2007). *Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 14(5), 278–292.
- 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. *Press Med*. 30 : 1076 -1081
- Li J., Wuliji O., Li W., Jiang Z.G., Ghanbari H.A. (2013). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders/*Int.J.Mol.Sci*. 14(12):24438-24475.
- 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.
- Landrier, J.-F. (2011). Vitamine E et physiologie du tissu adipeux. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 18(2), 83–87
- Lowry, O. M., Rosenbrough, R. P., Williams, A. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 226: 497-509.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118.
- Mates J.M., Sanchez-Jimenez F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci*. 4: 339-345.
- Miguel F.M., Schemitt E.G., Colares J.R., Hartmann R.M., Morgan-Martins M.I. (2017). Action of vitamin E on experimental severe acute liver failure/*Arq. Gastroenterol*. 54(2):123-129.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M. (1967). *Initiation aux Techniques de l'Histologie animale*. Paris: Masson. 345.
- Molenaar, I., Hulstaert, C. E., Vos, J., & Hommes, F. A. (1973). Membrane characteristics in vitamin E deficiency and the assessment of vitamin E status. *Proceedings of the Nutrition Society*, 32(03), 249–254.

- 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  $\alpha$ -tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. *Human and Experimental Toxicology*. 30 (10): 1540–1548.
- Nascimento, M. C. M., Matsubara, B. B., Matsubara, L. S., Correa, C. R., Pereira, E. J., Moreira, P. L., ... Ferreira, A. L. A. (2011). Pharmacological dose of  $\alpha$ -tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. *Human & Experimental Toxicology*, 30(10), 1540–1548
- Niki E., Noguchi N., Saito Y., Yoshida Y. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338: 668–676.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006
- 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
- Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Kalender, S., Durak, D., Bayrakdar, F., & Kalender, Y. (2006). The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86(2), 93–98
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J. (2000). High dietary intake of  $\alpha$ -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 10: 293–307.
- Omodanisi E.I., Aboua Y.G., Oguntibeju O. Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, (2017). Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Moringa Oleifera* in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats/*Molecules*. 22(4)
- Opara, E.C. (2006). Oxidative stress. *Dis Mon*. 52: 183-198.
- Palozza, P., & Krinsky, N. I. (1992).  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297(1), 184–187.

- Pandey KB & Rizvi SI. (2011). Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. Biomedical paper of medicine faculty- University Palacky Olomouc-Czech Republic, 155: 131-136.
- 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.
- Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases / *Indian J Clin Biochem* . 30 (1): 11 à 26.
- Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids/fitoterapia. 2011;82(4) :513-523
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Rad. Biol. Med.* 28: 141–164.
- Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., & Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*, 114(08), 1113–1122.
- Robert B. (2006). Stress oxydant et vieillissement *Med Sci (Paris)* ; 22 : 266– 272
- Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., & Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*, 114(08), 1113–1122.
- Sachdeva M, Karan M, Singh T, Dhingra S .(2014). Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine. Review Article *Spatula DD*. 4(1):1-16
- Salle, B.-L., Delvin, E., & Claris, O. (2005). *Vitamines liposolubles chez le nourrisson. Archives de Pédiatrie*, 12(7), 1174–1179
- Sánchez-Sevilla, L., Mendieta-Condado, E., & Hernández-Muñoz, R. (2016). Putrescine treatment reverses  $\alpha$ -tocopherol-induced desynchronization of polyamine and retinoid metabolism during rat liver regeneration. *Journal of Translational Medicine*, 14(1).
- Satoshi, S., Kiyoji, T., Hiroyo, K., & Fumio, N. (1989). Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *International Journal of Biochemistry*, 21(8), 835–838
- 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.

Singh S.P. Postharvest Oxidative Stress in Fresh Fruits. (2015). Postharvest Fruit and Vegetable Technology. Edited by Ron B. H. Wills and John Golding. 237–260.

Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 175(2), 408–413.

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.

Sung ch-ch , Hsu y-ch , Chen ch-ch , Lin y-f , Wuch -ch .(2013).oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease . *oxid med cell longev*.301982

Szarka, A., Tomaskovics, B., & Bánhegyi, G. (2012). The Ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol Triad in Abiotic Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 4458–4483.

