

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA -1-



**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE
LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIES, ENVIRONNEMENT ET SANTE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUES

OPTION : BIOCHIMIE

THEME

**Détermination de la dose pro-oxydante de la
vitamine E par la mesure de quelques paramètres
du stress oxydatif et ses effets sur l'histologie du
tissu rénal chez des souris Albinos**

Présenté par :

Soutenu le : 11/07/2019

M^{lle} BENRABAH Roufaïda et M^{lle} BENS Aidane Lydia et M^{lle} IDDIR Imène

Devant le jury :

Présidente	M^{me} Abdulhussain A.	MCB	USDB-1
Examinatrice	M^{me} Sour S.	MCB	USDB-1
Promotrice	M^{me} Rouaki F.	MCB	USDB-1
Co-Promotrice	M^{me} Slamani R.	MCB	INRA.Alger

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018/2019

Remerciements

Nous remercions Allah qui nous a permis avec sa clémence et sa grâce de poursuivre à terme la réalisation de ce travail.

*On voudrait dans un premier temps remercier et exprimer toute notre reconnaissance à notre encadreur de mémoire « **M^{me} ROUAKI F.** », Maître de Conférences "B" à la faculté de S.N.V à l'Université de Blida -1- pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses précieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion, qu'elle trouve ici notre profonde gratitude.*

*On voudrait également exprimer nos plus vifs remerciements à notre co-promotrice « **M^{me} Slamani R.** », Maître de Conférences "B" à INRA (Alger), de nous avoir aidé durant la partie expérimentale de ce mémoire.*

*On adresse nos plus sincères remerciements, notre respect et notre gratitude aux membres du jury : A « **M^{me} ABDULHUSSAIN A.** » Maître de Conférences "B" à la faculté de S.N.V à l'Université de Blida -1-, qui a fait l'honneur d'accepter de présider le jury et de nous faire ainsi bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances. A « **M^{me} SOUR S.** » Maître de Conférences "B" à la faculté de S.N.V à l'Université de Blida -1-, qui a bien voulu consacrer de son temps pour lire et juger notre travail.*

*Nous tenons à remercier également la responsable de l'animalerie « **M^{me} BELKADI A.** » Docteur vétérinaire, qui nous a accueillie et nous a permis de mener à bien notre travail, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire CRD de Saida-Gué de Constantine (Alger) surtout « **M^r Moussa** » pour sa précieuse aide.*

*Que nos vifs remerciements aillent au « **M^r Boudalia A.** » Assisant en néphrologie à l'hôpital de Mustapha Pacha (Alger) pour son aide à la lecture des lames histologiques. Ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire du service d'anatomopathologie de l'hôpital Yahia Fares (Koléa) de nous avoir orienté et conseillé pendant toute la durée du travail. On n'oubliera pas de remercier « **M^{me} Khaldoun A.** », Maître de Conférences "B" à la faculté de S.N.V à l'Université de Blida -1- pour sa précieuse aide.*

*Nous remercions aussi « **M^{lle} Acherouf L.** » qui nous ont aidé dans l'analyse statistique, et tous les professeurs qui nous ont enseigné au cours de notre cursus universitaire.*

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



Dédicaces

D'un sentiment plein d'amour, de sincérité et fidélité, je dédie ce travail

A mes très chers parents :

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour tous les sacrifices et le soutien que vous avez consenti au long de mes études. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés. Puisse Dieu, vous accorder la santé, le bonheur et une longue vie.

A ma chère sœur Amina :

Ces quelques lignes, ne sauraient traduire le profond amour que je te porte. Ton précieux soutien, ton encouragement, ont été pour moi l'exemple de persévérance. Je te souhaite beaucoup de succès, et une vie pleine de bonheur.

A la mémoire de ma grand-mère maternelle

J'aurais tant aimé que tu sois présente. Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde.

A tous mes cousins et cousines en particulier : Abdelbaki, Thouraya et Toufik
Veillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A tous mes chers ami(e)s en particulier : Kamilia, Ghiles, Rayel et Nourhan
Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect et mon affection.

Une spéciale dédicace au Professeur Mezghrani Rafik :

Qui je porte beaucoup de respect pour lui, Que ce travail soit l'expression de mon estime pour toi et que Dieu te protège.

Roufaida



Dédicaces

Avant toute chose je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage pour réaliser ce travail que je dédie.

A mes très chers parents :

Pour tous leurs sacrifices, leur patience, soutien et leurs prières tout au long de mes études vous étiez toujours là pour m'écouter, me réconforter et m'encourager dans les moments de doute, tous les mots ne suffiraient pas Qu'Allah le Tout Puissant vous procure, santé et longue vie.

A mes chers frères Hocine et Abderraouf et ma chère sœur Sabrina

Pour leurs encouragements permanents, leur affection et leur soutien moral.

A la mémoire de mon cher grand-père maternel, la mémoire de mes deux grand-mères

Qui ont été toujours dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

A Mon cher grand-père paternel

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières, que Dieu vous préserve santé et longue vie.

Et finalement à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à accomplir ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Lydia

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents,

*Je vous remercie pour votre amour, votre générosité d'esprit, votre disponibilité et
votre patience.*

*Votre soutien était une véritable motivation pour moi et votre satisfaction un
véritable but durant ce travail.*

Puisse Allah, le tout puissant, vous préserver et vous accorde santé et longue vie.

A la mémoire de ma chère grand-mère maternelle.

*Puisse Allah vous réserver sa clémence à sa bien large miséricorde et vous
accueillie en son vaste paradis !*

*A mes très chères sœurs Rania et Maroua, que j'aime profondément, et à qui je
souhaite plus de succès.*

A mes adorables cousins Anyes et Akram que j'aime beaucoup.

A ma famille.

A toutes mes amies.

*Enfin, à tous ceux qui m'ont aidé à percer mon chemin dans le savoir et ceux qui
m'ont soutenu pour mener à terme ce travail.*

Imène

Résumé

La présente étude a pour objectif de déterminer la dose pro-oxydante de la vitamine E, ainsi que les effets de sa supplémentation à doses croissantes (700,900,1000,1050,1100 et 1200 mg d'alpha-tocophérol (α -T) /kg d'aliment) par la mesure de la teneur en protéines et quelques paramètres du stress oxydatif (l'activité de la catalase et le taux en malondialdéhyde), et l'histologie du tissu rénal chez des souris Albinos de souche NMRI.

Au terme de cette étude, les principaux résultats obtenus révèlent une augmentation non significative de la teneur en protéines et de l'activité enzymatique de la catalase, accompagnée d'une diminution non significative du taux en MDA, concernant le lot supplémenté en 700 mg d' α -T/kg d'aliment par rapport au témoin.

Par contre, nous avons noté pour les lots supplémentés en 900,1000,1050,1100, 1150 et 1200 mg d' α -T /Kg d'aliment, une augmentation significative du taux en MDA, et une diminution significative des protéines et de la catalase par rapport au témoin; ceci montre qu'il y a eu un déséquilibre de la balance oxydante/antioxydante au fait que l' α -T à ces doses n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais plutôt en tant que pro-oxydant.

Enfin, l'étude histologique des reins n'a fait que confirmer l'ensemble de ces résultats.

Mots clés : Alpha-tocophérol, antioxydant, pro-oxydant, souris, reins.

Abstract

The objective of this study is to determine the pro-oxidant dose of vitamin E, as well as the effects of its supplementation at increasing doses (700,900,1000,1000,1050,1100 and 1200 mg of alpha-tocopherol (α -T) /kg feed) by measuring protein content and some oxidative stress parameters (catalase activity and malondialdehyde level), and renal tissue histology in Albino mice of NMRI strain.

At the end of this study, the main results obtained reveal a non-significant increase in protein content and in the enzymatic activity of the catalase, accompanied by a non-significant decrease in MDA level, concerning the batch supplemented with 700 mg α -T/kg feed compared to the control.

On the other hand, for batches supplemented with 900,1000,1050,1100,1150, 1150 and 1200 mg of α -T /Kg of food, we noted a significant increase in the MDA level, and a significant decrease in protein and catalase compared to the control; this shows that there was an imbalance in the oxidant/antioxidant balance because α -T at these doses did not act as an antioxidant but rather as a pro-oxidant.

Finally, the histological study of the kidneys only confirmed all these results.

Mots clés : Alpha-tocopherol, antioxidant, pro-oxydant, mice, kidneys.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد الجرعة المضادة للأكسدة للفيتامين هـ ، بالإضافة الى آثاره على جرعات متزايدة (700،900،1000،1050،1100،1150،1200 مغ من ألفا توكوفيرول (α -T) / كغ من الغذاء) عن طريق قياس نسبة البروتينات و بعض معالم الاجهاد التأكسدي (نشاط الكاتالاز و نسبة malonaldehyde) بالإضافة الى دراسة الأنسجة الكلوية عند الفئران Albinos من سلالة NMRI .

في نهاية هذه الدراسة، بينت النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها عن زيادة غير معتبرة في نسبة البروتينات والنشاط الانزيمي لCAT مصحوبا بانخفاض غير معتبر في مستوى MDA، وهذا فيما يتعلق بالمجموعة المكملة ب 700 مغ α -T / كغ من الغذاء مقارنة بمجموعة الشاهد.

من ناحية أخرى، لاحظنا بالنسبة للمجموعات المكملة ب 900،1000،1050،1100،1150،1200 مغ α -T / كغ من الغذاء، زيادة معتبرة في مستوى MDA، وتناقص معتبر في البروتينات و CAT مقارنة بمجموعة الشاهد ، مما يدل على أنه هناك خلل في توازن المؤكسد/مضاد الأكسدة لأن α -T في هذه الجرعات لم يعمل كمضاد للأكسدة بل كدافع للأكسدة.

وأخيرا ، أكدت الدراسة النسيجية للكلية كل هذه النتائج.

الكلمات المفتاحية: ألفا توكوفيرول، مضاد للأكسدة، دافع للأكسدة، الفئران، الكلية.

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: Oxygène Singlet.

AGPI : Acides Gras Polyinsaturés.

CAT : Catalase.

CoQ : Ubiquinole

ERA : Espèces Réactives de l'Azotes.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

GPx : Glutathion Peroxydase.

GR : Glutathion Réductase.

GSH : Glutathion.

GSSG : Glutathion-Disulfure.

H₂O₂ : Peroxyde D'hydrogène.

HDL : Lipoprotéines de haute densité.

HOCL : Acide Hypochloreux.

LDL : Lipoprotéines de baisse densité.

MDA : Malondialdehyde.

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate Hydrogène.

NO• : Oxyde Nitrique.

NOS : Nitrique Oxyde Synthase.

O₂•- : Anion Superoxyde.

OH• : Radical Hydroxyle.

ONAB : Office National des Aliments de Bétail.

ONOO- : Peroxynitrite.

PLTP : Protéines plasmatiques de transfère de phospholipides

PMT : Peroxydation Médiée Par Tocophérol.

RO•: Radical Alcoxyle.

ROO• : Radical Peroxyle.

RS : Régime Standard.

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

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

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

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

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

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

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

SOD: Superoxyde Dismutase.

-TTP : Tocophérol Transfert Protéine.

VLDL : Lipoprotéines de très basse densité.

α -T: α -Tocophérol.

α -T• : Radical α -Tocophéroxyde.

Glossaire

Athérosclérose : est une pathologie des grosses et moyennes artères, dont l'étiopathologie repose sur un taux anormalement élevé de LDL dans le sang, qui s'infiltrent dans l'espace sous-endothélial, où elles s'oxydent et déclenchent une réponse inflammatoire de l'endothélium vasculaire. Cette réponse inflammatoire conduit à la formation d'épaississements locaux de la paroi artérielle à caractère évolutif. (**Glorian et al.,2007**).

Cytochromes P450 : ils appartiennent à la famille des monooxygénases de l'hème-thiolate, et catalysent la conversion de nombreux médicaments et xénobiotiques en métabolites hydroxylés correspondants. (**Omura et al., 2010**).

Glomérulosclérose : est toute lésion non spécifique affectant le glomérule et le détruit progressivement. Elle peut être la conséquence de toute maladie rénale chronique, et se traduit par une atteinte irréversible des capillaires glomérulaires, et un comblement de la chambre urinaire par du tissu fibreux pouvant entraîner la disparition totale du glomérule (**Larousse,2019**).

La lipofuscine : peut être définie comme un pigment brun jaunâtre, auto fluorescent et contenant des lipides qui s'accumule dans le cytoplasme des cellules pendant le vieillissement (**Dolman et al.,1981**).

Les cellules mésangiales : sont des cellules contractiles qui constituent la tige centrale du glomérule. Du côté de la lumière capillaire, les cellules mésangiales sont en contact direct avec l'endothélium glomérulaire sans membrane basale intermédiaire, comme on peut généralement l'observer avec les péricytes. Les cellules mésangiales sont en effet considérées comme des péricytes spécialisés et sont donc essentielles pour stabiliser la fonction endothéliale glomérulaire. (**Heerspink et al., 2015**).

Les néphrolithiases : également connues sous le nom de calculs rénaux, et sont des dépôts de sels acides et de minéraux ressemblant à des pierres, qui se forment dans les reins lorsque ces substances se trouvent à des concentrations supérieures au point de saturation dans l'urine (**Steven et al.,2019**).

Néphropathie diabétique : est une complication microvasculaire sévère du diabète (**Tuttle et al.,2014**) et un trouble progressif, qui entraîne une diminution du débit de filtration glomérulaire, et constitue la principale cause d'insuffisance rénale au stade terminal (**Koenraad et al., 2015**).

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Initiation, propagation et terminaison de la réaction en chaîne d'auto-oxydation.	8
2	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.	9
3	Effets délétères du stress oxydatif sur la santé humaine.	11
4	Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant.	12
5	Les défenses antioxydantes.	15
6	Structures de tocophérol et de tocotriénol.	17
7	Absorption, transport et distribution de l' α -Tocophérol	18
8	L' α -Tocophérol médiateur de la peroxydation lipidique.	20
9	Expérimentation animale.	21
10	Aliment fourni aux souris sous forme de poudre.	22
11	Vitamine E commerciale.	23
12	Dissection d'une souris.	24
13	Broyage des échantillons rénaux à l'aide d'un homogénéiseur.	25
14	Automate de traitement des tissus.	29
15	Module de refroidissement des blocs de paraffine.	29
16 (A et B)	Variations du poids corporel en gramme chez les souris Albinos de souche NMRI.	31-32
17 (A et B)	Evaluation du poids rénal chez les souris Albinos de souche NMRI.	35-36
18 (A, B et C)	Effet de la supplémentation de 700mg d' α -Tocophérol/kg d'aliments sur la teneur en protéines, l'activité de la CAT et le taux en MDA du tissu rénal chez les souris Albinos de souche NMRI.	38
19	Effet de la supplémentation de doses croissantes d' α -Tocophérol/kg d'aliments sur la teneur en protéines, l'activité de la CAT et le taux en MDA du tissu rénal chez des souris Albinos de souche NMRI.	41
20 (a et b)	Micrographie du cortex rénal (10 \times , H&E) montrant : (a) architecture normale chez le lot "témoin" : RS, et (b) chez les souris supplémentées avec 700 mg d' α -Tocophérol / kg d'aliment : RSE ₇₀₀ . G : Glomérules, TCP : tube contourné proximal, TCD : tube contourné distal.	46

21 (a et b)	Micrographie du cortex rénal du lot RSE ₉₀₀ , montrant la présence de glomérules atrophies, de multiples congestions vasculaires et des tubes contournés distaux et proximaux altérés légèrement ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, AG : atrophie glomérulaire, TCA : tubes contournés altérés, EG : ectasie glomérulaire.	47
22 (a et b)	Micrographie du cortex rénal du lot RSE ₁₀₀₀ , montrant la présence de multiples congestions vasculaires plus importantes, des tubes contournés distaux et proximaux altérés légèrement ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, AG : atrophie glomérulaire, FL : foyer leucocytaire, TCA : tubes contournés altérés.	48
23 (a et b)	Micrographie du cortex rénal du lot RSE ₁₀₅₀ , montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes, réduction de la lumière des tubes contournés distaux et proximaux a ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, EG : ectasies glomérulaires.	49
24 (a et b)	Micrographie du cortex rénal du lot RSE ₁₁₀₀ , montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes, réduction de la lumière des tubes contournés distaux et proximaux a ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, EG : ectasie glomérulaire.	49
25 (a et b)	Micrographie du cortex rénal du lot RSE ₁₁₅₀ , montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes avec désorganisation ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). AG : atrophie glomérulaire, CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, EG : ectasie glomérulaire.	50
26 (a et b)	Micrographie du cortex rénal du lot RSE ₁₂₀₀ , montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes avec désorganisation ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). AG : atrophie glomérulaire, CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, V : vacuoles.	50

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Espèces physiologiquement réactives communes.	3
II	Préparation des régimes.	23
III	Gamme étalon réalisée à partir de la solution BSA.	26
IV	Les différentes étapes de la coloration des tissus.	30

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des abréviations	
Glossaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Première partie : Etude bibliographique	
Chapitre I : stress oxydatif	
I.1. Définition	3
I.2. Les radicaux libres	3
I.2.1. Espèces radicalaires	4
I.2.2. Espèces non radicalaires	5
I.3. Les principales sources des espèces réactives oxydantes	6
I.3.1. Sources d'oxydants endogènes	6
I.3.2. Sources d'oxydants exogènes	7
I.4. Les principales cibles biomoléculaires des radicaux libres	7
I.4.1. Les lipides	7
I.4.2. L'acide désoxyribonucléique	9
I.4.3. L'acide ribonucléique	9
I.4.4. Les protéines	10
I.5. Les effets physiologiques et physiopathologiques associés au stress oxydatif	10
I.5.1. Les effets physiologiques	10
I.5.2. Les effets pathologiques	11
I.6. Les biomarqueurs du stress oxydatif	11
Chapitre II : Systèmes antioxydants	
II.1. Définition	12
II.1.1. Système antioxydant enzymatique	12

II.1.2. Système antioxydant non enzymatique	13
II.1.2.1. Système antioxydant non enzymatique endogène	14
II.1.2.1. Système antioxydant non enzymatique exogène	15
Chapitre III : Vitamine E	
III.1. Famille et structure chimique	17
III.2. Propriétés physico-chimiques	17
III.3. Sources et apports nutritionnels	17
III.4. Métabolisme	18
III.5. Mode d'action de la vitamine E	19
III.5.1. Action antioxydante de la vitamine E	19
III.5.2. Action pro-oxydante de la vitamine E	19
Deuxième partie : Etude expérimentale	
Chapitre I : Matériel et méthodes	
I.1. Matériel	21
I.1.1. Matériel biologique	21
I.1.1.1. Animaux étudiés	21
I.1.1.2. Supplémentation de l'aliment	22
I.1.1.3. Supplémentation de la vitamine E (α -T)	23
I.1.1.4. Sacrifice et prélèvement des reins	24
I.1.2. Matériel non biologique	24
I.2. Méthodes	24
I.2.1. Dosage des protéines	25
I.2.2. Dosage de malonaldéhyde	26
I.2.1. Dosage de l'activité de la catalase	27
I.3. Etude statistique	28
I.4. Réalisation des coupes histologiques	29
Chapitre II : Résultats et discussion	
II.1. Modifications physiologiques	32
II.1.1. Symptomatologie	32
II.1.2. Effets de la supplémentation en α -tocophérol sur les paramètres pondéraux	32
II.2. Effets de la supplémentation en α -tocophérol sur quelques paramètres du stress oxydatif	37
II.2.1. Effets de différentes doses d' α -tocophérol sur la teneur en protéines, l'activité de la catalase et le taux en malonaldéhyde au niveau du tissu rénal	37

II.3. Effets de la supplémentation en α -tocophérol à différentes doses sur l'histologie du tissu rénal	45
Conclusion et perspectives	52
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Les réactions d'oxydoréduction sont nombreuses dans l'organisme et sont à l'origine de plusieurs mécanismes biochimiques. Ces réactions conduisent à la formation d'une large famille d'espèces réactives d'oxygène et d'azote (EROA). Lorsqu'un déséquilibre entre ces espèces réactives et l'habilité des systèmes biologiques à réduire, par oxydoréduction, elles se produisent, il y a apparition du stress oxydatif (**Kohen et Nyska,2002**). Quand la formation de ces EROA surpasse la capacité des défenses antioxydantes, les radicaux libres nocifs s'accumulent et augmentent la probabilité des dommages oxydants aux biomolécules critiques tels que les enzymes, les protéines, les lipides membranaires et l'ADN.

Les EROA ont gagné de l'importance dans le domaine de la biologie, en raison de leur rôle central dans des conditions physiologiques diverses aussi bien que dans leur implication dans une gamme diverse de maladies (**Phaniendra et al.,2015**), touchant plusieurs organes dont les reins sont les plus sensibles à cause de l'environnement urinaire qui est pro-oxydant (**Agarwal et al.,2004**).

Selon Halliwell (**2008**), les cellules d'un animal ne peuvent pas éviter directement les espèces réactives, elles ont alors adopté des stratégies de défense contre le stress oxydant, qui consiste en un réseau enzymatique et non enzymatique, aussi bien endogène qu'exogène, agissant synergiquement, à cela s'ajoutent quelques oligoéléments, comme le sélénium, le cuivre et le zinc (**Haleng et al.,2007**), qui jouent le rôle de cofacteur pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes.

