

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

UNIVERSITE DE SAAD DAHLEB BLIDA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

## Mémoire de fin d'étude



En vue de l'obtention du diplôme de  
Master : EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE  
Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES  
Option : GENIE BIOLOGIQUE

Thème :

*Effets de la supplémentation à différentes doses d' $\alpha$ -tocophérol sur quelques paramètres biochimiques du stress oxydatif et sur l'histologie du tissu hépatique chez le rat en croissance.*

Présentée par :

- DEBAHI Soumia
- SNOUCI Halima

Soutenu le : 18/09/2016

Devant le jury :

- |                                 |            |       |               |
|---------------------------------|------------|-------|---------------|
| - M <sup>me</sup> SAIDI F.      | Professeur | USDB1 | Présidente    |
| - M <sup>me</sup> KEBBAS S.     | MAA        | USDB1 | Examinatrice  |
| - M <sup>me</sup> ROUAKI F.     | MCB        | USDB1 | Promotrice    |
| - M <sup>me</sup> BENSOLTANA D. | MCB        | USTHB | Co-promotrice |

Promotion : 2015 - 2016

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord nous remercions **Dieu** qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Ce travail est le résultat de nombreuses collaborations, il nous est très agréable d'exprimer nos vifs remerciements à tous ceux et celles qui nous ont aidés à le concrétiser :

Nous tenons à remercier chaleureusement notre encadreur « Madame **ROUAKI.F** », maître de conférences classe B à l'institut de biologie de l'université de Blida, pour nous avoir dirigée et guidée tout le long de ce travail. Ses conseils et ses remarques constructifs étaient très bénéfiques pour notre travail. Son soutien permanent ainsi que sa disponibilité pour l'achèvement de ce travail nous ont été très favorables. Nous lui témoignons notre gratitude pour sa patience et surtout sa gentillesse.

Notre Co-promotrice « Madame **BENSOLTANA.D** », maître de conférences à l'université des sciences et de la technologie de Houari Boumedienne pour sa patience et son soutien durant toute notre expérimentation.

Madame **SAIDI.F** : Professeur à l'université de Blida d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury.

Madame **KEBBAS.S** : Maître assistante classe A à l'université de Blida pour avoir bien voulu examiner ce travail et être membre de jury.

Monsieur **ABDELALI.M** : Professeur en histologie et chef de service de l'anapathie à l'hôpital Professeur Nefissa Hamoud (ex parnet) à Alger.

Madame **BENKHELIF.S** : Attachée de laboratoire de neurosciences à l'université des sciences et de la technologie de Houari Boumedienne.

Mademoiselle **Agoun. H** : Doctorante à l'université des sciences et de la technologie de Houari Boumedienne.

Enfin, nous remercions tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

*Halima et Soumia*



*Dédicaces*

*C'est avec plein d'amour et de fierté que je dédie ce travail,  
fruit de longues années d'études*

*À mes très chers parents «Oumí RABEA» et  
«Abí MOHAMED», tous les mots du monde ne saurait  
exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde  
gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les  
sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon  
instruction et mon bien-être.*

*À mes frères Surtout SALAH-EDDINE et ABD-ESSAMED*

*À mes princesses ZINEB ET SARA*

*À mes oncles : AHMED, MOHAMED , LAKHDER, KAMEL*

*À mes chères cousines : OUMAIMA, IKRAM et HADJER*

*Au petit IMAD et sa maman « OUAMARA SOUMIA » qui  
m'a aidé dès le début de ce travail.*

*«Je t'aime très fort SOUSOU».*

*À mes amis : «ZINEB , HADJIRA , SANAA, SALIHA,  
INSAF , ROMAISSA ,MANEL,SOUMIA ,SONIA, SIDALI»*

*Enfin à mon binôme « HALIMA » qui a souffert avec  
moi pour réaliser ce travail.*

*DEBAHIS*





## *DEDICACES*

*En ce jour solennel , qui vient couronner mes efforts. Je profite de l'occasion pour exprimer toute ma gratitude en vers ma famille, Pour les deux êtres, qui m'ont vu grandir, qui m'ont transmis tout leur savoir et qui étaient pour moi un cœur veillant pendant toute ma vie, les deux êtres que je ne pourrais jamais assez remercier « Mon Père et Ma Mère ».*

*A mon cher frère ACHRAF et ma chère sœur IBTISSEM. A toutes mes tantes et mes oncles et à toute ma grande famille. A mon binôme SOUMIA et sa patiente avec moi durant tout cette période, sans oublier ma chère copine NARIMENE que j'aime au fond de mon cœur et à tous mes amis sans exception.*

*Une spéciale dédicace pour ma chère présidente M<sup>me</sup> SAIDI. F et surtout pour Ma très chère Promotrice M<sup>me</sup> ROUAKI.F et co-promotrice M<sup>me</sup> BENSOLTANA .D*

*Enfin Pour celles et ceux qui ont partagé mes joies et mes peines, qui m'ont tant aidé et soutenu.*

*SNOUCI. H*

## Résumé

Cette étude a pour objectif d'étudier l'impact de la supplémentation de l'alpha-tocophérol à doses croissantes (600, 1200 et 1800 mg/kg d'aliment) d'une part sur la teneur en protéine, l'activité enzymatique anti-oxydante de la Catalase et le taux en malondialdéhyde du foie et d'autre part sur l'histologique du tissu hépatique chez des rats de souche wistar en croissance.

Au terme de cette période expérimentale, les principaux résultats obtenus montrent que :

Concernant le lot supplémenté en 600 mg d'alpha-tocophérol, nous avons obtenu une augmentation non significative de la teneur en protéines et de l'activité de la CAT et une diminution significative du taux en MDA, ce qui montre l'effet protecteur de l'alpha-tocophérol vis-à-vis du stress oxydant, elle protège les structures sensibles à l'oxydation. Par contre nous avons noté pour les lots supplémentés en 1200 et 1800 mg d'alpha-tocophérol : une diminution non significative de la CAT et de la teneur en protéine suivi de l'augmentation non significative du MDA, dans ce cas précis l'alpha-tocophérol n'a pas agit en tant qu'anti-oxydant mais a eu plutôt tendance à agir en tant que pro-oxydant et donc elle a mené à l'apparition d'un déséquilibre de la balance entre la production d'espèces réactives et les défenses anti-oxydantes de l'organisme. Enfin, les coupes histologiques n'ont fait que confirmer l'ensemble de ces résultats.