Tafazoli, S., Wright, J. S., & O'Brien, P. J. (2005). Prooxidant and Antioxidant Activity of Vitamin E Analogues and Troglitazone. *Chemical Research in Toxicology*, 18(10), 1567–1574.

Tessier, F., & Marconnet, P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*, 10(1), 1–13.

Therond, P. (2006). Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6), 383–389.

Thomas, S. R., Neužil, J., Stocker, R. (1996). Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 16(5): 687-696.

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.

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

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, & Telser J .(2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.*The International Journal of Biochemistry and CellBiology*, 39: 44-84.

Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., et al. (2004) Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *European journal of biochemistry*, 271, 3646-3656.

Yamashita, N., Murata, M., Inoue, S., Burkitt, M.J., Milne, L., Kawanishi, S. (1998). -Tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper(II) ions. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 855.

Yu, J., & Kim, A. K. (2009). Effect of Taurine on Antioxidant Enzyme System in B16F10 Melanoma Cells. *Taurine* 7, 491-499.

Xavier, L. (2009). Stress oxydant et antioxydants ?. *Cahiers de nutrition et de diététique*.44: 219-224

## **Annexes**

### **Annexe I : matériel non biologique**

#### **Verrerie et autres :**

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

#### **Réactifs chimiques**

- Vitamine E.
- Ether Ethylique.
- Triton X-100.
- Hydroxyde de sodium NaOH.
- Tartrate de Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>.
- Sulfate de cuivre CuSo4.

- Sulfate de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
- Folin ciocalteu.
- Phosphate de potassium monobasique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- Butyl-Hydroxtoluène (BHT).
- Phosphate disodique  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ .
- Peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Eau distillée.

### **3. Appareillages**

- Broyeur Homogénéiseur (Potter de Thomas).
- Balance de précision.
- Centrifugeuse.
- Spectrophotomètre UV-visible.
- Bain-marie.
- Agitateur.
- pH mètre.
- Réfrigérateur.
- Module de refroidissement de paraffine (Leica).
- Microtome (Leica).
- Plaque chauffante.
- Etuve.
- Distillateur.
- Microscope optique.

## Annexe II :

**Tableau I : constitution de régime alimentaire (g /100g):**

Ingrédients	RS	RSE700	RSE900	RSE1000	RSE1050	RSE1100	RSE1150	RSE1200
Mais	52.8	52.8	52.8	52.8	52.8	52.8	52.8	52.8
Son	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80	10.80
Soja	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10	32.10
Calcaire	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50	01.50
Phosphate	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80	00.80
C.M.V(Complément Méniralo- Vitaminique)	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00	02.00
$\alpha$ -T	/	0.07	0.09	0.1	0.105	0.110	0.115	0.120

- **Mélange minéral contenu dans 100 g d'aliment:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20,0 mg;  $\text{CaCO}_3$  34,6 mg;  $\text{CaHPO}_4$  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  $\text{FeSO}_4$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,15 mg;  $\text{CaCO}_3$  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- $\alpha$ -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.