Pour renforcer le système antioxydant spontané qui peut être défaillant, une supplémentation en molécules antioxydantes naturelles ou synthétiques est nécessaire. La vitamine E est largement reconnue comme l'un des antioxydants les plus puissants (**Peh et al.,2016**), qui est utilisée pour décrire une famille de tocophérols dont l' α -tocophérol (l' α -T) est le membre le plus abondant et important (**Raman et al.,2011**), dont le rôle principal est de protéger l'intégrité des structures lipidiques, principalement les membranes (**Burton et Traber,1990**). Cependant l'augmentation du seuil de concentration d' α -T peut, surtout dans des conditions de stress oxydatif accru, entraîner une augmentation du taux de radicaux d' α -tocophéroxyde (α -T \bullet) qui ne peuvent plus être efficacement détoxifiés par les co-antioxydants. Ceci offre la possibilité d'une toxicité pro-oxydante du radical α -T \bullet (**Raman et al.,2011**).

Des études menées *in vitro* par Bowry et al., (**1992**), d'autres 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 est l'interaction du radical $\alpha\text{-T}^\bullet$ avec des radicaux peroxydes ou avec des acides gras polyinsaturés dans les LDL. Cette réaction mène à l'accumulation des hydroperoxydes et des diènes conjugués (**Mukai,1993**).

Actuellement, il existe très peu d'études *in vivo* sur le potentiel pro-oxydant de fortes doses de vitamine E, et c'est dans ce contexte que s'insère cette étude, dont l'objectif est d'étudier l'effet de la supplémentation de doses croissantes en $\alpha\text{-T}$ (700,900,1000,1050,1100,1150 et 1200 mg/kg d'aliment) dans un régime alimentaire chez des souris Albinos de souche NMRI, traitées pendant 5 semaines, et d'évaluer la teneur en protéines et quelques marqueurs de la balance oxydants/antioxydants à savoir la l'activité de la catalase et le taux en Malondialdéhyde ,et sur l'histologie du tissu rénal nous souhaitons contribuer à une meilleure compréhension de l'effet de ces suppléments sur les souris.

Etude Bibliographique

I.1. Définition

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, entraînant une perturbation de la signalisation et du contrôle du potentiel redox et/ou des dommages moléculaires (Sies,2015). Il peut se produire en raison de la surproduction d'oxydants, la diminution de la défense antioxydante ou une combinaison de ces deux facteurs (Ece et al.,2007).

I.2. Les radicaux libres

Un radical libre peut être défini comme un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans l'enveloppe de valence ou l'orbite externe, et peut exister indépendamment. Le nombre impair d'électron(s) d'un radical libre le rend instable, de courte durée et très réactif (Andersson,2018).

Les radicaux libres sont formés à partir de molécules par le clivage homolytique d'une liaison chimique et par des réactions redox, une fois formés, ces radicaux très réactifs peuvent déclencher une réaction en chaîne (Bahorun et al.,2006 ; Valko et al.,2006).

Les espèces d'oxygène réactif (ERO) et les espèces d'azote réactif (ERA) décrivent les radicaux libres et autres dérivés réactifs non radicalaires (Sen et al.,2010) (Tableau I).

Tableau I : Espèces physiologiquement réactives communes.

	Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Espèces réactives d'oxygène (ERO)	Anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ Radical hydroxyle OH^{\bullet} Radical peroxyde ROO^{\bullet}	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 Peroxydes organiques R-OOH Par exemple. Peroxydes de lipides L'acide hypochloreux HOCl
Espèces réactives azotées (ERA)	Oxyde nitrique NO^{\bullet} Dioxyde d'azote NO_2^{\bullet}	Peroxynitrite ONOO-

(Small et al.,2012)

I.2.1. Espèces radicalaires

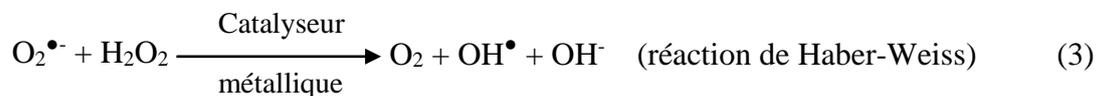
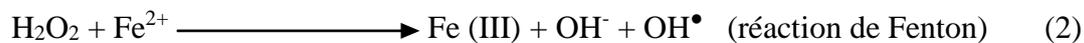
a) L'anion superoxyde

Le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est chargé négativement, il est essentiellement imperméable à la membrane et peu susceptible de traverser la membrane mitochondriale interne dans l'espace intermembranaire (**Lustgarten et al.,2012**). Le superoxyde est généré par la NADPH oxydase (réaction '1'), la xanthine oxydase et les peroxydases (**Pizzino et al.,2017**).



b) Radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) est une espèce radicalaire de l'oxygène la plus délétère du stress oxydant, en raison de son potentiel d'oxydoréduction très élevé, avec une demi-vie courte (**Therond,2006**), il peut être produit par réaction d'ions métalliques avec H_2O_2 (réaction '2' et '3') (**Halliwell et Gutteridge,2015**), ou par fission homolytique de la liaison O-O induite par les UV dans H_2O_2 (réaction '4') (**Salem et al.,2000**).



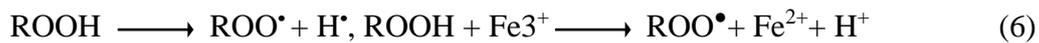
c) Oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) est un agent réducteur faible, qui réagit avec l'oxygène pour former du dioxyde nitrique, et réagit très rapidement avec le superoxyde pour produire du peroxyde nitrite (**Flohé et al.,2003**), il est synthétisé à partir de L-arginine par trois types d'isoformes de NOS, tels que les isoformes neuronales NOS (nNOS), NOS endothélial (eNOS) et NOS inductible (iNOS) (réaction '5') (**Phaniendra et al.,2015**).



d) Radicaux peroxydes et alcoxydes

Les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) et alcoxydes (RO^\bullet) sont de bons agents oxydants ayant un potentiel de réduction standard supérieur à 1000 mV. L'irradiation de la lumière UV, ou la présence d'ions de métaux de transition, peut provoquer l'hémolyse des peroxydes, pour produire des radicaux peroxydes et alcoxydes (réaction '6') (Ozcan et Ogun,2015).



I.2.2. Espèces non radicalaires

a) Oxygène singulet

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est une forme d'oxygène excité électroniquement, avec une demi-vie très courte, mais elle est capable de diffusion et est perméable aux membranes (Powers et Jackson,2008).

L'oxygène singulet n'est pas un véritable radical, mais on rapporte qu'il est une ERO importante dans les réactions liées à l'exposition aux ultraviolets (El-Beltagi et Mohamed,2013).

b) Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un intermédiaire réduit de l'oxygène, qui est relativement toxique (Gardès-Albert et al.,2003). Il est stable, perméable aux membranes (Halliwell et Gutteridge,2015) et peut se produire à la fois de façon non enzymatique, en étant démutualisé en H_2O_2 dans des conditions de pH faible, ou principalement par une réaction catalysée par la SOD (réaction '7') (Das et Roychoudhury,2014).



c) Peroxynitrite

Le peroxynitrite (ONOO^-) est un important agent biologique bactéricide, qui est produit par les macrophages activés pour combattre les infections (Goligorsky et Gross,2012). Son importance en tant qu'oxydant biologique provient de sa grande diffusibilité à travers les membranes cellulaires, donc il est cytotoxique et cause des lésions tissulaires et oxyde les lipoprotéines de basse densité (Ozcan et

Ogun,2015). Le NO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$ réagissent ensemble pour produire le peroxynitrite (ONOO^-) (**Nimse et al.,2015**).

d) L'acide hypochloreux

L'acide hypochloreux (HOCl) est un composé oxydant et chlorant (**Pitt et Spickett,2008**), il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

L'acide hypochloreux est produit par les neutrophiles activés au site de l'inflammation, à partir du peroxyde d'hydrogène et du chlorure (réaction '8'), catalysée par l'enzyme myéloperoxydase (**Winterbourn et Kettle,2000**).



I.3. Les principales sources des espèces réactives oxydantes

Les cellules et les organes dans leur métabolisme aérobie normal sont soumis à une exposition continue aux oxydants. Les sources peuvent être divisées en sites endogènes et exogènes (**Sies,2018**).

I.3.1. Sources d'oxydants endogènes

Les sources endogènes potentielles comprennent :

- des réactions impliquées dans la chaîne respiratoire, le système du cytochrome P450 au niveau du réticulum endoplasmique lisse (**Engwa,2018**),
- de plus, les réactions impliquant le fer et d'autres métaux de transition, les peroxysomes, la xanthine oxydase (**Engwa,2018**). La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, la myéloperoxydase (MPO), la lipoxygénase (**Salisbury et Bronas,2015**),
- les cellules inflammatoires, y compris les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages sont également une source endogène d'oxygène réactif (**Klaunig et Wang,2018**). Les phagocytes synthétisent et stockent les radicaux libres, afin de pouvoir les libérer lorsque des microbes pathogènes envahissants doivent être détruits (**Droge,2002 ; Young et Woodside,2001**),
- l'exercice excessif (**Pham-Huy et al.,2008**).

I.3.2. Sources d'oxydants exogènes (exposomes)

L'ensemble des influences externes a été désigné sous le nom d'exposome (**Wild,2012**), comme :

- les rayonnements ionisants, tels que les rayons X, les neutrons, ainsi que les rayons α , β , et γ , peuvent tous causer un stress oxydatif (**Bhattacharyya et al.,2014**),
- la chimiothérapie anticancéreuse, s'accompagne souvent d'effets secondaires toxiques, et la production des ERO par des agents chimiothérapeutiques est le principal événement menant à la toxicité induite (**Bhattacharyya et al.,2014**),
- les doses élevées d'un mélange de polluants atmosphériques, tels que le NO_2 et l' O_3 (**Churg,2003**), ainsi que la fumée de cigarette contient de grandes quantités l'oxydation de la fumée de cigarette, induirait une surexpression des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les cellules (**Rao et al., 2016**),
- certains médicaments (cyclosporine, tacrolimus, gentamycine, bléomycine) (**Phaniendra et al.,2015**), et xénobiotiques contribuent à la formation de radicaux libres dans l'organisme (**Bhattacharyya et al.,2014**),
- les suppléments antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols comme les flavonoïdes (**Rietjens et al.,2002**), peuvent agir comme pro-oxydants s'ils sont consommés à des niveaux qui dépassent largement l'apport alimentaire recommandé (**Pham-Huy et al., 2008**).

I.4. Les principales cibles biomoléculaires des radicaux libres

A des concentrations élevées, les ERO peuvent être d'importants médiateurs de dommages aux structures cellulaires, aux lipides et aux acides nucléiques, et aux protéines (**Valko et al.,2007**).

I.4.1. Les lipides

La peroxydation des lipides est un processus par lequel des oxydants tels que les radicaux libres attaquent les lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI) (**Ayala et al.,2014**).

Ce processus peut être décomposé en trois phases distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison (**Gaschler et Stockwell,2017**) (**figure 01**).

a) Initiation

La peroxydation lipidique est initiée lorsque le radical OH^\bullet attaque et extrait l'hydrogène d'un groupe méthylène (CH_2) dans un acide gras polyinsaturé (LH), ce qui entraîne la formation d'un radical lipidique centré sur le carbone (L^\bullet), qui peut réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un radical lipide peroxyde (LOO^\bullet) (Phaniendra *et al.*, 2015).

b) Propagation

Ce dernier peut à son tour arracher un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente ($\text{L}'\text{H}$), créant ainsi une réaction en chaîne (propagation) ; la combinaison du radical peroxyde avec l'atome d'hydrogène conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^+), formera des radicaux alcoxydes (LO^\bullet) et hydroxyles (OH^\bullet). Les radicaux peroxydes peuvent aussi conduire à des peroxydes cycliques (Michel *et al.*, 2008).

c) Terminaison

Après avoir atteint une vitesse maximale d'oxydation, celle-ci diminue par combinaison des radicaux lipidiques pour donner des aldéhydes non radicalaires tel que le malondialdéhyde (MDA) (Michel *et al.*, 2008). La réaction en chaîne peut être interrompue par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable, ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Delattre *et al.*, 2005).

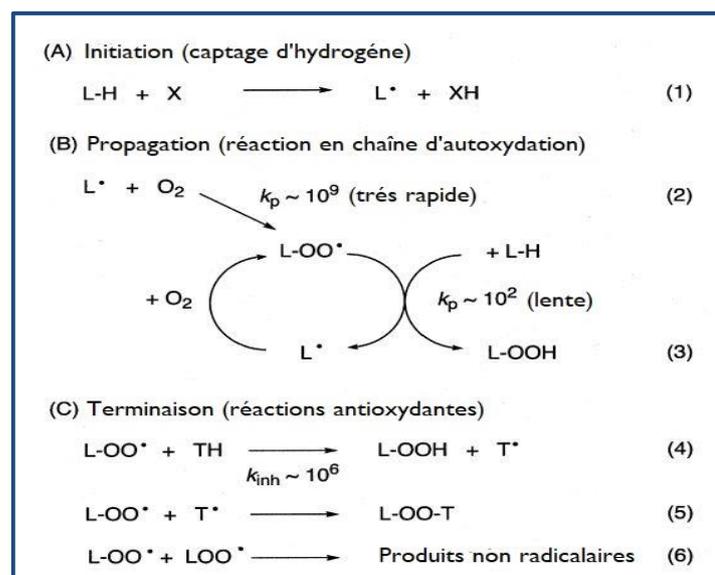


Figure 01 : Initiation, propagation et terminaison de la réaction en chaîne d'auto-oxydation (Schneider, 2005).

I.4.2. L'acide désoxyribonucléique

Le radical hydroxyle est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN ; endommageant à la fois les bases purines et pyrimidines, ainsi que les bases désoxyriboses de l'épine dorsale (**Dizdaroglu et al.,2002**).

Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH^\bullet peuvent être générées (**Favier,2003**), parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra- caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (**Cadet et al.,2002**) (**figure 02**).

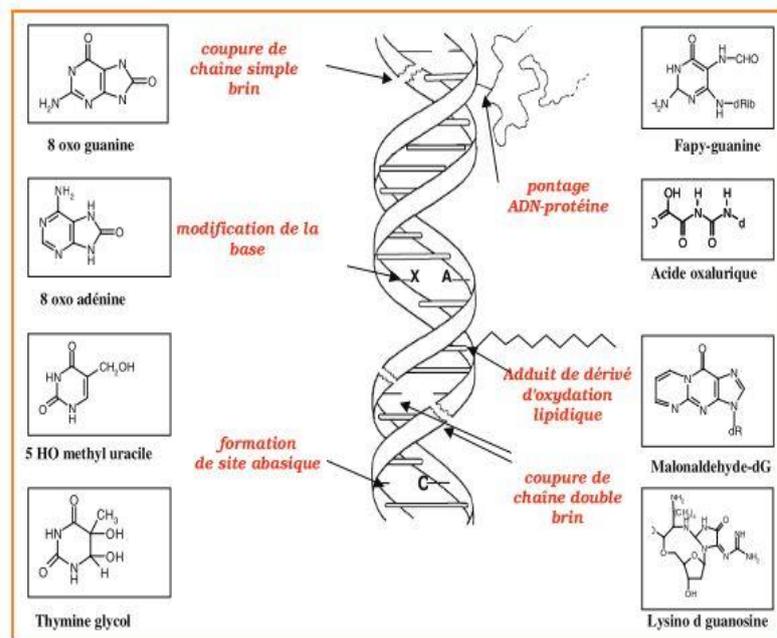


Figure 02 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (**Favier,2003**).

I.4.3. L'acide ribonucléique

L'ARN est plus sujet aux dommages oxydatifs que l'ADN, en raison de sa nature simple brin, de son absence de mécanisme de réparation active de l'ARN oxydé, de moyens de protection des protéines par rapport à l'ADN. De plus, ces ARN cytoplasmiques sont situés à proximité immédiate de la mitochondrie où les ERO sont produites (**Phaniendra et al.,2015**).

La 7,8-dihydro-8-oxo-guanosine (8-oxoG) est le produit de dégradation des ARN (**Abe et al.,2002**).

I.4.4. Les protéines

Les protéines sont une cible importante pour les oxydants biologiques en raison de leur abondance (**Davies, 2012**). Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (formation de protéines carbonylées « PC ») (**Levine, 2002**).

Selon Baraibar et *al.*, (**2013**), ces protéines carbonylées sont produites soit par :

- oxydation directe des chaînes latérales d'acides aminés sensibles (lysine, arginine, proline, thréonine),
- fragmentation de la chaîne carbonée par oxydation d'un résidu glutamique ou par α -amidation,
- la réaction de produits aldéhydiques de peroxydation lipidique, et de composés dicarbonylés sur glycation et glycoxydation.

Les acides aminés soufrés, tels que la méthionine et la cystéine, sont plus sensibles à l'oxydation par les ERO et sont convertis en méthionine sulfoxyde et en disulfures et respectivement (**Brodie et Reed, 1990 ; Pryor et al., 1994**).

I.5. Les effets physiologiques et physiopathologiques associés au stress oxydatif

Le stress oxydatif et la modification oxydative des biomolécules sont impliqués dans un certain nombre de processus physiologiques et physiopathologiques (**Lobo et al., 2010**).

I.5.1. Les effets physiologiques

Lorsqu'ils sont maintenus à des concentrations faibles ou modérées, les radicaux libres jouent plusieurs rôles bénéfiques pour l'organisme (**Pizzino et al., 2017**) :

- ils sont nécessaires au processus de maturation des structures cellulaires, et peuvent servir dans le système de défense de l'hôte (**Pham-Huy et al., 2008**),
- ils jouent un rôle régulateur clé dans les cascades de signalisation intracellulaire, dans plusieurs types de cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales (**Pizzino et al., 2017**),
- le stress oxydatif induit l'apoptose pour préparer le canal de naissance à l'accouchement (**Yoshikawa, 2002**),
- l'augmentation des ERO peut induire l'expression de certains gènes relatifs aux activités antioxydantes (**Lecarpentier, 2007**).

I.5.2. Les effets pathologiques

S'il n'est pas strictement contrôlé, le stress oxydatif peut être responsable de l'induction de plusieurs maladies, à la fois chroniques et dégénératives, ainsi que de l'accélération du processus de vieillissement du corps et de la survenue de pathologies aiguës (**Pizzino et al.,2017**) (**figure 03**).

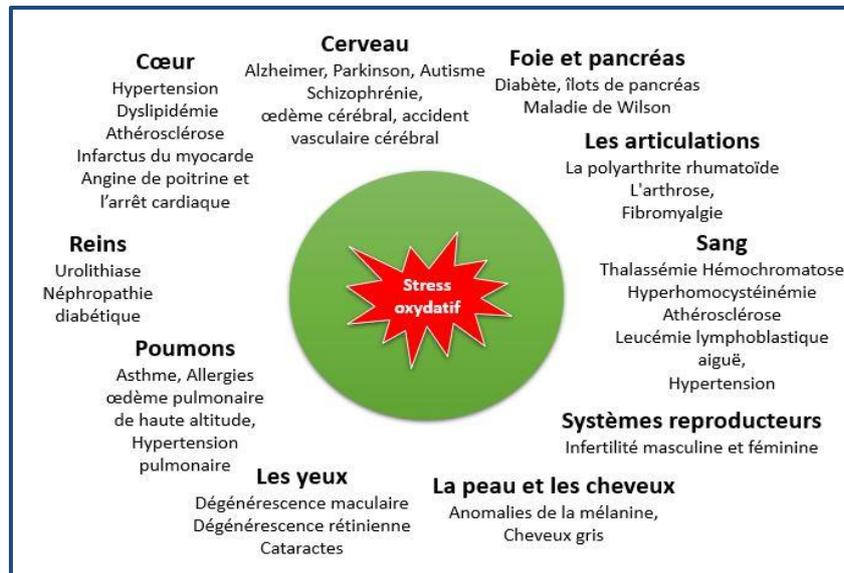


Figure 03 : Effets délétères du stress oxydatif sur la santé humaine (**Rahman et al.,2012**).

I.6. Les biomarqueurs du stress oxydatif

L'évaluation de l'ampleur du stress oxydatif à l'aide de biomarqueurs est intéressante d'un point de vue clinique (**Yoshikawa et Naito,2002**), elle est difficile car les radicaux libres ont des demi-vies très courtes (en secondes). Par contre, il existe des molécules marqueurs réelles, plus stables, qui ont des demi-vies plus longues, allant de quelques heures à quelques semaines, qui peuvent être utilisées pour évaluer le stress oxydatif (**Kao et al.,2010**).

Selon Yoshikawa et Naito (**2002**), de nombreux marqueurs ont été proposés, notamment :

- les peroxydes lipidiques, le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonéol comme marqueurs des dommages oxydatifs aux lipides,
- la 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) et le thymineglycol comme indicateurs des dommages oxydatifs à l'ADN,
- divers produits de l'oxydation des protéines et des acides aminés, y compris la protéine carbonylée, hydroxyleucine, hydrovaline et nitrotyrosine.

II.1. Définition

Les antioxydants sont des substances qui, lorsqu'elles sont présentes en faible concentration par rapport à celles des substrats oxydables, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de cette substance (Murthy, 2001). Ils se trouvent dans une grande variété de matières végétales et chez les animaux. (Yang et al.,2018).

Les cellules disposent de systèmes de défenses antioxydantes classées en antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (Loïc,2011) (figure 04).