**Mots clés :** stress oxydant, alpha-tocophérol, pro-oxydant, foie, rat.

## **Abstract**

This work aims to study the effect of supplementation with alpha-tocopherol in increasing doses (600, 1200 and 1800 mg / kg diet). Firstly, on the protein content, antioxidant enzyme activity of the catalase and the rate of malondialdehyde in the liver and secondly, on histological liver tissue of rats of wistar strain growing.

After this trial period, the main results show that: Provide batch supplemented with 600 mg of alpha-tocopherol, we got a non-significant increase in protein content and CAT activity accompanied by a significant decrease in MDA levels, which shows the effects protecting the alpha-tocopherol compared with oxidative stress, it protects in vivo oxidation sensitive structures. Contrary we noted for the fortified lots 1200 and 1800 mg alpha-tocopherol a non-significant decrease in CAT and protein content followed by non-significant increase of MDA, in this case alpha-tocopherol does not act as an antioxidant but had a tendency to act as a pro-oxidant. Finally, histological sections have been only confirming all of these results.

**Key words:** oxidative stress, alpha-tocopherol, pro-oxidant, liver, rat.

يهدف هذا العمل الى دراسة تأثير لفاتوكوفيرول ( 600 1200 1800 malondialdéhyde " " نشاط الانزيم المضاد للأكسدة " من جهة تأثيرها على انسجته من جهة لجرذان ويستار wistar . بعد هذه الفترة التجريبية اهم النتائج المتحصل عليها هي:

بالنسبة للمجموعة المتحصلة على زيادة 600 لفا توكوفيرول غير هام البروتينات و انخفاض هام في مستوى MDA وهذا يدل على التأثير لفاتوكوفيرول من الاكسدة.

المقابل سجلنا نفس النتائج بالنسبة للمجموعتين المتحصلتان على زيادة 1200 1800 توكوفيرول انخفاض غير هام وكذلك في محتوى البروتينات و ارتفاع غير هام لل MDA ، ه ه الالفاتوكوفيرول لم يؤثر لكن كان له تأثير .

وأخيرا يجية للكبد مؤكدة للنتائج السابقة.

يه : - الالفاتوكوفيرول- . - - .

## Glossaire

**Ataxie :** est un trouble de la coordination des mouvements volontaires souvent dû à une atteinte du système nerveux, lieux de cette coordination. Cette pathologie ne concerne pas les muscles et la force musculaire est donc conservée, ces troubles peuvent apparaître à la station debout, à la marche ou lors d'exécution d'un mouvement (Nicole, 1999).

**Athérosclérose :** Maladies dégénérative des artères très répandue, due à l'athérome et comportant un épaissement et un durcissement de leur paroi gênant la circulation sanguine (Daugherty *et al.*, 1994).

**Parkinson :** Affection associant un tremblement de repos, une rigidité musculaire et une rareté des mouvements volontaires qui donne au sujet une attitude figée. Les lésions qui en sont responsables siègent au niveau du locus niger et sont à l'origine d'un déficit en dopamine (Basseti *et al.*, 2007)

## Liste des abréviations

<b>-T</b>	:	Alpha-tocophérol
<b>AAPH</b>	:	2,2'-azobis-(2-amidinopropane hydrochloride)
<b>AGPI</b>	:	Acide gras polyinsaturé
<b>ADN</b>	:	Acide désoxyriboncléique
<b>AMNV</b>	:	2,2-azobis-(2,4 dimethylisovaleronitrile)
<b>BHT</b>	:	Butyl-Hydroxotoluène
<b>CAT</b>	:	Catalase
<b>EAR</b>	:	Espèce réactive de l'azote
<b>EOR</b>	:	Espèce réactive de l'oxygène
<b>ER</b>	:	Espèce réactive
<b>GPx</b>	:	Glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	:	Glutathion réduit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:	Peroxyde d'hydrogène
<b>HO•</b>	:	Radical hydroxyle
<b>HOCl</b>	:	Acide hypochloreux
<b>LDL</b>	:	Low density lipoprotein
<b>LO•</b>	:	Radicaux alkoxydes d'AG
<b>LOO•</b>	:	Radical peroxyde d'AG
<b>LPO</b>	:	Lipoperoxyde
<b>MDA</b>	:	Malondialdehyde
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	:	Trioxyde d'azote
<b>NO</b>	:	Monoxyde d'azote
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	:	Ion nitrate
<b>O<sub>2</sub></b>	:	Oxygène singulet 1
<b>O<sub>2</sub>•-</b>	:	Radical superoxyde

- ONOO-** : peroxy nitrite
- ONAB** : Office National des Aliments du Bétail
- PBS** : Phosphate buffered saline (le tampon phosphate salin)
- RS** : Régime standard.
- RSE<sub>600</sub>** : Régime standard supplémenté en 600 mg de la vitamine E /kg
- RSE<sub>1200</sub>** : Régime standard supplémenté en 1200 mg de la vitamine E/kg
- RSE<sub>1800</sub>** : Régime standard supplémenté en 1800 mg de la vitamine E/kg
- RO•** : Radical secondaire alkoxy
- RO<sub>2</sub>•** : Radical peroxy
- SOD** : Superoxyde dismutase
- TBA** : Albumine sérum bovin
- TCA** : Trichloroacetic acid (Acide trichloroacétique)
- USTHB** : Université des sciences et de la technologie de Houarri Boumedienne.