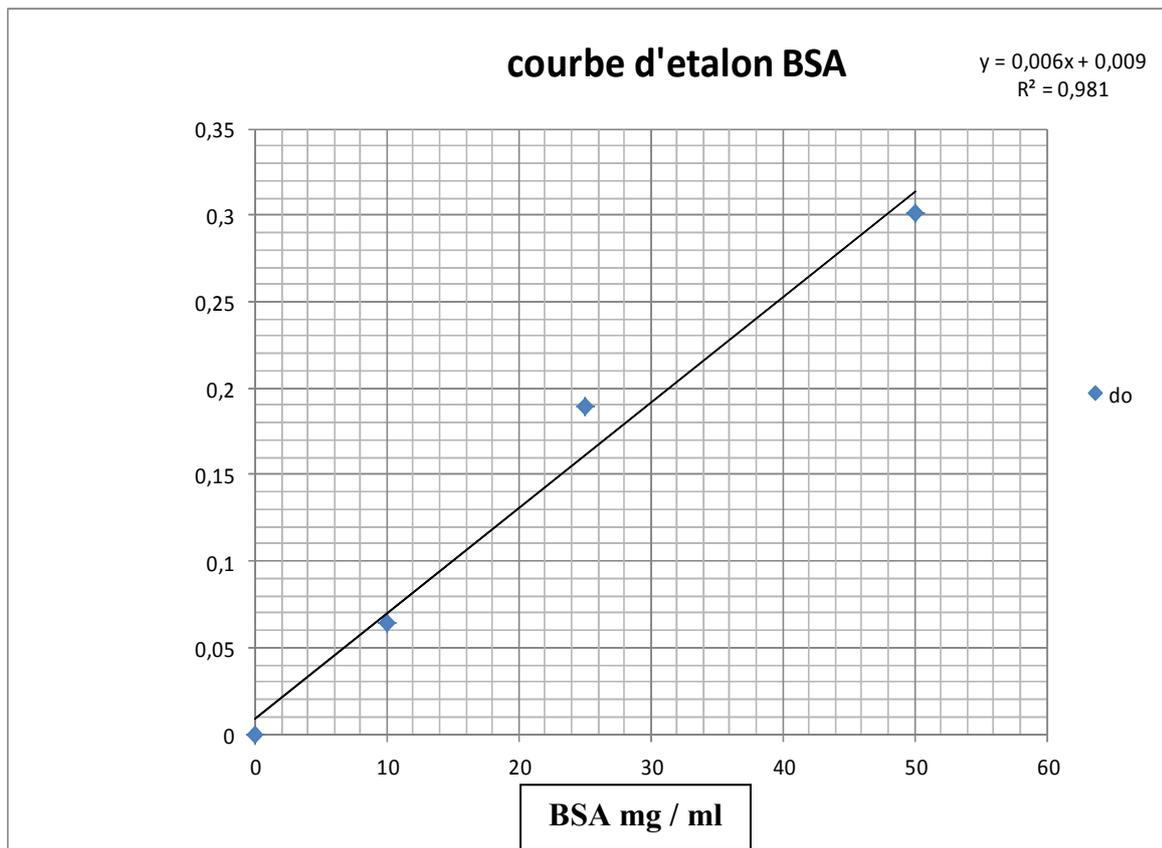
### Annexe III : préparation des solutions de dosage des protéines

**Solution A** : préparée par mélange des trois solutions suivant:

- 0,5 ml de la solution de tartrate de  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  à 2% (P/V),
- 0,5 ml de la solution de sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  à 1%,
- 50 ml de la solution de sulfate de carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans du  $\text{NaOH}$  (0.1M).

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

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



## Annexe V : préparation des solutions de dosage du catalase

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

- dissoudre 6,81 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans de l'eau distillée est compléter à 1000ml (a),
- dissoudre 8,82 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% avec la solution I jusqu'à 100ml.

## Annexe VI :

Paramètres	RS	RS700	RS900	RS1000	RS1050	RS1100	RS1150	RS1200
Poids corporel	18,540±0,004	17,540±0,004	17,280±0,004	18,170±0,004	18,130±0,004	17,130±0,004	18,150±0,004	18,080±0,004
Poids cœur	0,110±0,001	0,110±0,001	0,110±0,001	0,110±0,001	0,110±0,001	0,110±0,001	0,110±0,001	0,110±0,001
Protéines	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000
MDA	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000	0,001±0,000
CAT	1,100±0,010	1,100±0,010	1,100±0,010	1,100±0,010	1,100±0,010	1,100±0,010	1,100±0,010	1,100±0,010

**Tableau II:** Tableau des variations du poids corporelles du poids cardiaques et des parametres biochimiques évalué pondant nôtres étude(protéines ,MDA, catalase) chez les souris en croissance ( témoins : RS, supplémentés en 700 mg d'α-T. kg<sup>-1</sup>:RS700 , supplémentés en 900 mg d'α-T. kg<sup>-1</sup>:RS900, supplémentés en 1000 mg d'α-T. kg<sup>-1</sup>:RS1000, supplémentés en 1050 mg d'α-T. kg<sup>-1</sup>:RS1050 , supplémentés en 1100 mg d'α-T. kg<sup>-1</sup>:RS1100, supplémentés en 1150 mg d'α-T. kg<sup>-1</sup>:RS1150, supplémentés en1200 mg d'α-T. kg<sup>-1</sup>:RS1200).