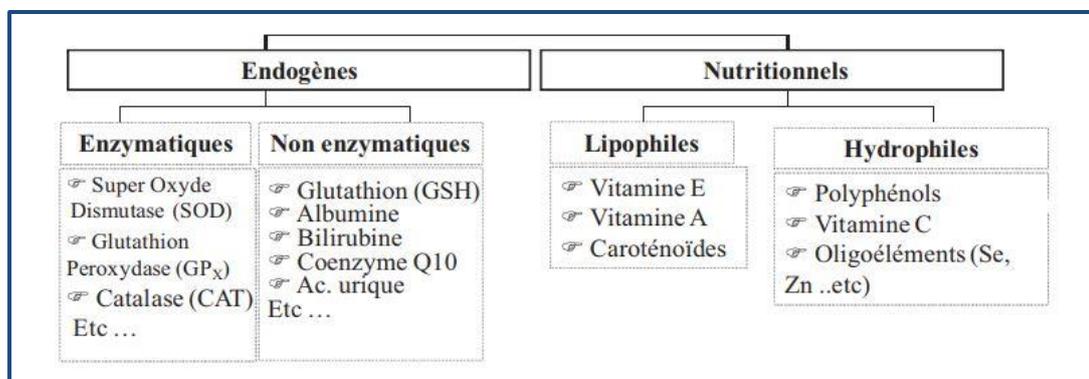


Figure 04 : Différentes sources d'antioxydants dont dispose l'organisme pour répondre aux situations de stress oxydant (Durand et al.,2013).

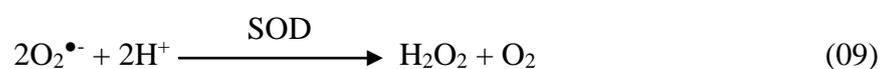
II.1.1. Système antioxydant enzymatique

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défense cellulaires contre les attaques oxydatives (Loïc,2011).

a) La superoxyde dismutase (EC.1.15.1.1)

La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine, et est la première enzyme impliquée dans la défense antioxydante (Prashanthi et al.,2017).

Les SOD éliminent l'O₂^{•-} en catalysant sa dismutation, un O₂^{•-} étant réduit en H₂O₂ et un autre oxydé en O₂ (réaction '09') (Halliwell,2006).



Les superoxydes dismutases sont constituées de trois isoformes de SOD chez les mammifères : le Cu/ZnSOD cytoplasmique (SOD1), le MnSOD mitochondrial (SOD2) et le Cu/ ZnSOD extracellulaire (SOD3), qui nécessitent tous un métal catalytique (Cu ou Mn) pour leur activation (**Fukai et Ushio-Fukai,2011**).

b) Catalase (EC.1.11.1.6)

La catalase (CAT) est une enzyme hémique, à quatre sous-unités contenant un groupe hémique avec du fer ferrique, dans chacune des sous-unités identiques (**Krych-Madej et Gebicka,2017**), localisée essentiellement dans les peroxysomes (**Valko et al.,2006**).

La CAT est une enzyme dont la fonction principale est de catalyser la décomposition, par dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (réaction '10') (**Powers et Jackson, 2008**).



c) Glutathion peroxydase (EC.1.11.1.9)

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine ayant fonction d'enzyme, formée de quatre sous-unités identiques (homotétramère), contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule sélénocystéine (**Raman et Berry, 2011**). La GPx est bien distribuée dans tous les tissus chez les animaux, elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en oxydant deux molécules de glutathion GSH réduites en GSSG (réaction '11') (**Halliwell et Gutteridge, 2008**). La glutathion réductase (GR) qui est une oxydoréductase NADPH dépendant, coopérant avec la GPx pour catalyser la conversion du glutathion oxydé (GSSG) au glutathion réduit (GSH) (**Csiszàr et al.,2016**).



II.1.2. Système antioxydant non enzymatique

Parmi les antioxydants non-enzymatiques, on distingue des composés endogènes et des composés exogènes (**Loïc,2011**).

II.1.2.1 Système antioxydant non enzymatique endogène

a) Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine), il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique, et permet d'objectiver l'importance du stress. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire. (**Haleng et al.,2007**).

b) L'acide urique

L'acide urique est le produit de dégradation des composés puriques, comme la xanthine et l'hypoxanthine (**Villasante et al.,2010**), il protège les protéines de la nitration par le peroxy-nitrite ONOO- (**Halliwell et Gutteridge, 2008**).

L'acide urique est un puissant capteur d'oxygène singulet, de radicaux peroxyles (RO_2^\bullet) et de radicaux hydroxyles (OH^\bullet) (**Sautin et Johnson,2008**).

c) La bilirubine

La bilirubine (BR) est un composé non hydrosoluble, un produit terminal de la dégradation de l'hème, et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales (**Haleng et al.,2007**), elle est fortement liée aux protéines et aux lipoprotéines plasmatiques, et potentialise la défense antioxydante sanguine (notamment avec l'albumine) (**Halliwell et Gutteridge, 2008**).

La BR est un piègeur d'oxygène singulet et de radicaux peroxyles RO_2^\bullet , et protège ainsi l'albumine et les acides gras, qui y sont associés des attaques radicalaires (**Théron et Bonnefont-Rousselot,2005**).

d) Le coenzyme Q₁₀

Le coenzyme Q₁₀, appelé ubiquinone benzoquinolique, il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons (**Haleng et al.,2007**). Sous sa forme réduite, le CoQH₂ (l'ubiquinol) inhibe l'oxydation des protéines et de l'ADN (**Littarru et Tiano,2007**).

Son association avec l' α -T a été efficace dans le maintien de la motilité, de l'intégrité et de la fonctionnalité de la membrane plasmique (Yousefian et al.,2014), en éliminant les radicaux RO_2^\bullet et en inhibant la peroxydation des lipides (Powers et Jackson,2008).

II.1.2.2. Système antioxydant non enzymatique exogène

a) Vitamine E

La vitamine E (α -T) est un antioxydant liposoluble, qui est considéré comme un piègeur potentiel d'ERO et des radicaux lipidiques. Il constitue un antioxydant majeur des biomembranes, et dont le rôle principal consiste à maintenir leur protection et leur stabilité, en empêchant l'étape de propagation en chaîne dans la peroxydation lipidique, qui est en fait un piège efficace pour les radicaux libres (Gill et Tuteja, 2010).

b) Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est un composé organique naturel, aux propriétés antioxydantes (Pehlivan,2017), il est efficace pour éliminer l'anion du radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et l'oxyde d'azote réactif (Barros et al.,2011).

Une des fonctions antioxydantes de la vitamine C est la régénération de la vitamine E (Jomova et Valko,2012) (figure 05).

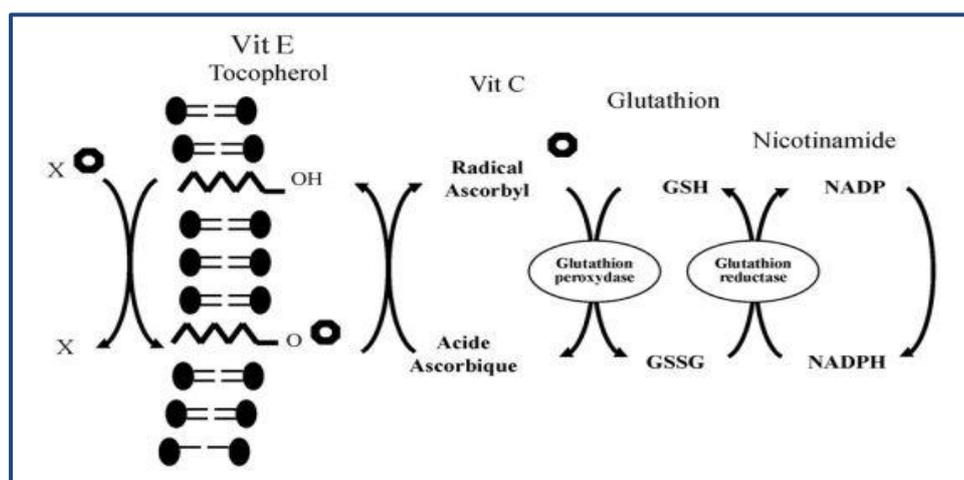


Figure 05 : Les défenses antioxydantes (Leverve,2009).

c) Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont un groupe de pigments naturels, qui sont synthétisés par les plantes (**Carocho et Ferreira,2013**). L'oxygène singulet, les radicaux peroxy et alkyles, sont les cibles préférentielles des caroténoïdes (**Clarkson et Thompson, 2000 ; Zuo,2002**).

d) Les polyphénols

Les polyphénols sont un groupe de molécules chimiques produites par des plantes (**Masaki,2010**). Ils ont une activité antioxydante en tant que chélateurs et piègeurs de radicaux libres (**Carocho et Ferreira,2013**).

III.1. Famille et structure chimique

La vitamine E est composée de huit isoformes, dont quatre tocophérols (α -tocophérol, β -tocophérol, γ -tocophérol et δ -tocophérol), et quatre tocotriénols (α -tocotriénol, β -tocotriénol, γ -tocotriénol et δ -tocotriénol), l' α -tocophérol étant l'isoforme la plus puissante et la plus abondante des systèmes biologiques. Le groupe de tête chromane confère l'activité antioxydante aux tocophérols (Nimse et Pal,2015) (figure 06).

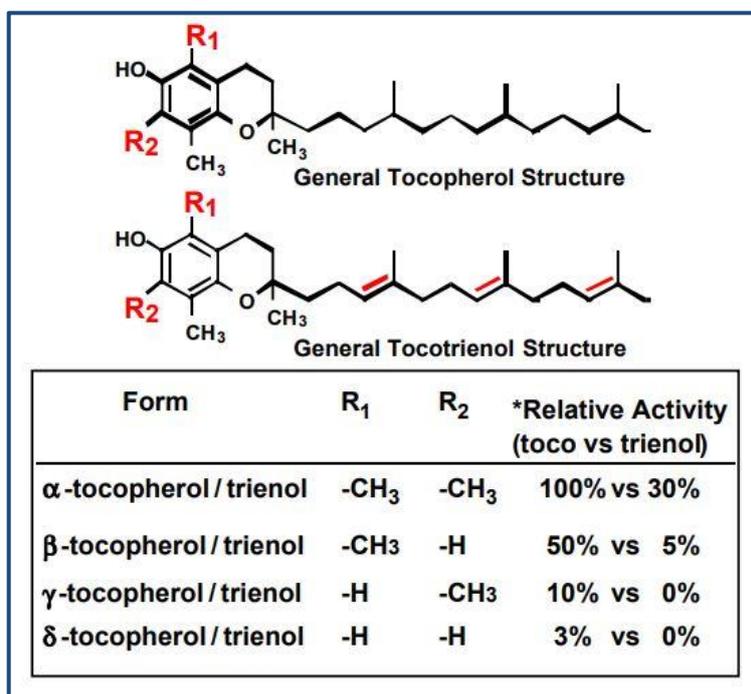


Figure 06 : Structures de tocophérol et de tocotriénol (DellaPenna,2005).

III.2. Propriétés physico-chimiques

Les tocophérols sont des huiles jaune clair à température ambiante. Ils sont insolubles dans l'eau, mais facilement solubles dans les solvants non polaires (Gerald et al.,2017). A haute pureté, ils sont presque inodores et incolores (Robert et al.,2001), ils sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases (Claude,2003).

III.3. Sources et apports nutritionnels

La vitamine E n'est synthétisée que par des organismes photosynthétiques, plantes, algues et certaines cyanobactéries.

Les huiles de maïs et de soja contiennent principalement du γ -(RRR)-tocophérol. Les tissus animaux ont tendance à contenir de faibles quantités d' α -T, les concentrations les plus élevées se trouvant dans les tissus adipeux (**Gerald et al.,2017**).

Les suppléments commerciaux de vitamine E sont commercialisés pour leurs fonctions antioxydantes, afin de protéger les membranes cellulaires des dommages oxydatifs dans le corps humain (**Duncan et Chang,2012**).

III.4. Métabolisme

D'après Mardones et Rigotti (**2004**), l' α -T est absorbée dans l'intestin et incorporée dans les chylomicrons, qui sont transformés en particules résiduelles par remodelage des tissus musculaires et adipeux, à médiation lipasique par les lipoprotéines. Le chylomicron résiduel associé au α -T est finalement transporté vers le foie, où il est sélectivement incorporé dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) par la protéine de transfert du α -T (α -TTP), et est resécrété dans la circulation. Les lipoprotéines endogènes contenant de l'apoB (VLDL et LDL) peuvent échanger l' α -T via protéine de transfert de phospholipides plasmatiques (PLTP) avec des lipoprotéines de haute densité (HDL). Le LDL et le HDL sont les principaux vecteurs de l' α -T plasmatique, ainsi que les principales sources de l' α -T pour l'absorption cellulaire dans les tissus périphériques. Le HDL peut également éliminer l'excès de l' α -T des cellules. Enfin, l' α -T est principalement excrété dans la bile sous forme d' α -T et d'autres dérivés, bien qu'une petite fraction soit également éliminée dans l'urine (**figure 07**).

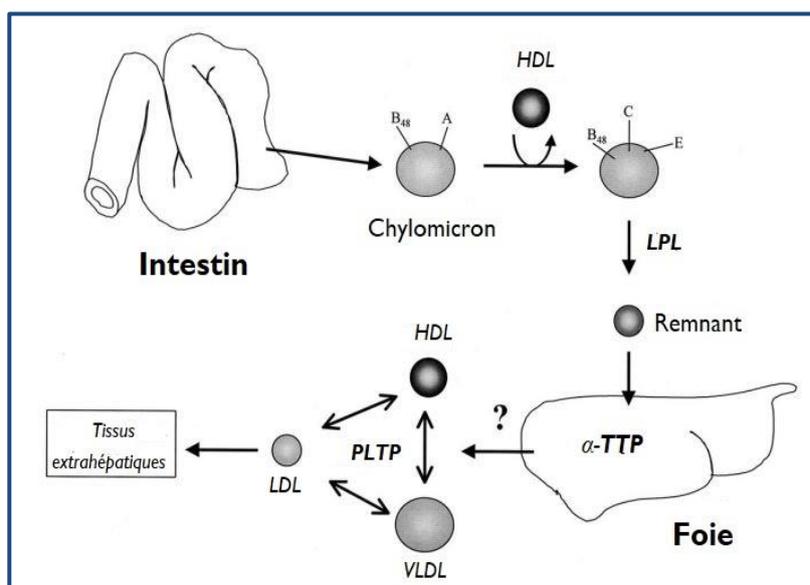


Figure 07 : Absorption, transport et distribution de l' α -tocophérol (**Azzi et Stocker,2000**).

III.5. Mode d'action de la vitamine E

L'action de la vitamine E a beaucoup plus d'effet selon le contexte physiologique. Bien qu'elle agisse principalement comme antioxydant, la vitamine E peut aussi être un pro-oxydant (Schneider,2005).

III.5.1. Action antioxydante de la vitamine E

D'après Gerald et *al.*, (2017), le rôle nutritionnel principal de la vitamine E est celui d'un antioxydant biologique parce que :

- la vitamine E est distribuée dans les membranes, elle sert d'antioxydant biologique liposoluble à haute, où elle bloque l'initiation et interrompt la propagation de la peroxydation lipidique,
- Elle est essentielle au fonctionnement optimal du système immunitaire,
- Elle sert d'antioxydant dans les LDL, ce qui peut protéger contre l'athérosclérose,
- Elle est essentielle à la fonction neurologique, elle est conservée par les tissus neuronaux, vers lesquels elle est redistribuée à partir d'autres tissus dans des conditions de carence,

De plus :

- l' α -T peut moduler directement les voies de signalisation cellulaire, principalement la protéine kinase C, ce qui entraîne des réponses biologiques diverses dans différents types de cellules (Azzi et *al.*,2002),
- une autre fonction antioxydante de la vitamine E, est d'inhiber l'agrégation plaquettaire (Suárez-Jiménez et *al.*,2016).

III.5.2. Action pro-oxydante de la vitamine E

La supplémentation avec un antioxydant comme la vitamine E peut ne pas toujours exercer l'effet protecteur visé. L'augmentation des niveaux d' α -T peut, surtout dans des conditions de stress oxydatif accru, entraîner une augmentation des niveaux de radicaux α -T \bullet qui ne peuvent plus être efficacement détoxifiés par les antioxydants. Ceci offre la possibilité d'une toxicité pro-oxydante du radical α -T \bullet (Rietjens et *al.*,2002).

Selon Stocker et *al.*, (1999), la peroxydation lipidique induite par les radicaux des lipoprotéines de basse densité (LDL) se fait par peroxydation médiée par les tocophérols (PMT), et est inhibée par les co-antioxydants (XH). L' α -T est située à la surface des particules LDL et peut faciliter l'entrée des radicaux dans la particule (réaction [1']). Le radical α -T \bullet qui en résulte peut initier la peroxydation des

lipides en prélevant un atome d'hydrogène des lipides de surface ou du noyau qui contiennent des hydrogènes bisallyliques (LH) (réaction [1]) ; il en résulte un radical $\alpha\text{-T}^\bullet$ et un radical lipidique (L^\bullet) centré sur le carbone auquel s'ajoute de l'oxygène moléculaire. Le radical peroxyde lipidique (LOO^\bullet) résultant est éliminé rapidement par l' $\alpha\text{-T}$ (réaction [2]) pour produire de l'hydroperoxyde lipidique (LOOH) et régénérer le radical l' $\alpha\text{-T}^\bullet$. La nature cyclique des réactions [1] et [2] permet la formation de nombreuses molécules de LOOH sans consommation de vitamine E. Les co-antioxydants (XH) inhibent la PMT en éliminant le radical $\alpha\text{-T}^\bullet$ (réaction [3]), et produisant du radical dérivé de co-antioxydant (X^\bullet) dans l'espace aqueux (réaction [4]), en formant ainsi des produits non radicalaires (PNR).

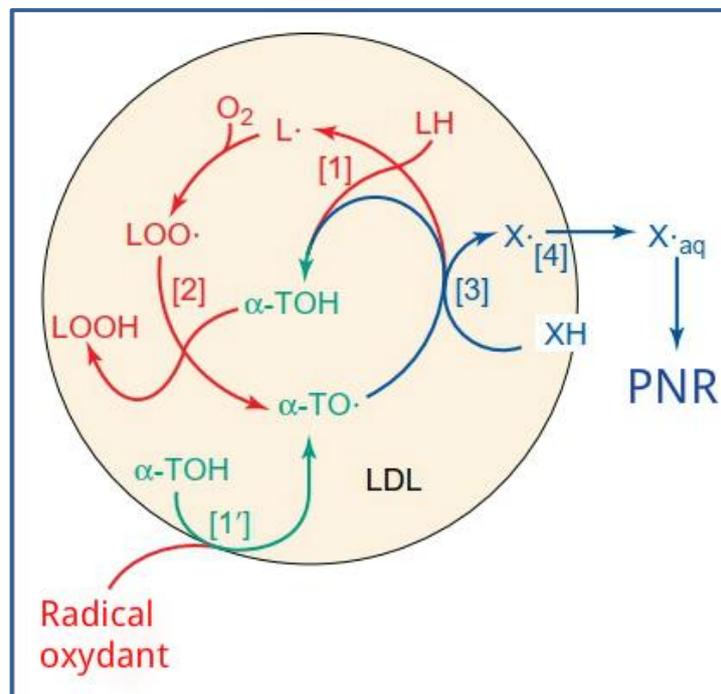


Figure 08 : L' α -tocophérol médiateur de la peroxydation lipidique (Stocker et *al.*, 1999).

Dans ce modèle de PMT, la vitamine E seule peut agir comme pro- ou anti-oxydant (en vert), selon la fréquence à laquelle les particules LDL rencontrent les radicaux et la présence de co-antioxydants. Les réactions pro-oxydantes sont indiquées en rouge ; les réactions antioxydantes en bleu.

Matériel et Méthodes

La présente étude a été réalisée sur une période de 4 mois, s'étalant du mois de Février au mois de Juin. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Laboratoire Pharmaco-Toxicologie du Centre de Recherche et de Développement (Saïdal-Gué de Constantine, Alger), afin de réaliser une expérimentation animale.
- Laboratoire Projet de Fin d'étude (PFE) Expérimentale de l'Université Blida -1-, pour la réalisation du dosage de différents paramètres du stress oxydant.
- Hôpital Dr. Fares Yahia (Koléa), pour l'étude anatomopathologique.

Par ailleurs, l'objectif assigné à cette étude consistait à déterminer la dose pro-oxydante de l' α -T, et à mettre en évidence les effets de sa supplémentation à différentes doses, sur la teneur en protéines et quelques paramètres du stress oxydatif à savoir, le MDA et l'activité enzymatique de la CAT ainsi qu'une étude histologique sur le tissu rénal des souris Albinos de souche NMRI.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

I.1.1.1. Animaux étudiés

L'expérimentation a été réalisée sur 24 souris mâles de race Albinos de souche NMRI âgées de trois semaines répartis en 8 lots (**Figure 09**), avec un poids corporel qui variait entre 10-15g, fournies par le Centre de Recherche et de Développement (Saïdal-Gué de Constantine, Alger).



Figure 09 : expérimentation animal (photo originale).

Les souris sont mises dans des cages en polyéthylène tapissées d'une litière, constituée de copeaux de bois et munies d'une porte étiquette, où est mentionné le nom du lot et le traitement subi.

Les cages sont nettoyées et la litière changée une fois tous les trois jours, jusqu'à la fin de l'expérimentation. L'eau est donnée *Ad libitum* dans des biberons adaptés aux cages. Les souris ont été soumises à une phase d'adaptation de 7 jours, durant laquelle elles ont été nourries avec un régime standard sous forme de poudre. Tous les 3 jours les souris ont été pesées.

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

I.1.1.2. Supplémentation de l'aliment

La nourriture a été fournie par l'Office National des Aliments de Bétail (ONAB), est apportée aux animaux sous forme de poudre dans des boîtes de Pétri (**Figure 10**) à raison de 5-7g d'aliment/jour/souris, quantité recommandée (**Jadot,1981**), et changé chaque jour pendant 6 semaines (une semaine d'adaptation et 5 semaines de traitement par l' α -T). Les aliments sont préparés tous les 3 jours par fraction de 100 g d'aliment, et gardés dans des boîtes hermétiques.