## Liste des figures

- Figure 1 :** Réactions de base intervenant lors de la synthèse et de la dégradation des EOR et des EAR (Smirnoff, 2005).....4
- Figure 2 :** Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Delattre et *al.*, 2005).....5
- Figure 3 :** Les différentes pathologies du stress oxydant (Valko et *al.*, 2004).....7
- Figure 4 :** La Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols (Brigelius-Flohe et *al.*, 1999).....14
- Figure 5 :** Effets de la supplémentation de l' -T (600 , 1200 et 1800 mg<sup>l</sup>) par Kg d'aliment sur le poids corporel chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SE (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 entre témoin et groupe traités).....26
- Figure 6 :** Effets de la supplémentation de l' -T (600, 1200, 1800mg/Kg d'aliment) sur le poids du foie chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SE (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 entre témoin et groupe traités).....27
- Figure 7. (a à c) :** Effet de la supplémentation en 600 mg d' -T/kg d'aliment: RS<sub>600</sub>, sur le taux en MDA la teneur en protéine, et l'activité de la CAT au niveau du tissu hépatique chez les rats en croissance par rapport au lot RS. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SE (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 entre témoin et groupe traité).....30
- Figure 8. (a à c) :** Effet de la supplémentation en 1200 mg d' -T/kg d'aliment: RS<sub>1200</sub>, sur le taux en MDA, la teneur en protéine et l'activité de la CAT au niveau du tissu hépatique chez les rats en croissance par rapport aux lots: RS, RSE<sub>600</sub>. Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SE (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 entre témoin et groupe traités).....32
- Figure 9. (a à c) :** Effet de la supplémentation en 1800 mg d' -T/kg d'aliment: RS<sub>1800</sub>, sur le taux en MDA, la teneur en protéine, et l'activité de la CAT au niveau du tissu hépatique chez les rats en croissance par rapport aux lots: RS, RSE<sub>600</sub>, RSE<sub>1200</sub> . Chaque barre représente la moyenne  $\pm$  SE (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 entre témoin et groupe traités).....35
- Figure 10 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a :10x, b40x, H&E) montrant une architecture normale chez lot RS (V.C : Veine centro-lobulaire S : Sinusoïde, H : hépatocyte, E : Espace porte).....37
- Figure 11 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a :10x, b : 40x , H&E) montrant une architecture normale chez le lot RSE600 (V.C : Veine centro-lobulaire S : Sinusoïde, H : hépatocyte ).....37
- Figure 12 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a :10x, b :40x , H&E) montrant une désorganisation de l'architecture des composants du foie de rats soumis à 1200 mg d' -T: lot RSE1200 (V.C: Veine centro-lobulaire, S : Vinusoïde, H : Hépatocyte C : Congestion).....39
- Figure 13 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a :10x, b :40x , H&E) montrant une désorganisation de l'architecture des composants du foie de rats soumis à 1800mg d' -T: lot RSE1800 (V.C: Veine centro-lobulaire, S : Sinusoïde, H : Hépatocyte C : Congestion).....3

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Les mécanismes d'oxydation (Graille, 2003).....	8
<b>Tableau II :</b> les isoformes de la superoxyde dismutase (Fridovich, 1997).....	11
<b>Tableau III :</b> Les différentes concentrations de BSA servent à préparer la courbe d'étalon pour le dosage des protéines.....	21
<b>Tableau IV:</b> Les différentes étapes de dosage de la CAT ( Aebi, 1974).....	22

## Sommaire

<b>Introduction</b> .....	Erreur ! Signet non défini.
<b>Partie I : Etude bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Stress oxydatif</b> .....	<b>3</b>
I.1. Généralités .....	3
I.2. Les radicaux libres .....	3
I.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène .....	4
I.2.2. Les espèces réactives azotées .....	6
I.3. Conséquences physiopathologiques .....	7
<b>Chapitre II : Oxydation des lipides et antioxydants</b> .....	<b>8</b>
II.1. Les différents types d'oxydation .....	8
II.2. La lipoperoxydation .....	9
II.2.1. Protection contre la lipoperoxydation .....	10
II.2.1.1. Systèmes antioxydants enzymatiques .....	10
II.2.1.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques .....	11
<b>Chapitre III : La vitamine E</b> .....	<b>14</b>
III.1. Généralités : .....	14
III.2. Source : .....	14
III.3. propriétés physico-chimiques : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.4. Action antioxydante de la vitamine E : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
III.5. L'effet pro-oxydant de l' -tocophérol <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> : .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Partie II: Etude expérimentale</b>	
<b>Chapitre I : Matériel et méthodes</b> .....	Erreur ! Signet non défini.
I.1. Matériel .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.1.1. Matériel biologique .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.1.2. Matériel non biologique .....	18
I.2. Méthodes .....	19
I.2.1. Dosage du malondialdehyde .....	19
I.2.2. Dosage des protéines .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.2.3. Dosage de la catalase .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I.2.4. Etude histologique .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

I.2.5. Analyse statistiques des résultats ..... **Erreur ! Signet non défini.**

**Chapitre II : Résultats et discussion** ..... **Erreur ! Signet non défini.**

II.1. Modification physiologique ..... **Erreur ! Signet non défini.**

II.1.1 Symptomatologie. .... **Erreur ! Signet non défini.**

II.1.2. Effets de la supplémentation en -T sur la variation de la croissance ..... **Erreur ! Signet non défini.**

II.1.3. Effets de la supplémentation en différentes doses d' -T sur la variation du tissu hépatique ..... 27

II.2. Effet de la supplémentation en -T sur quelques paramètres du stress oxydant ..... 28

II.2.1. Effets des différents régimes sur les paramètres biochimiques (le taux en malondialdéhyde, la teneur en protéines, l'activité de la catalase) et sur l'histologie du tissu hépatique..... 28

II.2.1.1. Effets de la supplémentation de 600 mg d' -T/kg d'aliment sur le taux en malondialdéhyde, la teneur en protéine et l'activité de la catalase du tissu hépatique.....28

II.2.1.2. Effets de la supplémentation de 1200 mg d' -T/kg d'aliment sur le taux en malondialdéhyde, la teneur en protéines et l'activité de la catalase du tissu hépatique et .....31

II.2.1.3. Effets de la supplémentation de 1800 mg d' -T/kg d'aliment sur le taux en malondialdéhyde, la teneur en protéines et l'activité de la catalase du tissu hépatique.....34

II.2.1.4. Effets de la supplémentation en -T aux taux de 600,1200 et 1800 mg/kg d'aliment sur le tissu hépatique chez les rats en croissance .....37

**Conclusion**..... **Erreur ! Signet non défini.**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# Introduction

### INTRODUCTION

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. En situation normale, la balance anti-oxydant/pro-oxydant est équilibrée. Mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'espèces réactives devient excessive. Lorsqu'un déséquilibre intervient (par surproduction de composés pro-oxydants ou par déficit en substances anti-oxydantes), on parle de stress oxydatif ou stress oxydant (Favier, 2003). A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires (Delattre et *al.*, 2005).

La vitamine E (alpha-tocophérol) est le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Shils et *al.*, 2006, Traber, 2007). Elle pourrait augmenter l'activité enzymatique anti-oxydante de la Superoxyde dismutase et la catalase (Margaritis et *al.*, 2003, Lyn Patrick 2006).

Cependant, la capacité que l'  $\alpha$ -T puisse agir en tant que pro-oxydant et augmenter la peroxydation lipidique est bien connue *in vitro* (Bowry et *al.*, 1992). Des études sur des LDL isolées (Thomas et *al.*, 1996), ont montré que de fortes doses en vitamine E avaient un effet pro-oxydant. La cause de cette activité pro-oxydante et l'interaction du radical tocophéroxyl avec des radicaux peroxy ou avec des acides gras polyinsaturés dans des LDL, cette réaction mène à l'accumulation des hydroperoxydes (Mukai, 1993).

C'est dans ce contexte que s'incère notre étude, dont l'objectif est d'étudier l'effet de la supplementation de doses croissantes en  $\alpha$ -T (600,1200 et 1800 mg/kg d'aliment) dans un régime alimentaire chez des rats wistar en croissance traités pendant huit semaines afin d'évaluer d'une part l'effet anti-oxydant/pro-oxydant de quelques paramètres oxydant (malondialdehyde) et anti-oxydant (la catalase et les protéines) et d'évaluer d'autre part l'effet de la toxicité des tissus hépatiques.

Ce manuscrit se divise en quatre parties différentes :

- ) **Une première partie** : étude bibliographique qui définit le stress oxydatif (i), les causes (ii), les différents radicaux libres (iii), les conséquences physiopathologiques

liées au stress oxydatif (iv), l'oxydation des lipides et les systèmes anti-oxydants (v), et nous finissons par la vitamine E (vi).

- J) **Une deuxième partie :** décrit le matériel et les méthodes utilisés au cours du travail expérimental.
- J) **Une troisième partie :** expose les résultats et leurs discussions. Elle comporte en premier (i) l'impact de la consommation d'une dose de 600mg d' -T et son effet anti-oxydant chez les rats en croissance, (ii) son influence sur la croissance du poids corporel et du tissu hépatique, mais aussi (iii) sur quelques paramètres biochimiques. Deuxièmement, nous étudions l'effet pro-oxydant de la supplémentation d'une dose de 1200 mg d' -T sur les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions. Enfin, nous montrons également l'effet pro-oxydatif de la supplémentation de 1800 mg d' -T toujours sur les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions.
- J) **Une quatrième et dernière partie :** donne une conclusion à l'ensemble de ces travaux et ouvrant sur plusieurs perspectives.

# **Etude bibliographique**

## Chapitre I : Stress oxydatif

### I.1. Généralités

Au sein de l'organisme, il existe un équilibre entre les espèces réactives (ER) [(est l'ensemble d'entités moléculaires chimiquement et structurellement identiques, qui sont présentes à l'état basal en faible concentration)] et le système antioxydant qui contient notamment : le glutathion, les enzymes anti-oxydantes, les vitamines et les oligoéléments. Ce système est un moyen de défense en cas de production excessive d'ER. Le stress oxydant se définit donc comme un déséquilibre entre la production d'ER et les systèmes de défense (Delattre et *al.* 2007).

L'équilibre redox, se fait en permanence. Dans le cas d'une faible concentration d'ER, le système anti-oxydant la compense : le déséquilibre est de courte durée. L'équilibre redox est maintenu. A l'inverse, s'il est prolongé ou permanent comme dans certaines pathologies chroniques, la concentration en ER est augmentée de façon constante, et la réponse anti-oxydant n'est plus suffisante pour la contenir : une perte de l'homéostasie redox apparait conduisant à l'apparition d'un déséquilibre avec une production forte d'espèces réactives oxygénées (Evans et Halliwell, 1999).

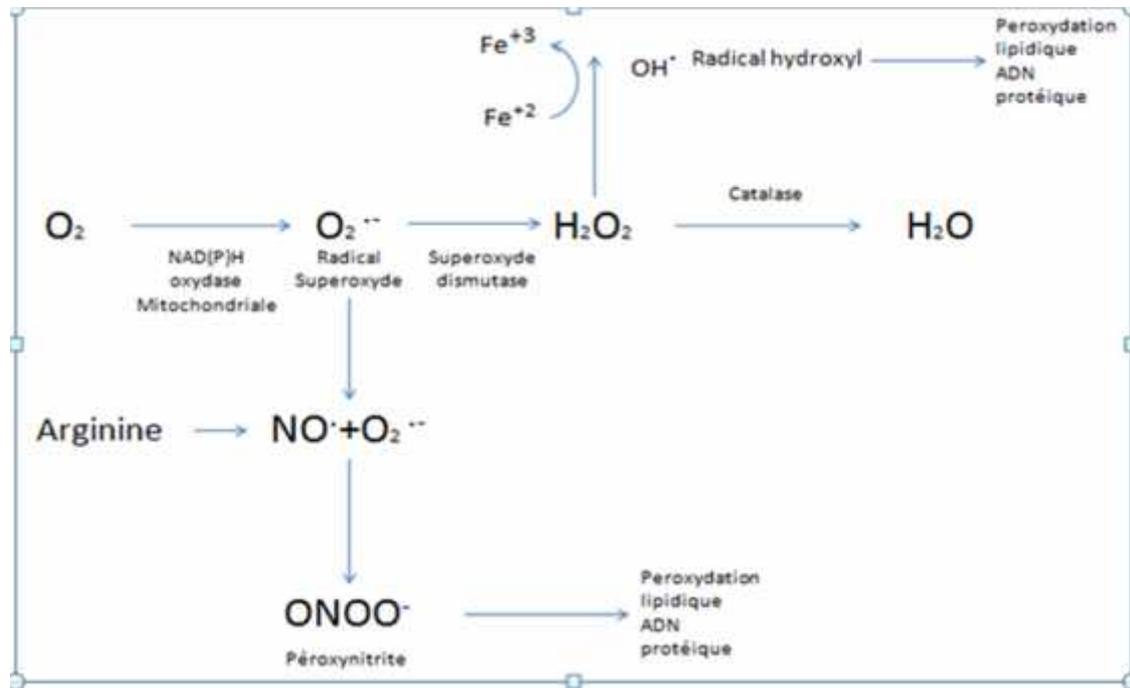
Parmi les causes qui interviennent dans le phénomène du stress oxydant et qui mènent à la production excessive des radicaux libres, nous avons :

le tabagisme, l'alcoolisme, l'obésité, la pollution, le sport intensif, le stress psycho-social et une alimentation trop riche en graisses (favier, 2003).