Figure 10 : Aliment fourni aux souris sous forme de poudre (photo originale).

L' α -T utilisée pour la supplémentation porte le nom commercial "API E", et est sous forme de comprimés de 100 mg (**Figure 11**).



Figure 11 : Vitamine E commerciale (photo originale).

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

I.1.1.3. Supplémentation de la vitamine E (α -T)

La vitamine E (α -T) a été administrée pendant 5 semaines à sept lots de 3 souris chacun (**Tableau II**).

Tableau II : Préparation des régimes.

Lot	Régime consommé
Témoin (RS)	Un régime standard.
RSE₇₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 700 mg d' α -T /kg d'aliment.
RSE₉₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 900 mg d' α -T /kg d'aliment.
RSE₁₀₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 1000 mg d' α -T /kg d'aliment.
RSE₁₀₅₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 1050 mg d' α -T /kg d'aliment.
RSE₁₁₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 1100 mg d' α -T /kg d'aliment.
RSE₁₁₅₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 1150 mg d' α -T /kg d'aliment.
RSE₁₂₀₀	Un régime standard (RS) supplémenté avec 1200 mg d' α -T /kg d'aliment.

I.1.1.4. Sacrifice et prélèvement des reins

Au bout de 6 semaines d'expérimentation, les souris sont sacrifiées après 12 heures de jeûne, une pesée a été effectuée avant de les anesthésiées par l'éther éthylique.

La souris est ensuite fixée sur le dos, à l'aide d'épingles enfoncées obliquement dans les pattes sur un support. On réalise une boutonnière dans la peau de l'abdomen en avant de l'orifice urinaire. On engage la sonde cannelée dans la boutonnière en décollant la peau jusqu'au menton. On découpe la peau et on la décolle, la rabattre vers l'extérieur et la fixer avec des épingles, puis on fait une boutonnière dans la paroi musculaire de l'abdomen, en introduisant une sonde cannelée jusqu'à la pointe du sternum, et on découpe les muscles. Enfin on découpe, et on enlève le plastron thoracique (**Figure 12**).



Figure 12 : Dissection d'une souris (photo originale).

Après la dissection, les reins (droits et gauches) sont soigneusement prélevés, rincés avec une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0.9%, ensuite pesés. Un premier fragment de rein de chaque souris est conservé dans du formol à 10%, pour la réalisation des coupes histologiques, le reste des fragments sont maintenus à -20°C, pour le dosage de quelques paramètres du stress oxydant (protéines rénales, MDA et l'activité enzymatique de la CAT).

I.1.2. Matériel non biologique (annexe 02)

I.2. Méthodes

Le dosage des différents paramètres du stress oxydant (Protéines, MDA et l'activité enzymatique de la CAT).

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

A. Principe

Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry et al. (1951). C'est une mesure colorimétrique, où l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu à une solution protéique, donne une coloration bleu foncé. 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 de reins,
- l'échantillon est broyé par un homogénéisateur de Potter Thomas pendant 30 à 45 secondes sous glace (**Figure 13**),

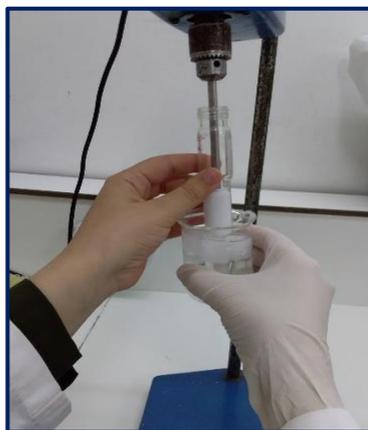


Figure 13 : Broyage des échantillons rénaux à l'aide d'un homogénéiseur (photo originale).

- 1ml de TCA à 1% est mis dans un tube en verre contenant 100 μ l de l'homogénat,
- centrifugation à 4000 tr/min pendant 15min,
- le surnageant est éliminé, et le culot est repris dans 1ml de TCA à 1% et centrifugé à 4000 tr/min pendant 15min,

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

b) Préparation des solutions du dosage (annexe 03)

c) Dosage

- 1ml de la solution A (**annexe 03**) est ajouté à 200 μ 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 μ l de réactif de la solution B (**annexe 03**).
- après 45 minutes, la densité optique à 750 nm est mesurée au spectrophotomètre contre l'eau bi-distillée (blanc).

d) Préparation de la courbe d'étalon

En parallèle des échantillons à doser, une gamme étalon (**annexe 04**) est réalisée à partir d'une solution protéique Sérum Albumine bovine (BSA) à 1 mg/ml, dans huit tubes contenant des volumes croissants de solution BSA (0-200 μ l), complétés avec de l'eau distillée (**tableau III**).

Tableau III : Gamme étalon réalisée à partir de la solution BSA.

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

I.2.2. Dosage du malonaldéhyde (Draper, 1993)

A. Principe

Le dosage du MDA est déterminé par la méthode de Draper (1993), c'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

a) Dosage

- 100 mg de l'échantillon de reins sont broyés en présence de 9 ml de tampon phosphate KH_2PO_4 (0,2 M à pH=7,4),
- 1ml de TCA à 10% sont mis dans un tube à essai, contenant 200 μl d'homogénat et 100 μl d'Hydroxytoluène Butylé (BHT),
- 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 4000tr/min pendant 10 min,
- un volume du surnageant est récupéré, auquel est ajouté un même volume d'une solution aqueuse d'Acide Thiobarbiturique (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.

b) Expression des résultats

La concentration du MDA est calculée selon l'équation suivante :

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

Avec :

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

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

A. Principe

En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H_2O_2 en fonction du temps (Aebi,1984).

B. Mode opératoire**a) Préparation des solutions du dosage (annexe 05)****b) Dosage**

- 9ml d'une solution de triton X-100 (1%) sont mis dans un tube Potter en présence de 100 mg de l'échantillon de reins,
- l'échantillon est broyé par un homogénéisateur de Potter Thomas pendant 30 à 45 secondes sous glace,
- déposer 30 μ l d'échantillon,
- 970 μ l Tampon phosphate 50mM pH = 7,4,
- déclencher la réaction avec 1000 μ l de H₂O₂ 30mM,
- La lecture de l'absorption se fait à 240 nm pendant 3 minutes (point chaque 30sec).

c) Expression des résultats

L'activité de CAT est calculée selon l'équation suivante :

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

Avec :

- V : volume de l'échantillon.
- v : volume total.
- Δt : temps de décomposition du H₂O₂.
- A1 : absorbance à t₀.
- A2 : absorbance à t_(30sec).
- X : quantité des protéines mg/ml.

I.5. Etude statistique

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

- Significative lorsque (P \leq 0,05).
- Très significative (P \leq 0,01).

- Hautement significative ($P \leq 0,001$).

Avec (P) : seuil de signification.

I.3. Réalisation des coupes histologiques

La technique utilisée est celle proposée par Martoja et Martoja (1967) à l'hématoxyline/ éosine. Les fragments des reins de chaque souris sont retirés du formol 10 %, coupés transversalement à l'aide d'un bistouri, et sont mis dans des cassettes spéciales à parois tournées, afin de permettre le passage des liquides.

- **Déshydratation**

Les échantillons sont ensuite déshydratés par l'agitation rapide d'un automate spécial (**Figure 14**), afin d'éliminer l'eau des tissus, en faisant passer le tissu dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 90% et 100%).



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

- **Inclusion**

Les tissus sont plongés dans de la paraffine fondue (portée à 56-58°C), étant maintenus et imbibés de paraffine dans de petits moules, ces derniers sont mis sur une plaque métallique réfrigérée, ce qui provoque leur durcissement, et donc la rigidification des fragments tissulaires prélevés (**Figure 15**).

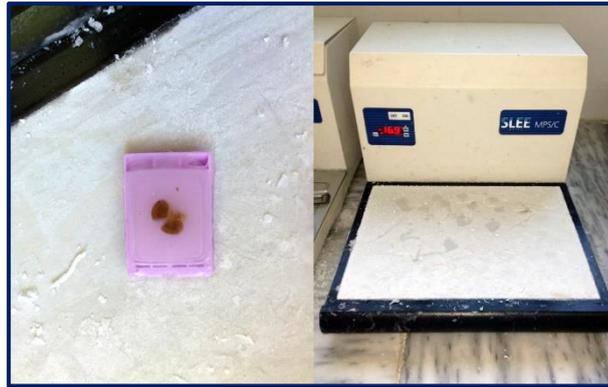


Figure 15 : Module de refroidissement des blocs de paraffine (photo originale).

- **Coupes et coloration**

On isole des rubans de coupes à partir des blocs d'inclusions, qui sont collés sur un porte-échantillon à l'aide d'un microtome (l'épaisseur est de 4 à 7 microns). Ces rubans sont étalés et fixés sur des lames gélatineuses. Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (HE) selon les étapes suivantes réalisées par l'automate (**Tableau IV**).

Tableau IV : Les différentes étapes de la coloration des tissus.

Etapes	Bains utilisés
1. Déparaffinage	➤ Xylène (20min)
2. Hydratation	➤ Alcool 100% (1min). ➤ Alcool 95% (30sec). ➤ Alcool 70% (30sec). ➤ Lavage eau (10min).
3. Coloration	➤ Hématoxyline de Groat (2min). ➤ Lavage eau (5min). ➤ Ammoniac (15sec). ➤ Eosine (5min). ➤ Lavage eau (10min).
4. Déshydratation	➤ Alcool 90% (30sec). ➤ Xylène (20min).

- **Montage et observation**

La dernière étape de l'histologie est le montage (mise en contact lame-lamelle), elle se déroule par le passage des lames dans un bain d'éthanol, suivi d'un bain contenant un mélange d'éthanol/xylène, et pour finir dans deux bains successifs de xylène. Quelques gouttes d'Eukit (colle biologique), ont été déposées sur des lamelles avant d'être placées sur les lames. L'ensemble lame et lamelles a été par la suite séché à l'air libre.

- Une fois l'histologie terminée, les lames ont été observées à l'aide d'un microscope optique à Gr : *10 puis *40, muni d'une caméra. Les images obtenues par cette caméra ont été transférées sur l'écran d'ordinateur à l'aide d'un logiciel.

Résultats et Discussion

II.1. Modifications physiologiques

II.1.1. Symptomatologie

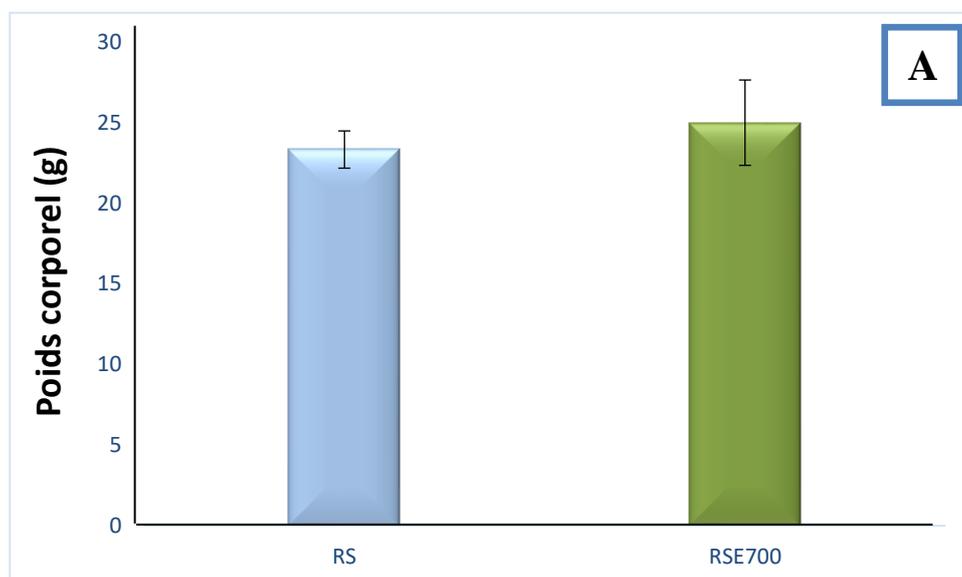
Les résultats symptomatologiques obtenus lors de la présente étude révèlent des manifestations toxiques, au niveau de certains lots (RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀, RSE₁₀₅₀, RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀), par contre le lot RSE₇₀₀ n'a montré aucun symptôme toxique.

Concernant les lots des souris nourries avec un régime standard et supplémentés avec 900 et 1000 mg d' α -T/kg d'aliment, nous avons observé une inappétence et une réduction de la prise alimentaire, par contre les lots qui ont été supplémentés avec 1100,1150 et 1200 mg d' α -T/kg d'aliment ,des diarrhées de couleur foncées ont été observés ,ces mêmes symptômes ont été déjà signalés par Abdo et *al.*, (1986), lors de l'administration d'une dose importante de vitamine E (2000 mg/kg d'aliment) à des rats mâles de souche Fischer 344 .Par contre nous n'avons noté aucune mortalité, ceci peut être due à la durée du traitement qui n'était pas assez longue. Notons qu'en 1986, Hanck n'a obtenu aucune manifestation toxique après l'administration orale de fortes doses de vitamine E : 2 000 mg/kg d'aliment chez les lapins et 5 000 mg/ kg d'aliment chez des rats.

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

a) Variations du poids corporel

Le suivi du poids corporel des souris témoins et ceux traitées par différentes doses d' α -T (**annexe 06**) est porté figure 16.A et figure 16, B :



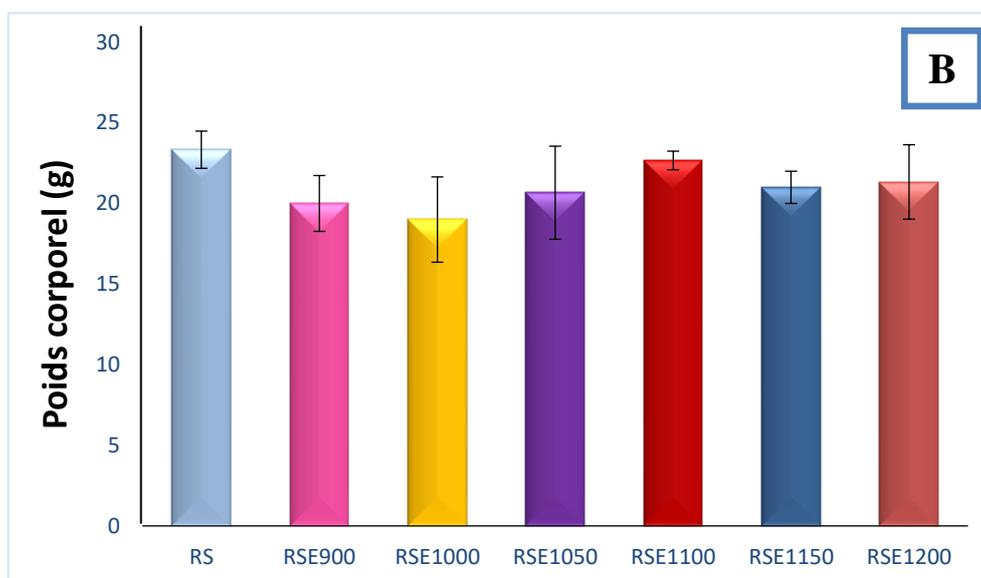


Figure 16 (A et B) : Variations du poids corporel en gramme chez les souris Albinos de souche NMRI.

Au vu des résultats obtenus, lors du suivi du poids corporel des souris, leur croissance pondérale n'a pas été affectée par la supplémentation en 700 mg d' α -T/kg d'aliment, d'ailleurs nous avons obtenu une légère augmentation non significative du poids par rapport au témoin (**figure 16, A**).

Nombreuses sont les études réalisées par des auteurs travaillant sur des doses en vitamine E se rapprochant aux nôtres et n'ayant obtenu aucune variation significative du poids corporel, tel est le cas de Jenkins et Mitchell (1975), qui ont signalé une augmentation non significative du poids corporel de rats ayant reçu 600 mg d' α -T /kg d'aliment après deux mois de traitement.

Une autre étude réalisée par Wheldon et *al.*, (1983) a montré que pendant 2 ans de régime alimentaire quotidien supplémenté à 500 mg d' α -T/kg d'aliment chez des rats Charles River, n'affecte pas leur croissance comparativement aux témoins. Trois ans plus tard Abdo et *al.*, avaient aboutie à des résultats similaires, où ils ont montré que le poids corporel moyen chez les rats Fischer 344 mâles, traités par la vitamine E à une dose de 500 mg α -T/kg était semblable à celui du témoin.

En 2004, Garrido-Polonio et *al.*, rapportent que l'administration de 600 mg d' α -T/kg d'aliment à des rats mâles Wistar en croissance, prévient la perte de poids ; protégeant ainsi les organes contre les dommages causés par les radicaux libres, en outre ; l' α -T inhiberait la peroxydation des lipides membranaires en captant les radicaux peroxydes lipidiques et par conséquent, elle est converti en radical α -T \cdot . De plus Nekoubin et *al.*, (2012), ont eux aussi obtenu une augmentation non significative

du poids corporel de angelfish (poissons ange de mer), nourris avec un régime supplémenté en vitamine E à niveaux croissants pendant 60 jours, d'ailleurs le meilleur résultat de la performance de croissance a été obtenu à 600 mg d' α -T / kg d'aliment par rapport au lot témoin mais toujours d'une manière non significative.

Enfin, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de March et *al.*, (1973), qui ont signalé également que le taux de croissance des poussins n'a pas été affecté après administration de 700 mg d' α -T /kg d'aliment.

En ce qui concerne les lots RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀, RSE₁₀₅₀, RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀, nous avons obtenu une diminution non significative du poids corporel par rapport au témoin (**figure 16, B**). Ces résultats peuvent être expliqués par la diminution de la prise alimentaire, et suggèrent que l' α -T à fortes doses contribuerait à la baisse de la croissance même si cette diminution est non significative ; cette baisse pourrait être expliquée par l'accumulation des radicaux libres, ce qui augmente l'attaque radicalaire des lipides et des protéines, induisant par conséquent la diminution du pouvoir du système antioxydant, d'ailleurs Nielsen et *al.*, (1985) ont rapporté que la plupart des acides aminés réagissent avec les produits primaires et secondaires des lipides oxydés, ceci diminue l'utilisation digestive des protéines, des acides aminés et des graisses, ce qui induit une baisse de croissance.

Il est à noter que nos résultats corroborent avec ceux de Yang et Desai (1977), qui ont observé une diminution du poids corporel chez des rats de souche Wistar nourris avec un régime supplémenté en 900 mg d' α -T / Kg d'aliment. Cette diminution peut être le résultat d'une expérimentation beaucoup plus longue (8 mois) que la nôtre (5 semaines).

D'autres recherches réalisées par Wheldon et *al.*, (1983), ont montré que le taux de croissance des rats Charles River n'a pas été modifié suite au traitement avec 1000 mg d' α -T/kg d'aliment, et ceci pendant 104 semaines. De plus Eder et *al.*, (2002) ont constaté eux aussi que la croissance n'a pas été affectée chez des rats mâles Sprague-Dawley en croissance, nourris avec des régimes supplémentés en 1000mg d' α -T/kg d'aliment pendant 8 semaines.

March et *al.*, (1975), ont montré que le taux de croissance a été manifestement réduit chez des poussins, dont le régime alimentaire était supplémenté en 1500 mg d' α -T /Kg d'aliment pendant 50 jours.

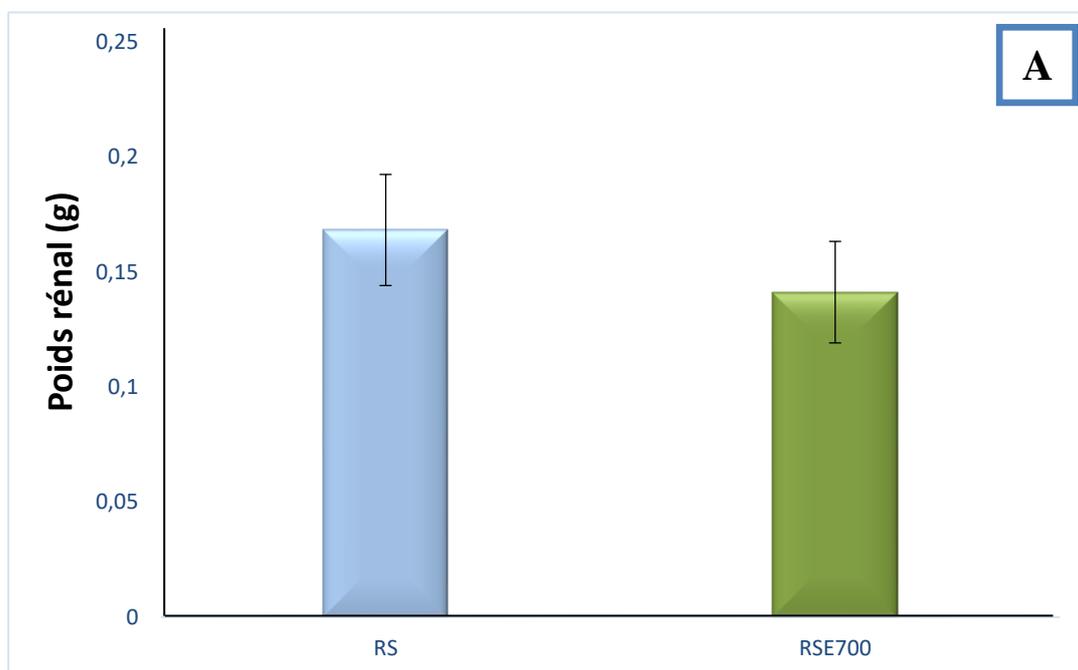
Une non-variation du poids corporel après supplémentation de doses élevées en vitamine E a été également observée par plusieurs auteurs à savoir :

Abdo et *al.*, (1986), qui ont signalé que la croissance des rats nourris avec (2000 mg d' α -T /kg d'aliment) de vitamine E ne diffère pas significativement de celle des témoins, ce qui suggère que la croissance est insensible à des doses élevées de vitamine E. De plus Ortuño et *al.*, (2000), n'ont obtenu aucune différence significative du taux de croissance chez la daurade royale (*Sparus aurata L*), après 45 jours entre les différents lots nourris d'un régime équilibré et supplémenté en doses croissantes en α -T (1200 et 1800 mg d' α -T / kg du régime).