### I.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (atome, molécule, fragment de molécule) possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. La molécule d'oxygène présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre (Hennebelle, 2006), l'oxyde d'azote (NO) est un radical peu réactif, synthétisé à partir d'un atome d'azote et d'une molécule d'oxygène. Dans les phénomènes du stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination

d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS) (Figure 1) (Wardman et Candeias, 1996).



**Figure 1** : Production des radicaux libres (Smirnoff, 2005).

### I.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

On distingue deux grands groupes de molécules réactives de l'oxygène impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre (Delattre et *al.*, 2005).

#### I.2.1.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires

##### le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ )

Le radical superoxyde est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c ( $Fe^{3+}$ ), l'ascorbate et surtout la superoxyde dismutase (SOD) (McMichael, 2007).

### ) le radical hydroxyle (HO•)

La réduction mono électronique du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) donne naissance au radical hydroxyle (HO•) et à l'anion basique non radicalaire (OH<sup>-</sup>) en présence d'un catalyseur. Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (Hennebelle, 2006).

### ) Le radical peroxyde (RO<sub>2</sub>•)

La formation du RO<sub>2</sub>• comprend deux étapes principales : la première (réaction 1) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical hydroxyl, et la seconde (réaction 2) à la liaison avec une molécule d'oxygène (Powers et Jackson, 2008).



### ) Le radical secondaire alkoxyde (RO•)

Le (RO•) est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde RO<sub>2</sub>H, issu de l'oxydation de substrat RH par des cations métalliques (Haliwell et *al.*, 1990).

## I.2.1.2. Les espèces oxygénées réactives non radicalaires

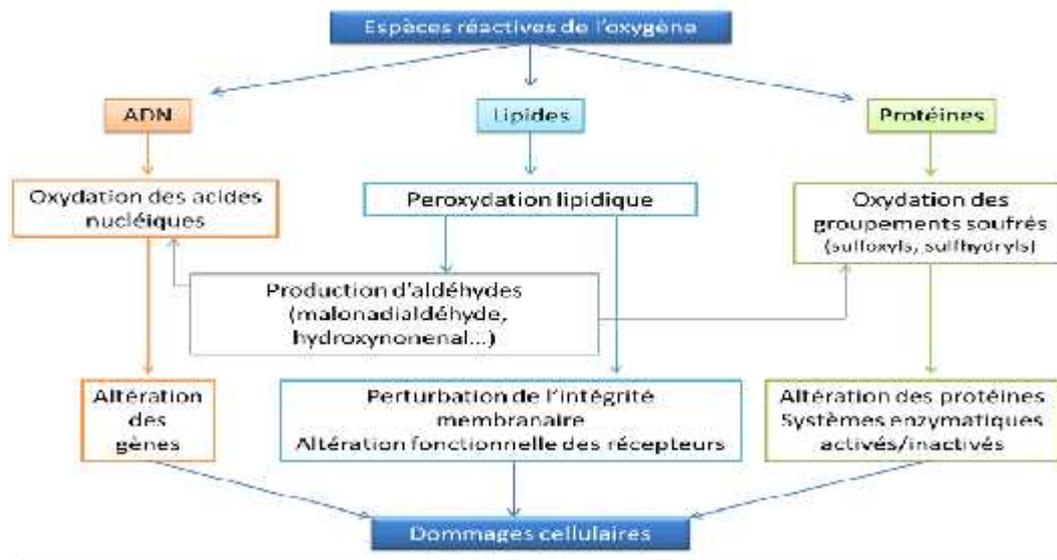
### ) oxygène singulet 1 (O<sub>2</sub>)

L'oxygène singulet est la forme diamagnétique de l'oxygène, il est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Hennebelle, 2006).

### ) le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Il est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup>, lors de réactions de type « Fenton » (Wardman et Candeias, 1996).

les ROS ont plusieurs cibles (Figure 2) (Delattre et *al.*, 2005).



**Figure 2 :** Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Delattre et *al.*, 2005)

## I.2.2. Les espèces réactives azotées (ERN)

### I.2.2.1. Espèces radicalaires azotées

#### ) le monoxyde d'azote (NO•)

Il a pris une place considérable en biologie. Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives

### I.2.2.2. Espèces non radicalaires azotées

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) :  $(2 \bullet\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2)$ .

Dans laquelle peut donner du trioxyde d'azote (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) :  $(\bullet\text{NO} + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3)$ .

Pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) :



De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) :

( $\bullet\text{NO} + \text{O}_2\bullet^- \rightarrow \text{ONOO}^-$ ).

Il est moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques).

### I.3-Conséquences physiopathologiques

La production excessive d'espèces réactives a été identifiée comme étant impliquée dans certaines pathologies. Ces pathologies peuvent se diviser en deux groupes : le premier regroupant celles liées principalement à une production excessive d'EROs telles que le cancer, le diabète ; le second entraîne une augmentation de la production d'ER. Les pathologies chroniques concernées sont notamment les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose et le parkinson...etc. (figure 3) (Valko *et al.*, 2004 ; Khelil *et al.*, 2010).



Figure 3 : les différentes pathologies du stress oxydant (Valko *et al.*, 2004).

## Chapitre II : Oxydation des lipides et antioxydants

Les lipides présents dans les aliments sont plutôt instables à la chaleur et supportent mal le stockage à température ambiante ou à des températures plus basses dans la mesure où ils s'oxydent facilement. L'oxydation des lipides est une réaction entre les lipides insaturés et l'oxydation moléculaire (Graille, 2003).

### II.1. Les différents types d'oxydation

Selon El Atyqy (2007), il existe trois types d'oxydation (Tableau I) :

- ) **Auto-oxydation** catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres.
- ) **La photo-oxydation**, initiée par la lumière en présence de photo sensibilisateurs.
- ) **l'oxydation enzymatique** initiée par la présence des enzymes d'oxydation.

**Tableau I** : Les mécanismes d'oxydation.

Type d'oxydation	Lipides oxydés	Catalyseurs	Agent oxydant	Prévention
<b>Auto-oxydation</b>	Tous les lipides insaturés	Métaux lourds, radicaux libres	Oxygène triplet	Antioxydant
<b>Photo-oxydation</b>	Lipides polyinsaturés	Molécules photosensible	Oxygène singulet	Piégeurs d'oxygène singulet
<b>Oxydation enzymatique</b>	Tous les lipides insaturés	Lipoxygénases	Oxygène triplet	Inactivation des enzymes

(Graille, 2003)

## II.2. La lipoperoxydation

La lipoperoxydation des lipides est un processus permanent portant essentiellement sur les acides gras polyinsaturés, se développant simultanément à l'aide d'enzyme ainsi que spontanément sous forme d'un enchainement de réactions radicalaire. Indispensable à l'organisme, la lipoperoxydation enzymatique conduit à la formation d'eicosanoïdes (prostaglandine, prostacycline, thromboxane) à partir de l'acide arachidonique. A l'inverse, la lipoperoxydation spontanée ou non enzymatique s'avère toujours néfaste, dans les conditions physiologiques normales, elle reflète la toxicité de l'oxygène. La lipoperoxydation non enzymatique ou spontanée se déroule en trois étapes (Pré, 1991) :

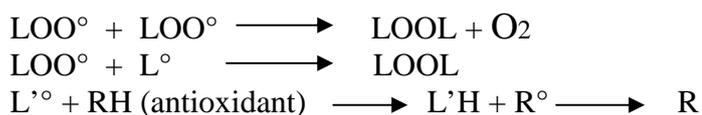
) **Initiation** : elle consiste en l'arrachement d'un hydrogène et de son électron ( $H^\circ$ ) à l'acide gras (L-H) et conduit à la formation d'un radical d'acide gras ( $L^\circ$ ) dont le remaniement électronique donne 2 diènes conjugués stables.

) **Propagation** : on assiste à la formation d'un radical peroxy ( $LOO^\circ$ ) par combinaison de ( $L^\circ$ ) avec  $O_2$  :  $LOO^\circ \longrightarrow L^\circ + O_2$

Le radical ( $LOO^\circ$ ) réagit à son tour sur une autre molécule d'AGPI formant ainsi un hydroperoxyde ( $LOOH$ ) et un nouveau radical libre ( $L^\circ$ ) qui assure la propagation de la chaîne de peroxydation. Les hydroperoxydes ( $LOOH$ ) sont instables. Leur décomposition implique la présence de formes ionisées de métaux de transition (Fer, cuivre) (Hochdtein et Sevanian, 1968).

) **Terminaison** :

La réaction se termine par la formation de composés stables issus de l'association de deux espèces radicalaires.



### II.2.1. Protection contre la lipoperoxydation

En 2004, Laurent déclare que le système de protection contre les processus radicalaires de peroxydation lipidique sont indispensables à la vie cellulaire. Dans le milieu intracellulaire cette protection est assurée par :

- ✓ des enzymes cytosoliques, qui en catalysant l'élimination entre autres d'O<sub>2</sub><sup>°-</sup>, d'H<sub>2</sub>O et des hydroperoxydes lipidiques, réduisent au maximum la formation de OH<sup>°</sup>.
- ✓ des antioxydants, capteurs ( scavengers) de radicaux libres pour la plupart, hydrophiles ou hydrophobes selon leur localisation subcellulaire.

#### II.2.1.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydantes les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Mates et *al.*, 1999) :

##### A-La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine, son rôle majeur est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.



La SOD est un élément de défense contre les EOR et plus particulièrement contre l'anion superoxyde (Zelko et *al.*, 2002). En effet, même si elles sont à l'origine de la production de peroxyde d'hydrogène, elles permettent surtout de diminuer la durée d'existence du radical superoxyde et ainsi, d'empêcher la formation d'espèces beaucoup plus néfastes comme le peroxydinitrite par exemple (Valko et *al.*, 2006).

Il existe trois isoformes de la SOD (Fridovich, 1997) qui diffèrent par leurs localisations et leurs cofacteurs (Tableau II) :

**Tableau II** : les isoformes de la superoxyde dismutase.

<b>Isoformes</b>	<b>SOD1 (CuZn-SOD)</b>	<b>SOD2 (Mn-SOD)</b>	<b>SOD3 (EC-SOD)</b>
<b>Localisation</b>	Milieu intracellulaire	Matrice mitochondriale	Milieu extracellulaire
<b>Cofacteur</b>	Zinc et Cuivre	Magnésium	Zinc et Cuivre

(Fridovich, 1997)

**B- La Catalase (CAT)**

Essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, et est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.



La CAT est une enzyme héminique, c'est-à-dire qu'elle possède un atome de fer qui participe à la fabrication de l'hème, elle est majoritairement retrouvée dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales, C'est une enzyme qui possède un *turnover* important. La CAT peut convertir en une minute environ 6 millions de molécules de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau et en oxygène (Valko et *al.* 2006).

**C- La Glutathion peroxydase (GPX)**

La GPx sert à détoxifier le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Delattre et *al.*, 2005). La GPx est en compétition avec la CAT car elles utilisent toutes les deux le même substrat ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), la GPX étant active pour des faibles concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Valko et *al.*, 2006).

**II.2.1.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques**

Les principaux système antioxydants non enzymatiques les plus connus chez les animaux et les végétaux sont répartis en deux groupes : système antioxydant endogène et exogène.

### A. Systèmes antioxydants endogènes

**a- Le glutathion :** C'est un tripeptide ( -glutamyl-cystéinyglycine) ubiquitaire produit dans différents tissus. Il est présent dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries). le glutathion, largement présent sous forme réduite (GSH), qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO•, RO<sub>2</sub>•, RO•, ONOO-, des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl (McCall et Frei, 1999; Delattre et *al.*, 2005; Masella et *al.*, 2005).

**b- L'acide urique :** Présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes *in vitro* contre les HO• et RO<sub>2</sub>• (Delattre et *al.*, 2005). l'acide urique est issu du catabolisme des purines, et est un puissant réducteur des radicaux libres (Pritchard et *al.*, 1993).

**c- Le coenzyme Q :** Le coenzyme est un composé hydrophobe qui se situe dans les membranes cellulaires. Il appartient à la chaîne respiratoire mitochondriale, et est également présent dans les lipoprotéines où il a un effet antioxydant : il inhibe la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes, son effet antioxydant s'exerce aussi au niveau de l'ADN et des protéines, étant donné que le coenzyme est le seul antioxydant liposoluble endogène (Bentinger et *al.*, 2010).

### B. Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques d'origine animal ou végétal, comprennent majoritairement les vitamines (E, A, C), les caroténoïdes et des composés phénoliques (McCall et Frei, 1999).