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

b) Variations du poids rénal

La variation du poids du tissu rénal des souris témoins et traitées par différentes doses d' α -T (annexe 06), est représentée dans la figure 17, A et la figure 17, B :



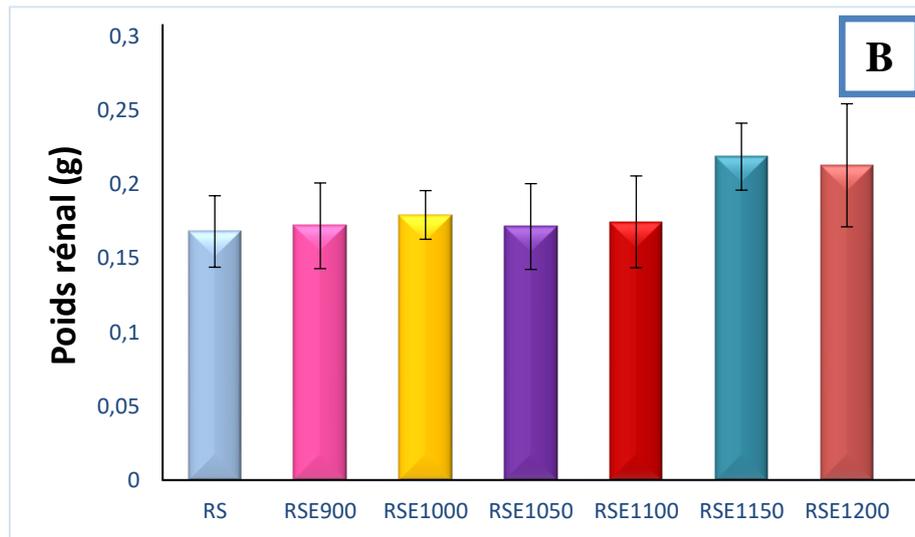


Figure 17 (A et B) : Evaluation du poids rénal chez les souris Albinos de souche NMRI.

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de la variation du poids du rénal, après 5 semaines de traitement avec un régime standard, supplémenté en différentes doses d' α -T (700, 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg/Kg d'aliment), ont montré pour le lot RSE₇₀₀; une diminution non significative par rapport au témoin (**figure 17, A**). On suppose que l'administration de 700 mg d' α -T/kg d'aliment protège le rein vis à vis des dommages causés par les ERO et les produits réactifs de la peroxydation lipidique, car l' α -T exerce une action antioxydante par l'élimination des radicaux dans la membrane des cellules. Selon Combs et McClung (2016), l' α -T bloque l'initiation et interrompt la propagation de la peroxydation lipidique.

Notons que nous n'avons trouvé aucune étude qui parle de l'effet de la vitamine E à une telle dose sur le poids rénal des souris.

La variation du poids du tissu rénal des souris des lots RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀, RSE₁₀₅₀, RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀, a montré une augmentation non significative comparativement au témoin (**figure 17, B**). Nous supposons que ceci est due à l'accumulation des ERO au niveau du rein, d'ailleurs Gerald et *al.*, (2017) rapportent qu'une dose très élevée d' α -T s'est avérée augmenter la sensibilité à la peroxydation.

De nombreuses études viennent corroborer nos résultats, c'est ainsi que Yang et Desai (1977) ont montré que le traitement de rats pendant 8 à 16 mois, avec des doses importantes en vitamine E (1600 mg d' α -T/ kg d'aliment) induisait une augmentation du poids du cœur et de la rate, et ont révélé aussi une hypertrophie cardiaque significative.

En 1983, Wheldon et *al.*, ont remarqué que le poids du foie a significativement augmenté, suite à la supplémentation avec une dose de 1000 mg d' α -T /kg d'aliment chez des rats. Trois ans plus tard Abdo et *al.*, (1986), ont observé une hypertrophie du même organe chez des rats femelles nourris avec un régime supplémenté en 2000 mg d' α -T/ kg d'aliment. Alfin-Slater et *al.*, (1972), expliquent l'hypertrophie rénale par le taux élevé du cholestérol et des modifications des acides gras tissulaires chez des rats ayant reçu de fortes doses d' α -T.

II.2. Effets de la supplémentation en α -tocophérol sur quelques paramètres du stress oxydatif

II.2.1. Effets de différentes doses d' α -tocophérol sur la teneur en protéines, l'activité de la catalase et le taux en malonaldéhyde au niveau du tissu rénal

Plusieurs paramètres peuvent être dosés pour confirmer un stress oxydatif comme, les protéines totales, le MDA, la CAT, SOD, GPX et GR, mais dans la présente étude nous n'avons pu dosez que trois paramètres à savoir les protéines totales, l'activité enzymatique de la CAT et le MDA, et ceci chez les souris albinos de souche NMRI.

Les résultats de ces dosages seront répartis selon les effets obtenus à savoir, un effet antioxydant pour le lot RSE₇₀₀ et un effet pro-oxydant pour les lots supplémentés en 900, 1000, 1050, 1100, 1150,1200 mg d' α -T/kg d'aliment, notons que très peu d'études parlent de l'effet pro-oxydatif de la vitamine E au niveau cellulaire.

a) Effet de la supplémentation de 700 mg d' α -tocophérol/kg d'aliment sur la teneur en protéines, l'activité de la CAT et le taux en malonaldéhyde du tissu rénal

Les résultats obtenus lors de la supplémentation d'un RS en 700 mg d' α -T/ Kg d'aliment (lot RSE₇₀₀), ont montré des augmentations non significatives de la teneur en protéines (**figure 18, A**) et de l'activité enzymatique de la catalase (**figure 18, B**), nos résultats révèlent également une diminution non significative du taux de MDA (**figure 18, C**) (**annexe 07**).

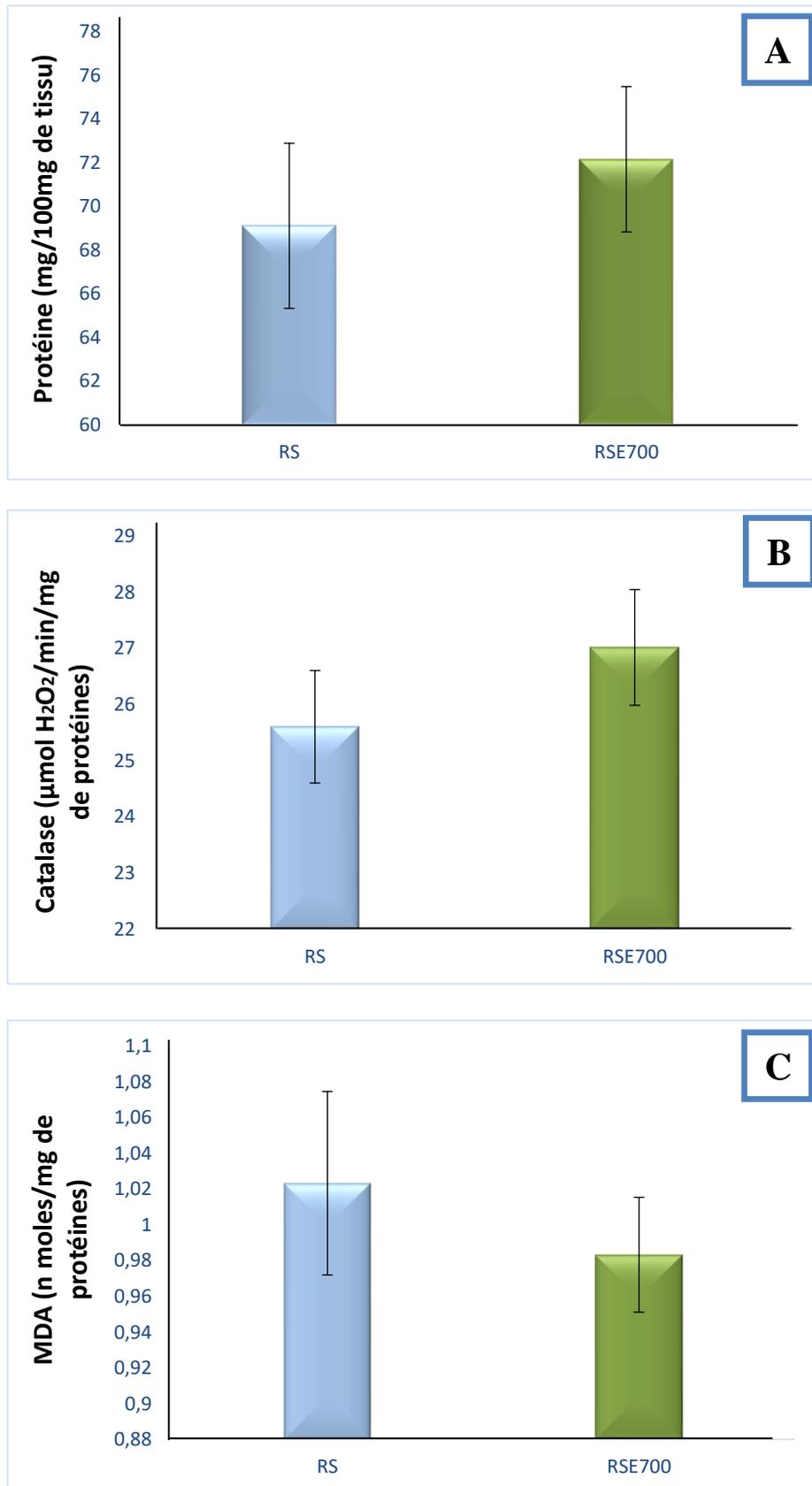


Figure 18 (A, B et C) : Effet de la supplémentation de 700mg d' α -tocophérol/kg d'aliments sur la teneur en protéines, l'activité de la CAT et le taux en MDA du tissu rénal chez les souris Albinos de souche NMRI.

L'augmentation non significative des protéines que nous avons obtenue est due probablement aux effets protecteurs de l' α -T, qui ont permis de diminuer l'oxydation des protéines rénales, d'ailleurs en 1954, Tappel a montré des changements *in vivo* des protéines catalytiques et structurales, dus à une carence en vitamine E, ces changements résultent directement de la réaction des produits d'oxydation des AGPI avec les protéines. Cet effet protecteur a été obtenu en 1977 par Csallany et *al.*, lors d'un stress oxydatif induit par un régime carencé en vitamine E chez des souris, et sur une période de 8 semaines, leurs résultats ont montré une augmentation significative du taux de lipofuscine hépatique chez les témoins par rapport aux lots supplémentés en vitamine E. De même Suga et *al.*, (1984) ont signalé que l'activité de la CAT a diminué chez les rats déficients en vitamine E. Par contre il a été montré par ALPER et *al.*, en 1998, une augmentation de l'activité enzymatique rénale et cardiaque de la CAT après traitement de rats mâles de type Albinos, par administration de 50 mg d' α -T/kg d'aliment par jour pendant 10 jours.

En 1992, Abraham et *al.*, ont montré que la vitamine E prévient l'oxydation des protéines, induite par l'exercice physique chez des rats femelles Sprague-Dawley. Léger (2000), a confirmé aussi que la fonction antioxydante de la vitamine E permet d'éviter l'oxydation des structures, auxquelles elle se trouve associée, et de protéger ainsi non seulement le caractère essentiel des AGPI, mais aussi l'intégrité de la structure des protéines et des nucléotides.

De même une recherche réalisée par Kadiam et *al.*, (2015) sur le foie et le cerveau des poulets, montre que la supplémentation en vitamine E à une certaine dose, pourrait inverser significativement les dommages oxydatifs, en diminuant les dommages des protéines, telles que la carbonylation/nitration, ainsi que la coupure des brins d'ADN.

Des phénomènes d'oxydation des érythrocytes ont été étudiés par Niki et *al.*, (1988) qui ont mis en évidence que lors de l'attaque radicalaire, l' α -T positionnée au niveau de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire agissait majoritairement sur ces molécules réactives. C'est en 2011, Bucioli et *al.*, ont obtenu des résultats indiquant que la supplémentation en vitamine E diminue le stress oxydatif rénal causé par un effort intense, car il réduit le taux de MDA rénal. Quatre ans plus tard Elgaml et *al.*, ont rapporté que l' α -T était capable de protéger les reins contre la toxicité de l'acétate de plomb, et cela a été montré par la réduction du taux de MDA élevé.

En 1984 une étude a été réalisée par Wartanowicz et *al.*, sur 100 sujets humains sains âgés de plus de 60 ans, recevant de la vitamine E à faible dose, sous forme de comprimés pendant un an de traitement, a révélé une diminution du niveau des peroxydes lipidiques.

Enfin l'étude d'Hajiani et *al.*, en 2008 vient corroborer nos résultats, cette étude a porté sur le traitement de rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley par administration intramusculaire bihebdomadaire de 100, 300 et 600 mg/kg de vitamine E sur des périodes de 2, 3 et 6 semaines, ont montré que la phase antioxydante été caractérisée par une diminution du MDA, et une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes (CAT, SOD et GPx).

Au vu des résultats obtenus nous pouvons conclure que la dose de 700 mg d' α -T/kg d'aliment a protégé les protéines, ainsi que l'activité de la CAT en diminuant le taux en MDA. Kishore et *al.*, (2013) rapportent que l' α -T est une excellente source antioxydante, de ce fait elle exerce son pouvoir antiradicalaire directement en tant que piègeur de radicaux libres face aux structures sensibles à l'oxydation.

b) Effets de la supplémentation de doses croissantes en d' α -tocophérol sur la teneur en protéines, l'activité de la CAT et le taux en malonaldéhyde au niveau du tissu rénal

Les lots des souris supplémentés en 900, 1000, 1050, 1100, 1150 et 1200 mg d' α -T/kg d'aliment, présentent des variations de la teneur en protéines, l'activité enzymatique de la CAT et du taux e MDA. Il est vrai que cinq semaines de traitement nous ont permis d'obtenir une diminution significative de la teneur en protéines (**figure 19,A**) et l'activité de la CAT (**figure 19,B**) pour les lots RSE₉₀₀,RSE₁₀₀₀,RSE₁₀₅₀ et RSE₁₁₀₀, et d'une manière très significative pour les lots RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀, accompagnée d'une augmentation significative du taux de MDA pour les lots supplémentés en 900 et 1000 mg d' α -T/kg d'aliment, et d'une façon très significative pour les lots supplémentés en 1050 et 1100 mg d' α -T/kg d'aliment, et d'une manière hautement significative pour les deux derniers lots (**figure 19,C**) (**annexe 07**).

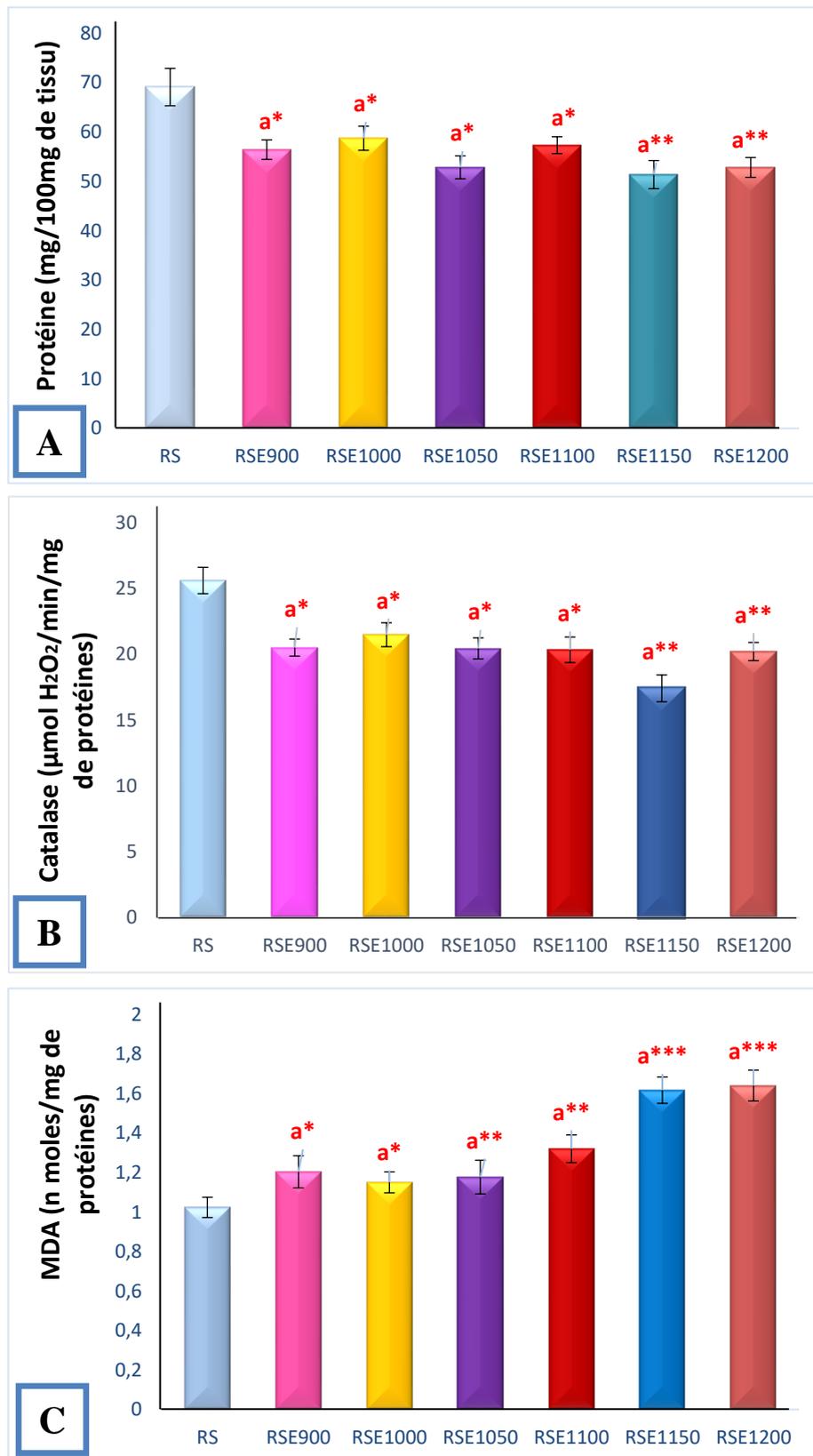


Figure 19 (A, B et C) : Effet de la supplémentation de doses croissantes d' α -tocophérol/kg d'aliments sur la teneur en protéines, l'activité de la CAT et le taux en MDA du tissu rénal chez des souris Albinos de souche NMRI. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ entre témoin et groupe traité ; a : comparaison avec le lot RS).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'effet de l' α -T pro-oxydatif commence à partir de 900 mg d' α -T/kg d'aliment, cet effet est réel dans notre étude et apparent lors du dosage des protéines, l'activité de la CAT et le taux en MDA, du fait que l'accumulation du radical α -T \bullet n'a pu être régénérée suite à l'épuisement des agents réducteurs comme la vitamine C, ces effets ont été déjà décrits par certains auteurs travaillant *in vitro* (Bowry et al., 1992) et d'autres *in vivo* (Kontush et al., 1996).

Notons que nos résultats rejoignent ceux de Tappel et al., qui lors de leur étude menée en 1954, ont observé une augmentation significative du taux en MDA, accompagnée de la diminution significative des enzymes intervenants dans la détoxification des lipoperoxydes (LPO), notamment la GPx et la CAT, ces auteurs ont précisé que les effets nocifs des LPO sur les protéines consistaient en des dénaturations plus ou moins marquées se traduisant par des baisses de solubilité.

Étant donné que les protéines sont très abondantes au niveau cellulaire, ceci les rend une cible importante pour les oxydants biologiques. En 2003, Favier a expliqué la diminution de la teneur en protéines par le fait de leur sensibilité aux attaques radicalaires, surtout celles qui comportent le groupement sulfhydryle (SH) ; en effet, c'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires. Ceci explique que la baisse protéique que nous avons obtenue.

D'après Ponkory et al., (2003), les protéines réagissent avec les radicaux libres lipidiques pour former des molécules protéiques radicalaires, qui peuvent à leur tour interagir pour générer soit des lipoprotéines soit des oligomères protéiques, principalement sous forme de dimère mais également à des degrés de polymérisation très élevés, tout en sachant que lors de la dimérisation ; la solubilité et la biodisponibilité des protéines diminuent. Trois ans auparavant, Stadtman et Levine (2000) ont énoncé que les résultats les plus fréquents de modifications oxydatives des protéines sont : une diminution de l'activité enzymatique, une stabilité plus faible face à la chaleur, une hydrophobicité augmentée et une susceptibilité plus forte à la dégradation protéolytique.

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

Ferreira et *al.*, (2010) rapportent que la baisse de la capacité antioxydante enzymatique a un lien direct avec l'augmentation des processus d'oxydation. D'autres auteurs comme Decastro et *al.*, (2009) expliquent que la diminution de l'activité de la CAT est attribuée à la possibilité d'une production élevée de ERO, et à leur accumulation intracellulaire accrue qui dépasse la capacité de détoxification des enzymes antioxydantes, ce qui entraîne le développement ultérieur de lésions tissulaires.

En 2002 Eder et *al.*, ont étudié l'effet de la supplémentation de l' α -T chez des rats (100, 1000, 10000 d' α -T/ Kg d'aliment) pendant 8 semaines. Ils ont obtenu à une dose de 1000 mg d' α -T/ kg d'aliment, une baisse non significative des activités de la GPx, de la CAT. Ils concluent qu'à fortes doses la vitamine E peut affecter les enzymes antioxydantes, d'ailleurs 10 années auparavant Bowry et *al.*, ont montré que l' α -T à doses importantes agi comme pro-oxydant *in vitro*, aboutissant par conséquent à l'augmentation de la peroxydation lipidique.

Des études plus précises, touchant à l'effet du radical OH^\bullet généré *in vivo* lors de la décomposition de H_2O_2 , ont montré que ce radical pouvait endommager les protéines hépatiques et donc inactiver certaines enzymes comme les enzymes antioxydantes (CAT et GPx), et de ce fait augmenter les niveaux hépatiques des protéines carbonylées (Emel et Saadet, 2007).

Les résultats que nous avons obtenus et qui concernent l'augmentation du taux de MDA rejoignent ceux de Stocker et Keaney (2004), qui ont montré que si le MDA est produit en excès dans un tissu, il peut se combiner aux groupements amines libres des protéines (essentiellement les résidus lysines), conduisant à la formation de produits d'additions susceptibles d'altérer les propriétés biologiques des protéines. La même année, Kiron et *al.*, ayant travaillé sur les érythrocytes, ont obtenu une augmentation significative en LPO, effectivement lors de la supplémentation d'un régime équilibré avec 1000mg d' α -T/Kg d'aliment et administré à des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), ces auteurs ont montré que la forte dose en α -T n'a pas servi en tant qu'antioxydant, mais comme pro-oxydant lors d'un stress oxydatif modéré. C'est ainsi qu'en 1997, Brown et *al.*, rapportent que la vitamine E peut avoir une activité pro-oxydante chez les non-fumeurs, quand les apports sont élevés et prolongés, ces auteurs ont montré que les érythrocytes des non-fumeurs recevant le supplément de 1050 mg d' α -T pendant 20 semaines présentaient une susceptibilité accrue à la peroxydation. De plus, une supplémentation prolongée en α -T chez les non-fumeurs a induit une baisse de la concentration plasmatique d'ascorbate, en association avec une augmentation de l'absorption de vitamine E par les érythrocytes.

Une étude récente réalisée par Kanane et *al.*, (2019), a montré que le traitement des rats pendant 12 semaines avec un régime de base contenant 5% d'huile de tournesol oxydée supplémentée en 1200 mg d' α -T /kg d'aliment, entraîne une augmentation hautement significative des LPO, accompagnée d'une diminution significative des activités enzymatiques antioxydantes (CAT, SOD, GPX, et GR).

Nos résultats corroborent également avec ceux d'Hajjani et *al.*, (2008), qui avaient réalisé une étude dont l'objectif était d'examiner l'effet pro-oxydant de la vitamine E face à son effet antioxydant, et ceci en fonction de la durée de traitement et de la dose en vitamine E. Ces auteurs ont travaillé sur des rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley par administration intramusculaire bihebdomadaire de 100, 300 et 600 mg d' α -T / kg d'aliment sur des périodes de 2, 4 et 6 semaines. Ils ont observé que la vitamine E a un effet antioxydant quand elle est administrée à de faibles doses et sur des périodes courtes, et permet l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. Par contre à fortes doses et sur des périodes assez longues, la teneur en MDA augmente accompagnée d'une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes à savoir la CAT, SOD et la GPx. Ils émettent l'hypothèse que la vitamine E régule les enzymes antioxydantes par un effet chimique direct. Ces auteurs expliquent cette régulation de la même manière que Buettner (1993), qui a énoncé l'existence d'une interaction entre la vitamine E et la vitamine C : « La vitamine E est liposoluble et existe seulement dans les membranes (plasmiques et celles des organites) ; les enzymes antioxydantes, d'autre part, résident dans la phase aqueuse de la cellule ». L'interaction montrée *in vitro* entre la vitamine C et la vitamine E est un phénomène semblable d'interaction entre deux molécules, l'une dans la phase lipidique et l'autre dans la phase aqueuse. Au niveau de la membrane cellulaire, le groupement phénolique OH de l' α -T au niveau de l'interface membrane-eau réagit ainsi avec des molécules hydrosolubles comme l'ascorbate. Donc il est théoriquement possible que la vitamine E exerce un effet dose dépendant sur les enzymes antioxydantes.

Il est vrai que lors d'un stress oxydatif sévère, l' α -T produit une quantité importante en radical α -T \bullet , qui va se combiner avec un autre radical libre formant ainsi un « produit non radicalaire » (PNR), d'où l'interruption de la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique, donc l'acide ascorbique est un co-oxydant mais ne joue pas un rôle très important dans ces conditions, c'est-à-dire lors d'un stress oxydant sévère, il contribue à la diminution de radicaux libres mais à lui seul sa présence n'est pas suffisante, tandis que lors d'un stress oxydatif modéré, la concentration de radicaux libres n'est pas importante au point où l'ensemble des radicaux α -T \bullet produits lors du processus antioxydant puissent se combiner entre eux, c'est pour cela que la présence et la concentration de l'acide ascorbique est importante, car c'est ce co-antioxydant qui va régénérer l' α -T; si la concentration de l'acide ascorbique

est faible, il y a apparition de l'effet pro-oxydant de l' α -T car le radical α -T \bullet va arracher un électron aux acides gras des phospholipides des membranes, et donc propager la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique, dans le cas contraire où la concentration de l'acide ascorbique est adéquate par rapport à la concentration de l' α -T supplémentée, dans ce cas-là, nous aurons un effet antioxydant, car l'ensemble des radicaux α -T \bullet générés lors de l'effet antioxydant de l' α -T, ont pu être régénérés par l'acide ascorbique. Déjà en 1996, Kontush ont précisé qu'*in vivo*, et en présence de fortes concentrations de co-antioxydants et dans des conditions oxydatives modérées, l' α -T devrait normalement se comporter comme un anti-oxydant, mais il peut se développer un effet pro-oxydant quand les co-antioxydants sont épuisés dans les conditions d'oxydation modérées.

Enfin, nous pouvons conclure à l'issue des résultats obtenus que lors de la supplémentation d'un régime alimentaire équilibré avec 900,1000,1050,1100,1150 et 1200 mg d' α -T et sur une période de 5 semaines, nous avons obtenu un effet pro-oxydant de l' α -T démontré par la baisse de l'activité enzymatique de la CAT et de la teneur en protéines et surtout par l'élévation du taux en MDA. Dans notre cas le stress induit par les doses utilisées dans cette étude est un stress modéré. En effet une concentration élevée du radical α -T \bullet a propagé la peroxydation lipidique, ce qui a été traduit par l'augmentation de la teneur en MDA, du fait qu'il n'y avait pas une concentration adéquate en acide ascorbique pour régénérer l' α -T et de même rompre la chaîne de propagation de la peroxydation lipidique.

II.3. Effets de la supplémentation en α -tocophérol à différentes doses sur l'histologie du tissu rénal

Pour confirmer l'ensemble des résultats biochimiques obtenus lors de cette étude, un examen histologique des reins a été réalisé.

L'examen histologique des différents lots traités montre pour les lots RS (**figure 20, a**) et RSE₇₀₀ (**figure 20, b**), une architecture normale de l'ensemble du cortex rénal, des tubules contournés proximaux et distaux avec une lumière clairement visible dans la plupart des tubules corticaux, ainsi que des glomérules uniformes avec membrane bien définie.

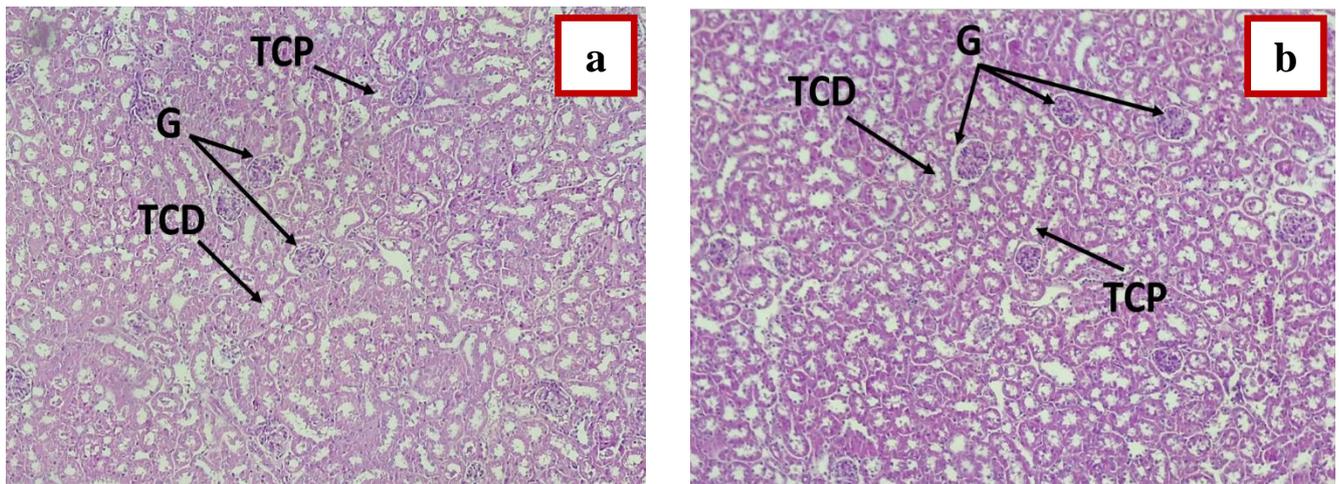


Figure (20, a et b). Micrographie du cortex rénal (10×, H&E) montrant : (a) architecture normale chez le lot “témoin” : RS, et (b) chez les souris supplémentées avec 700 mg d’ α -tocophérol / kg d’aliment : RSE₇₀₀. G : Glomérules, TCP : tube contourné proximal, TCD : tube contourné distal.

En effet le traitement avec 700 mg d’ α -T /kg d’aliment suggère une propriété antioxydante de l’ α -T, d’ailleurs Sridevi *et al.*, (2007) ; Ferry *et al.*, (2012), rapportent que la vitamine E est l’un des antioxydants les plus puissants, dont la fonction principale est de prévenir la peroxydation des phospholipides et des dommages membranaires, via l’activité antioxydante, elle a donc un rôle de stabilisateur des membranes.

Une étude réalisée Kutlubay *et al.*, (2007) rapportent qu’après l’injection d’aluminium suivie par 300mg de vit E pendant 2 semaines chez des rats Wistar mâles albinos adultes, aucune anomalie histologique significative n’a été observée par rapport au groupe témoin, et les cellules des tubules rénaux avaient un aspect normal. L’organisation tubulaire et la basophilie cytoplasmique étaient également semblables à celles du témoin, la lumière étant clairement visible dans la plupart des tubules corticaux. Auparavant, Otani *et al.*, (1999) ont également montré qu’une supplémentation alimentaire en vitamine E supprime la prolifération des cellules mésangiales et la sclérose glomérulaire, et inhibe l’oxydation des lipoprotéines et l’infiltration intra-glomérulaire des macrophages dans des modèles de maladie glomérulaire chez le rat.

De plus une étude menée par Ajitih *et al.*, (2009) a rapporté un effet néphroprotecteur de l’ α -T par une atténuation des modifications structurelles et fonctionnelles rénales. Il a été également rapporté que l’activité antioxydante de la vitamine E a la capacité d’éviter l’apparition de maladies chroniques, particulièrement celles causées par un composant du stress oxydatif, comme les maladies cardiovasculaires, l’athérosclérose et le cancer (Stampfer *et al.*,1993 ; Nwanguma *et al.*,1998).

Notons que nos résultats rejoignent ceux de Araound *et al.*, (2014) qui a réalisé une étude portant sur l'effet de la supplémentation de 200mg d' α -T / Kg d'aliment / jour dans de l'huile de maïs sur l'histologie du tissu rénal, leurs résultats ont montré aucune modification histologique du rein à une telle dose indiquant une disposition normale des cellules sans aucune altérations.

Cependant les coupes histologiques obtenues des lots RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀ (**figure 21, a et b**) (**figure 22, a et b**) respectivement, ont montré des changements morphologiques qui révèlent la présence de multiples congestions importantes vasculaires au niveau du cortex rénal, des glomérules atrophies, des ectasies glomérulaires, des tubes contournés distaux et proximaux altérés légèrement. Nous avons noté la présence de quelques foyers leucocytaires légers uniquement au niveau du lot RSE₁₀₀₀.

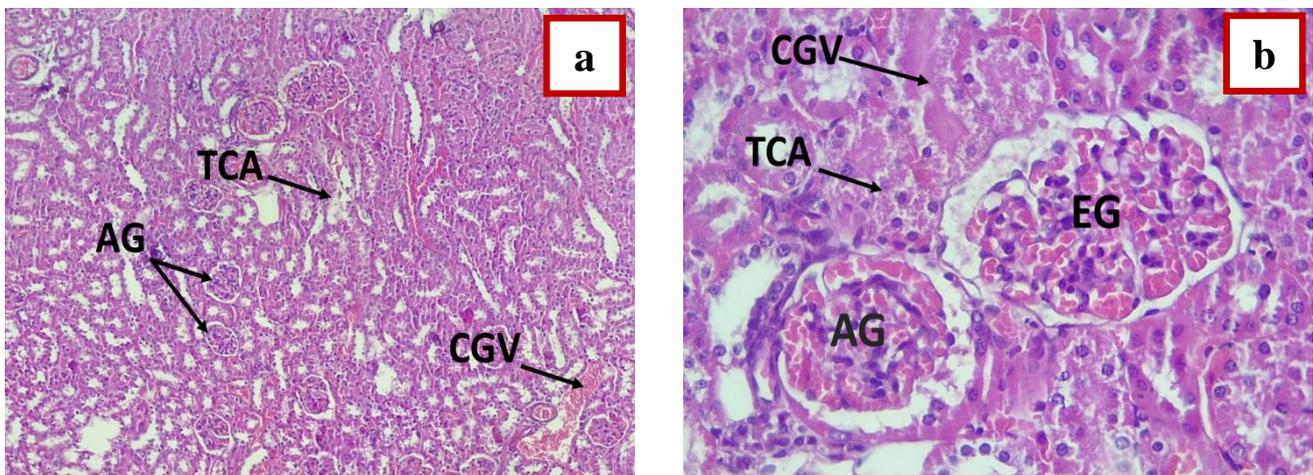


Figure 21 (a et b). Micrographie du cortex rénal du lot RSE₉₀₀, montrant la présence de glomérules atrophies, de multiples congestions vasculaires et des tubes contournés distaux et proximaux altérés légèrement ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, AG : atrophie glomérulaire, TCA : tubes contournés altérés, EG : ectasie glomérulaire.

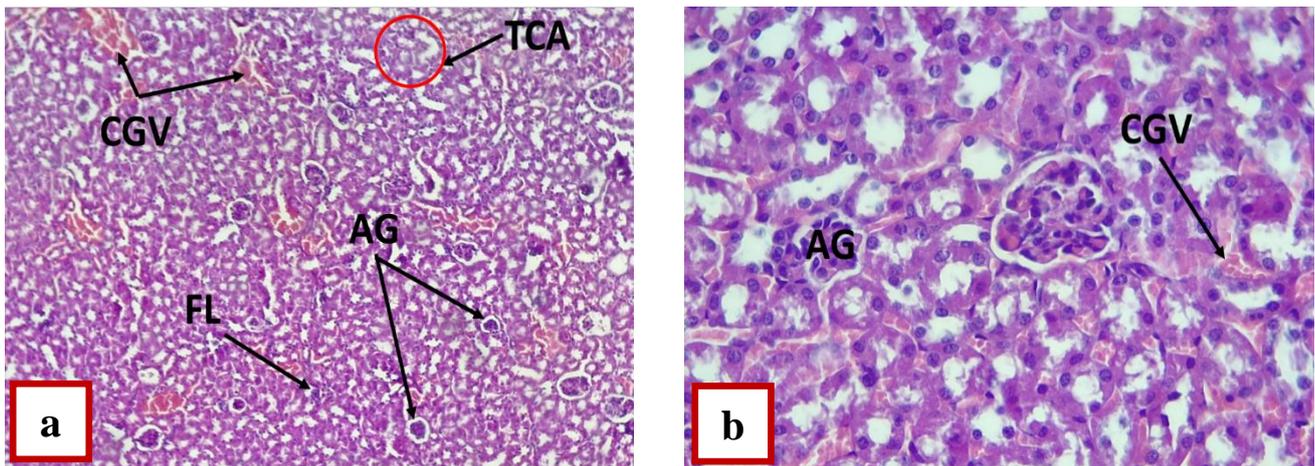


Figure 22 (a et b). Micrographie du cortex rénal du lot RSE₁₀₀₀, montrant la présence de multiples congestions vasculaires plus importantes, des tubes contournés distaux et proximaux altérés légèrement ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, AG : atrophie glomérulaire, FL : foyer leucocytaire, TCA : tubes contournés altérés.

Concernant les coupes histologiques des lots RSE₁₀₅₀ et RSE₁₁₀₀ représentés respectivement figure 23,a et b ; figure 24,a et b , ont montré de multiples congestions vasculaires très importantes, ainsi qu'une réduction de la lumière des tubes corticaux externes et d'ectasies glomérulaires , en revanche, la supplémentation avec 1150 mg d' α -T / Kg d'aliment (**figure 25,a et b**) et 1200 mg d' α -T / Kg d'aliment (**figure 26,a et b**), induit des modifications morphologiques plus sévères, qui révèlent de multiples congestions vasculaires plus importantes , des atrophies et ectasies glomérulaires , altérations des tubules et réduction de la lumière tubulaire des tubes corticaux externe avec perte de la différenciation entre les tubules de la médullaire externe et la corticale, ces modifications morphologiques tubulaires sont focales (plage étendu de la cortical) avec la présence des vacuoles mettant en évidence une destruction des tubules.

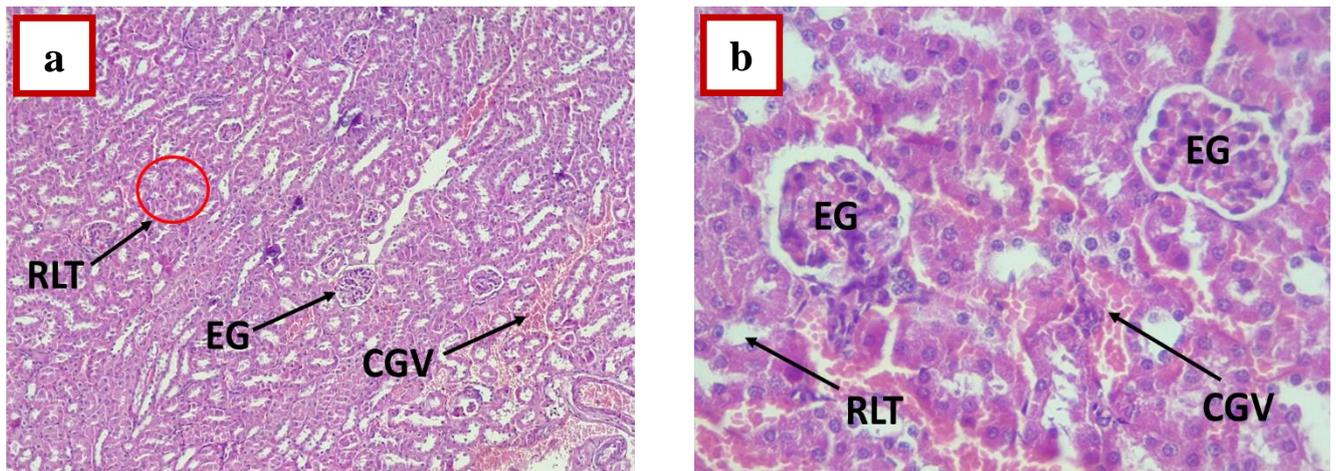


Figure 23 (a et b). Micrographie du cortex rénal du lot RSE₁₀₅₀, montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes, réduction de la lumière des tubes contournés distaux et proximaux a ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, EG : ectasies glomérulaires.

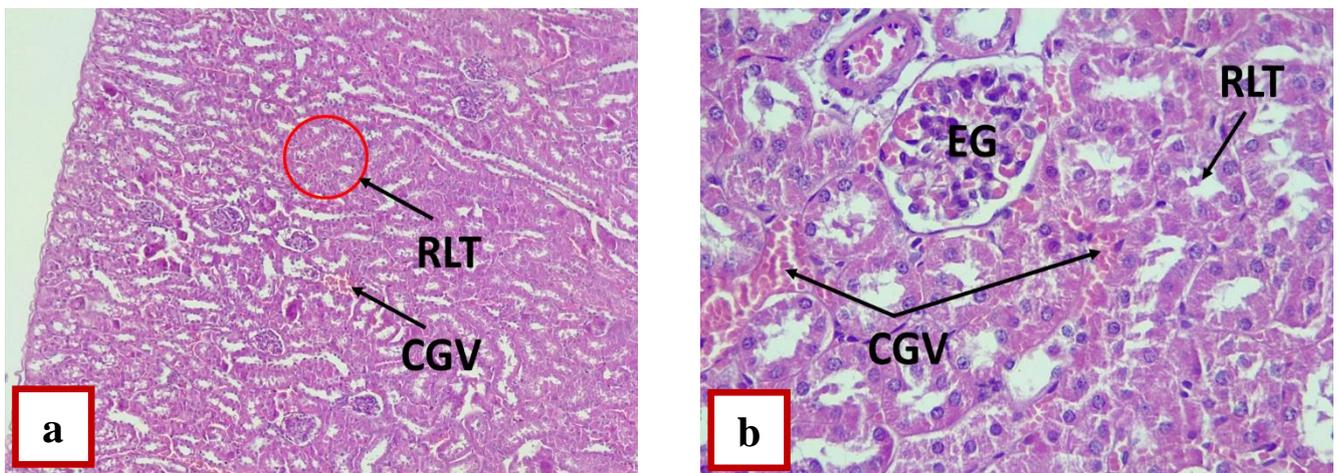


Figure 24 (a et b). Micrographie du cortex rénal du lot RSE₁₁₀₀, montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes, réduction de la lumière des tubes contournés distaux et proximaux a ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, EG : ectasie glomérulaire.