**a-La vitamine E :** Elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces réactive oxygénées (Pincemail et *al.*, 1998).

**b-La vitamine A :** La vitamine A est apportée par l'alimentation, elle protège les structures cellulaires contre l'attaque des radicaux libres. (Winkler et *al.*, 1994). Elle est considéré comme un capteur «scavengers» des radicaux hydroxyls et peroxylys ainsi que des états singulet de l'oxygène (Denek et Krinsky, 1982).

**c-La vitamine C ou acide ascorbique :** La vitamine C est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue

pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky et *al.*, 1999). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (Laguerre et *al.*, 2007).

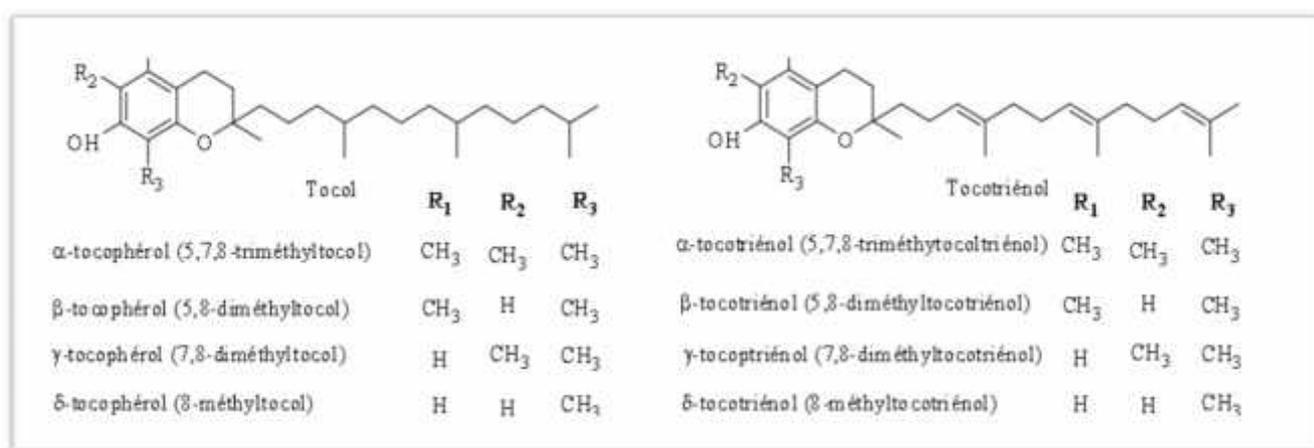
**d-Les caroténoïdes :** Les caroténoïdes sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO•, HO•, O<sub>2</sub>•-, R• par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko et *al.*, 2006).

**e-les composés phénoliques :** Et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane . Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Schroeter et *al.*, 2002; Leopoldini et *al.*, 2011).

## Chapitre III : La vitamine E

### III.1. Généralités

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols) (figure 4). Le composé principal est l' $\alpha$ -tocophérol qui est biologiquement et chimiquement la forme la plus active de la vitamine E (Shils et *al.*, 2006), elle est synthétisée par les plantes. Les tocophérols et les tocotriénols sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant (Brigelius-Flohe et *al.*, 1999).



**Figure 4 :** La Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols (Brigelius-Flohe et *al.*, 1999).

### III.2. Source

Les tocophérols sont largement répandus dans les produits naturels d'origine végétale ou animale. Les sources alimentaires les plus riches en vitamine E sont les céréales (seigle, blé, avoine...) dont leurs germes, les fruits (bananes, fraise, melon...), la plupart des oléagineux, dont leurs huiles (tournesol, soja, maïs, olive, arachide...). On trouve de la vitamine E dans les légumes à feuilles (salade, épinard, chou, poireau), dans la graisse animale ainsi que dans le lait, le beurre et le fromage et également dans le poisson (Le Grusse et Watier, 1993).

Il existe deux formes de vitamine E :

- J) La forme synthétique : il s'agit du dl- $\alpha$ -tocophérol que l'on retrouve dans les suppléments en vitamine E. On retrouve également l'acétate ou le succinate de tocophérol.
- J) la forme naturelle : elle est particulièrement recommandée. En effet, elle est deux fois mieux assimilée par les tissus que sa forme synthétique. De plus, la forme naturelle est la plus active (Le Grusse et Watier, 1993).

### III.3. propriétés physico-chimiques

Toutes les huit formes de la vitamine E se présentent, à la température ambiante, sous la forme d'une huile visqueuse d'une couleur jaune pâle. Ils sont insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques). Ils sont peu sensibles à la chaleur, à la lumière et aux acides, mais très sensibles à l'oxydation et aux bases. Les esters de tocophérols et notamment l'acétate de dl- $\alpha$ -tocophérol sont relativement stables (Bourgeois, 2003).

### III.4. Action antioxydante de la vitamine E

La vitamine E arrête ou ralentit l'oxydation des acides gras en s'oxydant à leur place. C'est la réaction qui nécessite le moins d'énergie qui se fera préférentiellement. La vitamine E intervient surtout au stade de l'initiation, en cédant un de ses atomes d'hydrogène au radical peroxyde qui se stabilise et devient non réactif. Cela permet ainsi de stopper les réactions en chaîne (Sies et *al.*, 1992).



Le radical libre  $\text{A}^\circ$  formé par la vitamine E (AH) se stabilise en s'associant avec d'autres molécules selon les réactions suivantes :



La vitamine E peut également intervenir au cours de la phase de propagation en absorbant préférentiellement l'oxygène.

### III.5. L'effet pro-oxydant de l' $\alpha$ -tocophérol *in vivo* et *in vitro*

L'  $\alpha$ -tocophérol ne joue pas seulement un rôle antioxydant pour lutter contre le stress oxydatif mais, elle possède aussi un effet pro-oxydant (Bowry, 1992).

Avant de parler sur l'effet pro-oxydant de l'  $\alpha$ -T *in vivo*, il serait intéressant de commencer tout d'abord par les études effectuées *in vitro*, nous en citerons les plus importantes notamment celles réalisées par Bowry :

C'est en 1993, qu'une autre étude menée par Bowry et Stocker toujours *in vitro* et sur le même type d'échantillon vient de définir la théorie de « l'  $\alpha$ -T médiateur de peroxydation », dans cette étude, ces auteurs montrent que l'  $\alpha$ -T donne le radical tocophéroxyl et que si ce dernier n'était pas réduit il devenait pro-oxydant. De plus, l'augmentation de la concentration de l'  $\alpha$ -T dans les LDL a augmenté le taux de la peroxydation lipidique. Ils ont présenté des arguments et ont le soutien expérimental que cette activité pro-oxydante de l'  $\alpha$ -T est causée par la réaction du radical de l'  $\alpha$ -T avec les groupements de LH actifs des LDL.