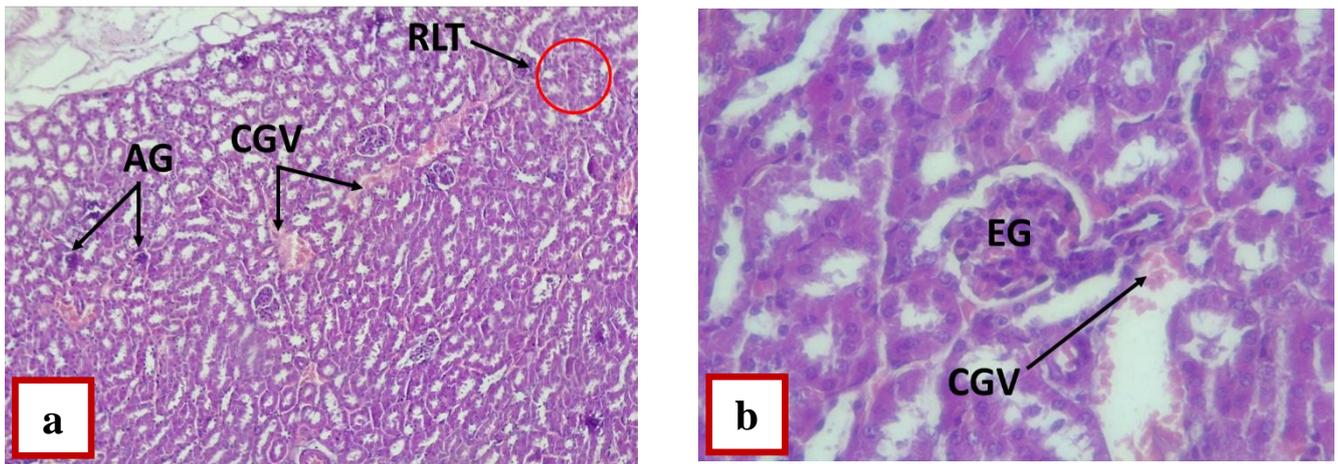


Figure 25 (a et b). Micrographie du cortex rénal du lot RSE₁₁₅₀, montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes avec désorganisation ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). AG : atrophie glomérulaire, CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, EG : ectasie glomérulaire.

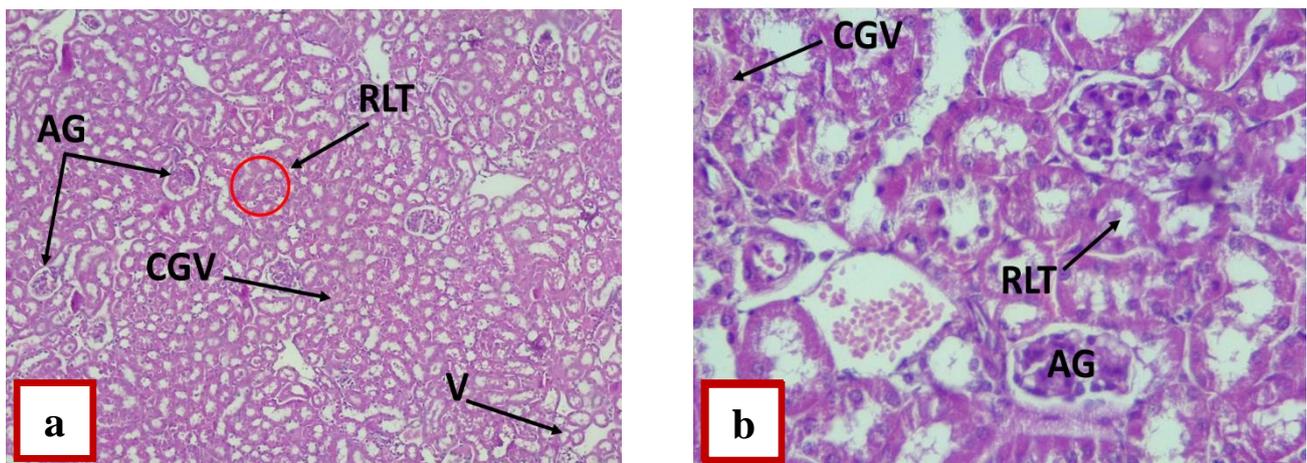


Figure 26 (a et b). Micrographie du cortex rénal du lot RSE₁₂₀₀, montrant la présence de multiples congestions vasculaires très importantes avec désorganisation ; (a) : (10×, H&E), (b) : (40×, H&E). AG : atrophie glomérulaire, CGV : congestion vasculaire, RLT : réduction de la lumière tubulaire, V : vacuoles.

Les fortes doses d' α -T ont causé une désorganisation de la structure du cortex rénal, et donc ont eu un effet pro-oxydatif. En 2012, Ferry et *al.*, expliquent que si la teneur membranaire en vitamine E était faible par rapport aux lipides et à la production des radicaux libres, seule l'existence d'un renouvellement rapide de l' α -T permet son efficacité ; ce qui participe probablement au rôle pro-oxydant.

L'effet pro-oxydatif de la vitamine E a été démontré par un nombre important d'auteurs et dans de nombreuses études, en dosant des paramètres biochimiques intervenant dans le stress oxydatif, mais aucune étude n'a été réalisée à l'échelle histologique, c'est pour cela que nous citerons d'autres études utilisant d'autres molécules induisant un stress oxydatif autres que l' α -T.

Une étude menée par Kanane et *al.*, (2019), sur des rats de souches Wistar alimentés avec un régime contenant 5% d'une huile de tournesol fortement oxydée et sur une période de 8 semaines, ont montré des altérations à l'échelle histologique rénale semblable aux nôtres à savoir, des œdèmes, la congestion des vaisseaux sanguins, le trophée glomérulaire et les infiltrations de cellules inflammatoires, sont observées chez les reins de rats supplémentée en 1200 mg α -T /kg d'aliment.

En 2012, Rahangadale et *al.*, ont obtenu des modifications histologiques rénales à savoir des changements dégénératifs vacuolaires dans l'épithélium tubulaire, une nécrose coagulante et des hémorragies rénales, ont été observés constamment chez des rats Wistar intoxiqués recevant 144 mg d'acrylamide /kg d'aliment pendant 28 jour.

Enfin, une autre étude menée par Dahdouh et *al.*, (2019) ont montré des lésions rénales importantes (une nécrose tubulaire, une dégénérescence glomérulaire), chez des souris femelles de souche Albinos après l'injection de Gentamycine (357mg/kg d'aliment) pendant 10 jours.

Conclusion

Dans la présente étude, notre travail consistait à compléter un régime équilibré, en différentes doses d' α -T (700,900,1000,1050,1100,1150,1200 mg/kg d'aliment) durant 5 semaines puis à étudier les effets de telles doses sur la teneur en protéines et quelques marqueurs du stress oxydatif, à savoir le taux en MDA et l'activité de la CAT, ainsi que sur l'histologie rénale des souris Albinos de souche NMRI et en finalité déterminer la dose pro-oxydante de l' α -T.

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

- **Sur le plan de la croissance corporelle :** nous avons obtenu une augmentation non significative de la croissance des souris supplémentées en 700 mg d' α -T/kg d'aliment, à cette dose l' α -T n'a exercé aucun effet. Par contre nous avons noté une diminution non significative des autres lots à savoir (RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀, RSE₁₀₅₀, RSE₁₁₀₀, RSE₁₁₅₀ et RSE₁₂₀₀), cette baisse peut suggérer que l' α -T a légèrement retardé la croissance corporelle des souris.
- **Sur le plan du poids rénal :** aucune variation significative n'a été obtenue pour l'ensemble des lots supplémentés en α -T.
- **Sur le plan métabolique :** Les résultats obtenus montrent une augmentation non significative de la teneur en protéines et de l'activité enzymatique de la CAT, accompagnée d'une diminution non significative du taux en MDA du lot RSE₇₀₀ par rapport au témoin. Ces résultats indiquent l'effet antioxydant de l' α -T vis-à-vis des ERO au niveau du rein. La supplémentation de 900 à 1200 mg d' α -T/kg d'aliment a montré une variation des paramètres biochimiques dosés, ces résultats ont permis de conclure que pour ces doses, l' α -T n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais a eu plutôt tendance à agir en tant que pro-oxydant : processus connu sous le nom de « tocophérol médiateur de peroxydation ». Toutefois, les interactions métaboliques entre les enzymes antioxydants contre la lipoperoxydation et l' α -T sont encore obscures, certains parlent d'effet direct d'autres d'effet indirect. Néanmoins nos résultats portant sur la supplémentation des régimes en α -T rejoignent plusieurs études faites par de nombreux auteurs, et soutiennent l'effet pro-oxydant de l' α -T lorsqu'elle est supplémentée à des doses élevées.
- **Sur le plan cellulaire :** l'examen histologique des deux lots RS et RSE₇₀₀, ont montré un cortex rénal normal. Cependant, les lots RSE₉₀₀, RSE₁₀₀₀, RSE₁₀₅₀, RSE₁₁₀₀ quant à eux, ont montré la présence de multiples congestions vasculaires importantes, un infiltrat lymphocytaire et des tubes

contournés distaux et proximaux altérés. En revanche, l'histologie des lot RSE₁₁₅₀, RSE₁₂₀₀ révèlent une désorganisation de la structure du cortex rénal.

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

- plusieurs doses croissantes entre 700 et 900 mg d' α -T/kg d'aliment doivent être étudiées, afin de déterminer d'une manière précise la dose à laquelle l'effet antioxydant de l' α -T bascule en un effet pro-oxydant,
- étudier l'effet de telles supplémentsations sur d'autres paramètres antioxydants comme la GPx, la GR, la SOD, le GSH etc.
- des dosages plus précis devraient être fait comme les marqueurs d'oxydation (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, oxygène singulet etc.),
- doser l' α -T au niveau rénal par chromatographie en phase liquide à haute performance,
- réaliser des études similaires sur d'autres organes
- doser les marqueurs tumoraux comme la p53 ou des anti apoptotiques (Bcl-2), pour évaluer les effets cancérigènes de l' α -T vu qu'il induit des altérations au niveau de la molécule d'ADN.

Références

Bibliographiques

1. Abdo, K.M., Rao, G., Montgomery, C.A., Dinowitz, M., Kanagalingam, K., (1986). Thirteen-week toxicity study of d- α -tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. **Fd Chem. Toxic.** **24**: 1043.
2. Abe, T., Tohgi, H., Isobe, C., Murata, T., & Sato, C. (2002). Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. **Journal of neuroscience research**, **70(3)**, 447-450.
3. Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymol.** **105**: 121 – 126.
4. Ajitih, T.A., Abhishek, G., Roshny, D. and Sudheseh, N.P. (2009). Co- supplementation of single and multi doses of vit E and C ameliorates cisplatin induced acute renal failure in mice. **Experiment and Toxicologic Pathology.** **61**, 565–571.
5. Alfin- slater RB, Aftergood L, Kisshineff S (1972). Investigations on hypervitaminosis E in rats. *Abst. Int. Congr. Nutr.* 9: 191.
6. ALPER, G., ÇINAR, M., Cenk, C. A. N., MENTEŞ, G., ERSÖZ, B., & EVİNÇ, A. (1998). The Effects of Vitamin E on Catalase Activies in Various Rat Tissues. **Turkish Journal of Medical Sciences**, **28(2)**, 127-132.
7. Andersson, K. E. (2018). Oxidative stress and its possible relation to lower urinary tract functional pathology. **BJU international**, **121(4)**, 527-533.) **Applied Physiology**, **103(6)**, 1917-1918.
8. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2014.
9. Azzi, A., & Stocker, A. (2000). Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in lipid Research**, **39(3)**, 231-255.
10. Azzi, A., Ricciarelli, R., & Zingg, J. M. (2002). Non-antioxidant molecular functions of α -tocopherol (vitamin E). **FEBS letters**, **519(1-3)**, 8-10.
11. Bahorun, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V., & Aruoma, O. I. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. **Internet Journal of Medical Update**, **1(2)**, 25-41.
12. Baraibar, M.A., Ladouce, R., Friguet, B. (2013). Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. **J. Proteomics.****92**: 63–70).
13. Barbusiński, K. (2009). Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. **Ecological Chemistry and Engineering. S**, **16(3)**, 347-358.
14. Barja, G., Cadena, S., Rojas, C., Perez-Compo, Lopez-Torres, M., Prat, J., Pamplona, R. (1996). Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxidation in guinea pig liver. **Lipids.** **3**: 963-970.

15. Barros, A. I., Nunes, F. M., Gonçalves, B., Bennett, R. N., & Silva, A. P. (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). **Food chemistry**, **128**(1), 165-172.
16. Beltagi, H. S., & Mohamed, H. I. (2013). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, **41**(1), 44-57.
17. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological reviews**, **94**(2), 329-354.
18. Bieri, J.G., L. Corash, Hubbard, V.S. (1983). Medical uses of vitamin E. *N. Engl. J. Med.* **308**: 1063–1071.
19. 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.
20. Brodie, A. E., & Reed, D. J. (1990). Cellular recovery of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and thiol status after exposure to hydroperoxides. **Archives of biochemistry and biophysics**, **276**(1), 212-218.
21. Brown, K. M., Morrice, P. C., & Duthie, G. G. (1997). Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and nonsmokers: dose response to vitamin E supplementation. **The American journal of clinical nutrition**, **65**(2), 496-502.
22. Bucioli, S. A., de Abreu, L. C., Valenti, V. E., Leone, C., & Vannucchi, H. (2011). Effects of vitamin E supplementation on renal non-enzymatic antioxidants in young rats submitted to exhaustive exercise stress. **BMC complementary and alternative medicine**, **11**(1), 133.
23. Buettner, G. R. (1993). L'ordre hiérarchique des radicaux libres et antioxydants : la peroxydation des lipides, l'alpha-tocophérol et l'ascorbate. Vol.300, pp.535–543.
24. Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A. G., Douki, T., Duarte, V., ... & Sauvaigo, S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. **Biological chemistry**, **383**(6), 933-943.
25. Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, **51**, 15-25.
26. Churg, A. (2003). Interactions of exogenous or evoked agents and particles: the role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, **34**(10), 1230-1235.
27. Clarkson P.M. and Thompson H.S (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, (2 suppl), 637–646.

28. Claude, B. (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires. **Editions TEC & DOC**.11-656.
29. Combs Jr, G. F., & McClung, J. P. (2016). The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. **Academic press**.
30. Crow, J. P., & Beckman, J. S. (1995). The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. In **The role of Nitric oxide in physiology and pathophysiology** (pp. 57-73). Springer, Berlin, Heidelberg.
31. Csallany, A. S., Ayaz, K. L., Su, L. C. (1977). Effet diététique de la vitamine E et du vieillissement sur les tissus avec concentration lipofuscine pigmentaire chez les souris, n°107, pp.1792-1799.
32. Csiszár, J., Horváth, E., Bela, K., & Gallé, Á. (2016). Glutathione-related enzyme system: glutathione reductase (GR), glutathione transferases (GSTs) and glutathione peroxidases (GPXs). **In Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses** (pp. 137-158). Springer, Cham.
33. Dahdouh, F., Bendjeffal, H., Nouacer, Z., Moumene, W., Zeminour, M. E. H., Naous, M., & Djebar, H. (2019). Selenium Nanoparticles Attenuate Gentamycin-Induced Nephrotoxicity and Hematotoxicity in Female Swiss Albino Mice. **BioNanoScience**, 1-9.
34. Das, K. C., & Das, C. K. (2002). Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (1O_2) quencher. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(1), 62-66.
35. Davies, M. J. (2012). Oxidative damage to proteins. Encyclopedia of radicals in chemistry, **biology and materials**.
36. De Castro, M. A. C., Cavalcanti Neto, F. F., Lima, L. M. C., Da Silva, F. M., De Oliveira, R. J., & Zanesco, A. (2009). Production of free radicals and catalase activity during acute exercise training **in young men. Biology of Sport**, 26(2), 113.
37. Defraigne, J.O., Pincemail, J., (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. **Rev Med Liège**. 63 : 10-19.
38. Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. **Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales**, Paris. 405p.
39. DellaPenna, D. (2005). A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. **Journal of plant physiology**, 162(7), 729-737.
40. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**, 32(11), 1102-1115.

41. Dolman, C. L., & MacLeod, P. M. (1981). Lipofuscin and its relation to aging. **In Advances in cellular neurobiology (Vol. 2, pp. 205-247)**. Elsevier.
42. Draper, H. H., Squirese, J., Mahmoudi, H., Wu, J., Agarwal, S., Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine. 15:353-363**.
43. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews, 82(1)**, 47-95.
44. Duncan, S. E., & Chang, H. H. (2012). Implications of light energy on food quality and packaging selection. **In Advances in food and nutrition research (Vol. 67, pp. 25-73)**. Academic Press.
45. Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. **Cahiers de Nutrition et de Diététique, 48(5)**, 218-224.
46. Ece, A., Gurkan, F., Celik, F., Boşnak, M., Yel, S., Balik, H., Erel, O. (2007). Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. **Clinical Biochemistry Journal, Vol 40(9-10)**, pp. 634-639.
47. 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**.
48. Elgaml, S. A., Khalil, R., Hashish, E. A., El-Murr, A. (2015). Protective effects of selenium and Alpha-tocopherol against lead-induced hepatic and renal toxicity in oreochromis niloticus. **Journal of Aquaculture Research & Development. 2015**.
49. Emel, Ş., Saadet., G. (2007). Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Comparative Biochemistry and Physiology. 144: 342–347**.
50. Encyclopédie Larousse (2019). Consulté sur <https://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/glomerulosclérose/13332>.
51. Engwa, G. A. (2018). Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. **In Phytochemicals-Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention**. IntechOpen.
52. Favier, A. (2003). Le stress oxydant. **L'actualité chimique**, 108.
53. Ferreira, A. L. A. (2010). Pharmacological dose of α -tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. **Human and Experimental Toxicology. 30, (10): 1540–1548**.
54. Ferry, M., Mischlich, D., Alix, E., Brocker, P., Constans, T., Lesourd, B., ... & Vellas, B. (2012). **Nutrition de la personne âgée**. Elsevier Masson.

55. Flohé, L., Budde, H., & Hofmann, B. (2003). Peroxiredoxins in antioxidant defense and redox regulation. **Biofactors**, **19(1, 2)**, 3-10.
56. Fuchs, J. (1992) Oxidative Injury in Dermatology. New York: **Springer-Verlag**.
57. Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & redox signaling**, **15(6)**, 1583-1606.
58. Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. **L'actualité chimique**, 91.
59. 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.
60. Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, **482(3)**, 419-425.
61. Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cellular signalling**, **19(9)**, 1807-1819.
62. Gerald F. Combs Jr. Ph.D. James P. McClung Ph.D. (2017). Vitamin E. In (dir). the Vitamins: **Fundamental Aspects in Nutrition and Health (fifth Edition, 8, p. 207-242)**. California: Elsevier Inc.
63. Gill, S. S., Tuteja, N., (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Pl Phys & Bioch.** **48**:909-930.
64. Glorian, M., & Limon, I. (2007). L'athérosclérose, une maladie inflammatoire. **Revue Francophone des laboratoires**, 2007(389), 43-48.
65. 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.
66. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. **Revue médicale de Liège**, **62(10)**, 628-38.
67. Halliwell B., J. M. C. Gutteridge (2008). **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fourth Edition. Oxford University Press.
68. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, **141(2)**, 312-322.
69. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007) **Free radicals in biology and medicine**. 4th Edition, Oxford University Press, New York.

70. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA.
71. Hanck A. (1986). Spektrum Vitamine, Vitamin E, **In: Arzneimittel-therapie heute Band 42**, 36-42, Aesopus-Verlag.
72. Heerspink, H. J. L., Rabelink, T. J., & de Zeeuw, D. (2015). Albuminuria: A Target for Treatment in Diabetic and Non-Diabetic Nephropathy. **In Chronic Renal Disease** (pp. 663-673). Academic Press.
73. Hill, H., Hamed, M. (1960). Vitamin E Metabolism. **Arch. Tierernahr. 618(5)**: 10129.
74. Huan, C., Han, S., Jiang, L., An, X., Yu, M., Xu, Y., ... & Yu, Z. (2017). Postharvest hot air and hot water treatments affect the antioxidant system in peach fruit during refrigerated storage. **Postharvest Biology and Technology, 126**, 1-14.
75. Jadot, G., & Bouyard, P. (1981). Le rat de laboratoire: Réactif biologique. **Masson**.
76. Jenkins, M. Y. & Mitchell, G. V. (1975) Influence of excess vitamin E on vitamin A toxicity in rats. **J. Nutr. J05**, 1600-1606.
77. Kadiam, C., Venkata, S., Lokanatha, V., Wudayagiri, R., Chiteti, R., Chinnasamy, T., Rajagopal, S. (2015). Newcastle disease virus (NDV) induces protein oxidation and nitration in brain and liver of chicken: Ameliorative effect of vitamin E. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 64**: 97–106.
78. Kanane, A., Rouaki, F., Errahmani, M. B., Laraba, A., Mesbah, H., & Ammouche, A. (2019). Pro-oxidant effects of a high α -tocopherol dose on kidney antioxidant biomarkers and histopathological aspects. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**.
79. Kao, M. P. C., Ang, D. S. C., Pall, A. A., & Struthers, A. D. (2010). Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of human hypertension, 24(1)**, 1.
80. 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.
81. KISHORE D.V., MOOSAVI F., VARMA R.K.,2013- Effect of ethanolic extract of *Portulaca oleracea linn.* on ethylene glycol and ammonium chloride induced urolithiasis. **Int J Pharm Pharm Sci. Vol. 5(2)**: 134-140.
82. Klaunig, J. E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology, 7**, 116-121.

83. Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic pathology**, **30(6)**, 620-650.
84. Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlsch, A. and Beisiegel, U. (1996) Antioxidant and prooxidant activity of α -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. **J. Lipid Res.** **37**: 1436 – 1448.
85. Krych-Madej, J., & Gebicka, L. (2017). Interactions of nitrite with catalase: Enzyme activity and reaction kinetics studies. **Journal of inorganic biochemistry**, **171**, 10-17.
86. Kumar, S., & Pandey, A. K. (2015). Free radicals: health implications and their mitigation by herbals. **British Journal of Medicine and Medical Research**, **7(6)**, 438-457.
87. Kutlubay Y.R., Oguz E.O., Guven C., Can B., Sinik Z. and Tunkay O.L. (2007). Histological and ultrastructural evidence for protective effects on aluminium-induced kidney damage by intraperitoneal administration of alpha-tocopherol. **International Journal of Toxicology** **26**: 95-101.
88. Lecarpentier, Y. (2007). Physiological role of free radicals in skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, **103(6)**, 1917-1918.
89. 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.
90. Lenoir, L. (2011). Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat (Doctoral dissertation, **Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I**).
91. Leverve, X. (2009). Stress oxydant et antioxydants. **Cahiers de nutrition et de diététique**, **44(5)**, 219-224.
92. Levine R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. Free radic. **Biol. Med.** **32**: 790-796.
93. Littarru, G. P., & Tiano, L. (2007). Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q 10: recent developments. **Molecular biotechnology**, **37(1)**, 31-37.
94. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: **Impact on human health. Pharmacognosy reviews**, **4(8)**, 118.
95. Lowry, O. M., Rosenbrough, R. P., Williams, A. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **226**: 497-509.

96. Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, **14**(4), 840-860.
97. March, B.E., Wong, E., Seier, L., Sim, J., Biely, J. (1973). Hypervitaminosis E in the chick. **J. Nutr.** **103**: 371-377.
98. Mardones, P., & Rigotti, A. (2004). Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in α -tocopherol metabolism and potential implications for disease. **The Journal of nutritional biochemistry**, **15**(5), 252-260.
99. Martínez, J., & Moreno, J. J. (1996). Influence of superoxide radical and hydrogen peroxide on arachidonic acid mobilization. **Archives of biochemistry and biophysics**, **336**(2), 191-198.
100. Martoja, R., Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux Techniques de l'Histologie animale. Paris: **Masson**. 345.
101. Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. **Journal of dermatological science**, **58**(2), 85-90.
102. Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., & Thérond, P. (2008, November). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. **In Annales de Biologie Clinique** (Vol. 66, No. 6, pp. 605-620).
103. Murthy, K. N. C. (2001). Evaluation of antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) and grapes (*Vitis vinifera*). a thesis, **Rajeev Gandhi Univ.** of Health Science, (Banglore, India, 2001).
104. Nekoubin, H., Hosseynzadeh, M., Imanpour, M.R., Asgharimoghadam, A., Raki, M., Montajami, S. (2012). Effect of vitamin E (α -tocopheryl) on growth reproductive performance and survival rate of angel fish (*Pterophyllum scalare*). **World J. Zool.** **7**:285-288.
105. Nielsen, H. K., Finot, P. A., & Hurrell, R. F. (1985). Reactions of proteins with oxidizing lipids: 2. Influence on protein quality and on the bioavailability of lysine, methionine, cyst (e) ine and tryptophan as measured in rat assays. **British journal of nutrition**, **53**(1), 75-86.
106. Niki, E., Komuro, E., Takahashi, M., Urano, S., Ito, E., Terao, K. (1988). Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. **J Biol Chem.** **263**(36): 19809-14.
107. Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Rsc Advances**, **5**(35), 27986-28006.
108. Nwanguma, B. C., Achebe, A.C., Ezeanyika, L. U. and Eze, L. C. (1998). La toxicité des graisses oxydées II : taux tissulaires de peroxydes de lipides chez des rats nourris avec un régime à l'huile de maïs oxydé thermiquement. **Food Chem. Toxicol.**Vol. **37**, pp. 413– 416.

109. Omura, T. (2010). Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. **Journal of biochemistry**, **147(3)**, 297-306.
110. Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J. (2000). High dietary intake of α -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**. **10**: 293–307.
111. Otani, H., Mune, M., Yukawa, S., Smith, D., Meydani, M. and Blumberg, J. (1999). Vit E treatment of experimental glomerular disease in rat. **Kidney Int.** **56**, suppl, S-66-S-69.
112. Ozcan, A., & Ogun, M. (2015). Biochemistry of reactive oxygen and nitrogen species. **In Basic principles and clinical significance of oxidative stress**. IntechOpen.
113. Papas, A. M. (2001). Vitamin E: a new perspective. **AGRO FOOD INDUSTRY HI TECH**, **12(5)**, 23-27.
114. Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. **J. Mol. Biol.**, **304**, 55–68.
115. Pehlivan, F. E. (2017). Vitamin C: An Antioxidant Agent. **In Vitamin C**. IntechOpen.
116. Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**, **4(2)**, 89.
117. Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, **30(1)**, 11-26.
118. Philippaert, K., & Vennekens, R. (2015). Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels in Diabetes. **In TRP Channels as Therapeutic Targets** (pp. 343-363). Academic Press.
119. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.
120. Ponkory. (2003). Lipides et corps gras alimentaires. Paris : **Tec et Doc**, pp. 61.
121. Powers s., jackson m. (2008). exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **physiol. rev.** **88**: 1243-1276.
122. Prashanthi, M., Sundaram, R., Jeyaseelan, A., & Kaliannan, T. (Eds.). (2017). **Bioremediation and sustainable technologies for cleaner environment**. Springer.
123. Pryor, W. A., Jin, X., & Squadrito, G. L. (1994). One-and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **91(23)**, 11173-11177.

124. Rahangadale, S., Kurkure, N., Prajapati, B., Hedao, V., & Bhandarkar, A. G. (2012). Neuroprotective effect of vitamin e supplementation in wistar rat treated with acrylamide. **Toxicology international**, **19(1)**, 1.
125. Raman, Arjun V., and Marla J. Berry. (2011). Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. **Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling**, 195-208.
126. Rao, P. S. S., Ande, A., Sinha, N., Kumar, A., & Kumar, S. (2016). Effects of cigarette smoke condensate on oxidative stress, apoptotic cell death, and HIV replication in human monocytic cells. **PloS one**, **11(5)**, e0155791.
127. Rietjens, I. M., Boersma, M. G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., ... & Koeman, J. H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental toxicology and pharmacology**, **11(3-4)**, 321-333.
128. Robert B. Rucker, John W. Suttie, Donald B. McCormick, Lawrence J. Machlin (2001). Handbook of Vitamins. Editions Marcel Dekker, Inc. 4-167.
129. Roubal, W. T., & Tappel, A. L. (1966). Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids. **Archives of biochemistry and biophysics**, **113(1)**, 5-8.
130. Salem, I. A., El-Maazawi, M., & Zaki, A. B. (2000). Kinetics and mechanisms of decomposition reaction of hydrogen peroxide in presence of metal complexes. **International Journal of Chemical Kinetics**, **32(11)**, 643-666.
131. Salisbury, D., & Bronas, U. (2015). Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. **Nursing research**, **64(1)**, 53-66.
132. Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids**, **27(6-7)**, 608-619.
133. Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular nutrition & food research**, **49(1)**, 7-30.
134. Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, **3(1)**, 91-100.
135. Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, **4**, 180-183.
136. Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, **7**, 122-126.
137. Small, D. M., Coombes, J. S., Bennett, N., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2012). Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, **17(4)**, 311-321.

138. Sridevi, N., Venkataraman, P., Senthilkumar, K., Krishnamoorthy, G., Arunakaran, J. (2007). Le stress oxydatif lié ATPases membranaires modulant dans des régions cérébrales de PCB (Aroclor 1254) rats exposés : rôle protecteur de α -tocophérol. **Biomed Biomed. Pharmacother.** Vol. **61**, pp. 435 – 440.
139. Stadtman, E.R., Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. **Ann NY Acad Sci** **899**: 191-208.
140. Stampfer, M., Hennekens, C., Manson, J., Colditz, G., Rosner, B., Willett, W. (1993). La consommation de vitamine E et le risque de maladie coronarienne chez les femmes. **N. Engl. J. Med.** Vol. **328**, pp. 1444 – 1449.
141. Steven D. Waldman MD, JD. (2019).in **Atlas of Common Pain Syndromes (Fourth Edition)**.
142. Suárez-Jiménez, G., López-Saiz, C., Ramírez-Guerra, H., Ezquerro-Brauer, J., Ruiz-Cruz, S., & Torres-Arreola, W. (2016). Role of endogenous and exogenous tocopherols in the lipid stability of marine oil systems: A review. **International journal of molecular sciences**, **17(12)**, 1968.
143. Tappel, A.L. (1954). Studies of the mechanism of vitamin E action. II. Inhibition of unsaturated fatty acid oxidation catalyzed by hematin compounds. **Arch Biochem Biophys.** **50(2)**: 473-85.
144. Tetsuya, S., Takafumi, W., Yoshio, M., & Shuichi, H. (1984). Effects of long-term vitamin E deficiency and restoration on rat hepatic peroxisomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, **794(2)**, 218-224.
145. Tezel, G., Yang, X., Cai, J. (2005). Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. **Investigative ophthalmology & visual science.** **46(9)** : 3177-3187.
146. Therond, P. (2006, November). Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. In **Annales pharmaceutiques françaises (Vol. 64, No. 6, pp. 383-389)**. Elsevier Masson.
147. Théron, P. and D. Bonnefont-Rousselot (2005). "Systèmes antioxydants endogènes." **Radicaux libres et stress oxydant**. Paris, Lavoisier: p 87-111.
148. Torun, H. (2019). Time-course analysis of salicylic acid effects on ROS regulation and antioxidant defense in roots of hulled and hullless barley under combined stress of drought, heat and salinity. **Physiologia plantarum**, **165(2)**, 169-182.
149. Tuttle, K. R., Bakris, G. L., Bilous, R. W., Chiang, J. L., De Boer, I. H., Goldstein-Fuchs, J., ... & Neumiller, J. J. (2014). Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference. **American journal of kidney diseases**, **64(4)**, 510-533.

150. Valko M., Omova K.J. (2011). Free Radicals, Signal Transduction, and Human Disease. **Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling**, pp 17-32.
151. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, **39(1)**, 44-84.
152. Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, **12**, 1161–1208.
153. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, **160(1)**, 1-40.
154. Villasante A., Araneda O.F., Behn C., Galleguillos M., Adarmes H. (2010). Antioxidant capacity and oxidative damage determination in synovial fluid of chronically damaged equine metacarpophalangeal joint. **Veterinary Research Communications** **34**, (2), 133–141.
155. Wartanowicz, M., Panczenko-Kresoxka, B., Ziemiński, S., Kowalska, M., Okolska, G. (1984). The effect of tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people. **Ann. Nutr. Metab.** **28**: 186.
156. Wheldon, GH., Bhatt, A., Keller, P., Hummler, H. (1983). D,1-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E): A long term toxicity and carcinogenicity study in rats. **Int J Vitam. Nutr. Res.** **53**: 287–296.
157. Wild, C. P. (2012). The exposome: from concept to utility. **International journal of epidemiology**, **41(1)**, 24-32.
158. Winterbourn, C. C. (1985). Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of oxidant to hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, **840(2)**, 204-210.
159. Winterbourn, C. C., & Kettle, A. J. (2000). Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, **29(5)**, 403-409.
160. Yang, N. J., & Desai, I. D. (1977). Effect of high levels of dietary vitamin E on hematological indices and biochemical parameters in rats. **The Journal of nutrition**, **107(8)**, 1410-1417.
161. Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What is oxidative stress. **Japan medical association journal**, **45(7)**, 271-276.
162. Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. **Journal of clinical pathology**, **54(3)**, 176-186.

- 163.** Yousefian, I., Zare-Shahneh, A., & Zhandi, M. (2014). The effect of coenzyme q10 and α -tocopherol in skim milk-based extender for preservation of caspian stallion semen in cool condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, **34(8)**, 949-954.
- 164.** Zuo, L. (2002) Molecular Mechanisms of Stress-Induced Reactive Oxygen Species Formation in Skeletal Muscle. Thèse de Phd en biophysique. **Ohio State University**.

Annexes

Annexe 01

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

Ingrédients	RS	RSE ₇₀₀	RSE ₉₀₀	RSE ₁₀₀₀	RSE ₁₀₅₀	RSE ₁₁₀₀	RSE ₁₁₅₀	RSE ₁₂₀₀
Mais	52.80	52.80	52.80	52.80	52.80	52.80	52.80	52.80
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
α -T	/	0,07	0,09	0,10	0,105	0,11	0,115	0,12

- **Mélange minéral contenu dans 100 g d'aliment** : KH_2PO_4 20,0 mg ; CaCO_3 34,6 mg ; CaHPO_4 26,55 mg ; 13,70 mg de NaCl ; 3,42 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,042 mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,27 mg ; $7\text{H}_2\text{O}$ 1,02 mg FeSO_4 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,15 mg ; CaCO_3 0,0008 mg ; KI 0,0016 mg.

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

Annexe 02 :**I.1 Verrerie et autres :**

- Pissette.
- Compresses.
- Lames de bistouri.
- Ciseaux.
- Pincés.
- Flacons.
- Micropipette (de 10 μ l à 1000 μ l).
- Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml).
- Tubes à essai.
- Tubes en verre.
- Portoirs.
- Béchers de 50ml et 250ml,
- Erlenmeyer de 250ml.
- Cuve de spectrométrie.
- Boites de Pétri.
- Lames et lamelles.
- Embouts de contenance de 1000 μ l.
- Embouts de contenance de 200 μ l.
- Spatule.
- Entonnoir.
- Papier absorbant
- Cassettes d'inclusion.

I.2. Réactifs chimiques

- Vitamine E.
- Ether Ethylique.
- Triton X-100.
- Acide trichloracétique.
- Alcool.
- Hydroxyde de sodium NaOH.

-
- Tartrate de $\text{Na}^+ \text{K}^+$.
 - Sulfate de cuivre CuSO_4 .
 - Sulfate de carbonate de sodium Na_2CO_3 .
 - Folin Ciocalteu.
 - Phosphate de potassium monobasique KH_2PO_4 .
 - Butyl-Hydroxtoluène (BHT).
 - Phosphate disodique $\text{Na}_2 \text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$.
 - Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .
 - Eau distillée.

I.3. Appareillages :

Appareillages nécessaires pour le dosage des paramètres du stress oxydatif :

- Broyeur Homogénéiseur (Potter de Thomas).
- Balance de précision (KERN).
- Centrifugeuse (Hettich EBA 20).
- Spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1601)
- Bain-marie (SLEE MAINZ).
- Agitateur (VELP SCIENTIFICA).
- Vortex (VWR VV3).
- pH mètre.
- Réfrigérateur (Samsung).
- Automate de traitement des tissus (Leica).
- Automate de coloration des lames (SLEE MAINZ).
- Module de refroidissement de paraffine (SLEE MAINZ).
- Microtome (Leica).
- Plaque chauffante (SLEE MAINZ).
- Etuve (BINDER).
- Distillateur.
- Microscope optique (OPTIKA).
- Appareil photo (Leica).
- Application EZ (LASEZ).

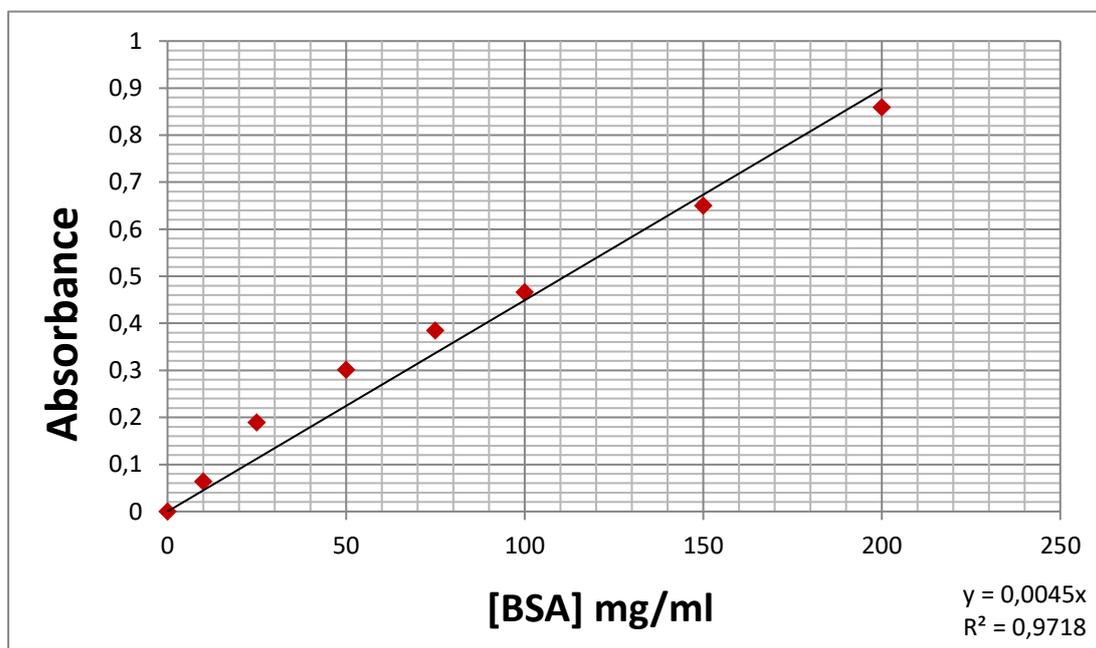
Annexe 03 : Préparation des solutions de dosage des protéines.

Solution A : préparée par mélange des trois solutions suivantes :

- 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 CuSO_4 à 1%,
- 50 ml de la solution de sulfate de carbonate de sodium Na_2CO_3 dans du NaOH (0.1M).

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

Annexe 04 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY (1951), l'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence.



Annexe 05 : Préparation des solutions de dosage de la Catalase.

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

- dissoudre 6,81 g de KH_2PO_4 dans de l'eau distillée est compléter à 1000ml **(a)**,
- dissoudre 8,82 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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_2O_2 à 30% avec la solution I jusqu'à 100ml.

Annexe 06 :

Tableau II : La variation du poids corporel et le poids rénal chez les souris Albinos de souche NMRI. (témoins : RS, supplémentés en 700 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₇₀₀, 900 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₉₀₀, 1000 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₀₀₀, 1050 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₀₅₀, 1100 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₁₀₀, 1150 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₁₅₀ et en 1200 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₂₀₀).

Lots expérimentaux								
	RS	RSE₇₀₀	RSE₉₀₀	RSE₁₀₀₀	RSE₁₀₅₀	RSE₁₁₀₀	RSE₁₁₅₀	RSE₁₂₀₀
Poids corporel (g)	23,33±1,155	25±2,646	20±1,732	19±2,646	20,66±2,887	22,66±0,577	21±1,000	21,33±2,309
Poids rénal (g)	0,168±0,024	0,141±0,022	0,172±0,029	0,179±0,016	0,171±0,029	0,174±0,031	0,218±0,023	0,212±0,042

Annexe 07 :

Tableau III : La variation de la teneur en protéines, l'activité de la catalase (CAT) et le taux en malondialdehyde (MDA) chez les souris Albinos de souche NMRI. (témoins : RS, supplémentés en 700 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₇₀₀, 900 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₉₀₀, 1000 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₀₀₀, 1050 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₀₅₀, 1100 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₁₀₀, 1150 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₁₅₀ et en 1200 mg d' α -T. kg-1 d'aliment : RSE₁₂₀₀).

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 entre témoin et groupe traité ; **a**: comparaison avec le lot RS.

Lots expérimentaux								
	RS	RSE ₇₀₀	RSE ₉₀₀	RSE ₁₀₀₀	RSE ₁₀₅₀	RSE ₁₁₀₀	RSE ₁₁₅₀	RSE ₁₂₀₀
Protéines [mg/ 100 g de tissu]	69,11±3,779	72,15±3,327	56,44±1,976 <i>a*</i>	58,75±2,437 <i>a*</i>	52,86±2,320 <i>a*</i>	57,35±1,703 <i>a*</i>	51,39±2,850 <i>a**</i>	52,83±2,009 <i>a**</i>
Catalase [µmol H ₂ O ₂ /min/mg Protéines]	25,60±1,001	27,01±1,030	20,51±0,649 <i>a*</i>	21,48±0,907 <i>a*</i>	20,44±0,800 <i>a*</i>	20,34±0,970 <i>a*</i>	17,41±1,017 <i>a**</i>	20,21±0,690 <i>a**</i>
MDA [n moles/ mg de protéines]	1,02±0,051	0,98±0,032	1,20±0,081 <i>a*</i>	1,15±0,052 <i>a*</i>	1,17±0,085 <i>a**</i>	1,32±0,070 <i>a**</i>	1,61±0,066 <i>a***</i>	1,64±0,078 <i>a***</i>