Après avoir parlé de l'effet pro-oxydant *in vitro* on passe maintenant à l'effet pro-oxydant *in vivo* :

Il faut reconnaître que c'est en 1996, que Kontush et *al.* ont pu expliquer nettement l'effet pro-oxydant de la vitamine E, *in vitro* et surtout *in vivo*. Leur étude a porté sur l'oxydation des LDL du plasma (*in vivo*) et des LDL isolées (*in vitro*), de donneurs sains ou de patients atteints d'ataxie. Ils ont constaté qu'une supplémentation en  $\alpha$ -T diminue l'oxydation au niveau du plasma et des LDL isolées dans des conditions oxydatives fortes (amorçées par une teneur élevée en  $\text{Cu}^{2+}$  et en 2,2 azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)). L'effet était indépendant de la présence d'ascorbate dans les échantillons. Par contre, en présence de conditions d'oxydation modérées (quantités basses de  $\text{Cu}^{2+}$  ou AAPH), la supplémentation en  $\alpha$ -T a diminué l'oxydation plasmatique seulement en présence de quantités physiologiques d'ascorbate. Un effet pro-oxydant de l'  $\alpha$ -T a été démontré dans des conditions oxydatives modérées dans le plasma fortement dilué et dans les LDL isolées. Ces résultats indiquent que le niveau de stress oxydatif et la concentration de co-antioxydants, comme l'ascorbate, capable de régénérer l'  $\alpha$ -T lors de l'oxydation des particules LDL, semble représenter des facteurs majeurs déterminant l'activité de l'  $\alpha$ -T vers l'oxydation tant dans le plasma humain que dans les LDL isolée.

# **Etude expérimentale**

## Chapitre I : Matériel et méthodes

La présente étude a été réalisée sur une période de cinq (05) mois, s'étalant du mois de Mars au mois de Juillet, au niveau de plusieurs laboratoires de biochimie (Neuroscience, endocrinologie et nutrition) de l'Université des Sciences et de la Technologie de Houari Boumedienne (USTHB) à Alger. L'étude expérimental a été réalisée sur des rats mâles de souche wistar (*Rattus norvegicus*), âgés de 21 jours (post sevrage) dont le poids variait de 55 à 65 g chez lesquels nous avons déterminé certains paramètres biochimiques du foie (Catalase, MDA, protéines) ainsi que l'étude histologique de ce même organe, après les avoir soumis à un régime supplémenté en  $\alpha$ -T à des doses croissantes (600, 1200 et 1800 mg  $\alpha$ -T /Kg d'aliment).

### I.1. Matériel

#### I.1.1. Matériel biologique

Seize (16) rats ont été fournis par le centre d'élevage de l'institut pasteur de Kouba, ils sont répartis en quatre (04) lots expérimentaux de quatre (04) rats chacun et maintenus dans des cages individuelles en plastique (Annexe 1).

Les différents lots sont soumis à différents régimes (Annexe 2).

- ] Le lot 1 : est soumis à un régime standard (lot RS).
- ] Le lot 2 : est soumis à un régime standard supplémenté en 600 mg d' $\alpha$ -T par kg d'aliment (lot RSE<sub>600</sub>)
- ] Le lot 3 : est soumis à un régime standard supplémenté en 1200 mg d' $\alpha$ -T par kg d'aliment (lot RSE<sub>1200</sub>).
- ] Le lot 4 : est soumis à un régime standard supplémenté en 1800 mg d' $\alpha$ -T par kg d'aliment (lot RSE<sub>1800</sub>).

#### a) Elevage

L'élevage a duré neuf (9) semaines (une semaine d'adaptation et huit semaines d'expérimentation). La température de l'animalerie est de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  avec un cycle jour/nuit de 12 heures et une hygrométrie de 35%. Les aliments sont donnés sous forme de poudre dans

des boîtes de Petri à raison de 25g /jour /rat quantité recommandée (Jadot, 1981) et changés chaque jour, l'eau est donnée *ad libitum*.

Chaque cage contient un rat maintenu sur une litière de sciure sans qu'il ne soit possible d'éviter la coprophagie. Une pesée régulière a été faite chaque quatre, cinq jours.

### **b) Sacrifice et prélèvement**

Après une durée de huit (08) semaines ; les rats sont anesthésiés à l'éther, puis disséquer le foie est rapidement prélevé, rincer avec de l'eau physiologique à 9‰, plonger dans du tampon phosphate salin (solution PBS), peser puis couper en quatre (04) fragments dont trois (03) sont destinés au dosage des différents paramètres biochimiques (Taux en MDA, activité de la CAT et la teneur en protéines) et sont conservés à -80°C (Annexe 3) et le quatrième est mis dans du formol dilué à 10% pour la réalisation des coupes histologiques.

## **I.1.2. Matériel non biologique**

### **a-Composition de régime alimentaire standard (Annexe 2)**

### **b- L'alpha tocophérol**

L'α-T qui a servi à compléter le régime standard à différentes doses (600, 1200 et 1800 mg) a été acheté au niveau pharmaceutique sous forme des gélules de 100mg / gélule (Annexe 4).

### **c- Verreries et autre (Annexe 5)**

### **d- Réactifs et solutions (Annexe 5)**

### **e-Appareillages (Annexe 6)**

## I.2. Méthodes

### I.2.1. Dosage du malondialdéhyde

#### a- Principe

La peroxydation lipidique (MDA) est mesurée sur les homogénats de foie par la méthode Draper (1993), basée sur la formation d'un complexe absorbant à 532 nm entre une molécule de malondialdéhyde produite lors de la peroxydation lipidique et deux molécules d'acide thiobarbiturique avec élimination de deux molécules d'eau. La gamme étalon utilisée a été réalisée avec une solution de malondialdéhyde préparée parhydrolyse du 1, 1, 3, 3-tétrathoxypropane avec de l'acide sulfurique à 1%.

#### b- Mode opératoire

L'homogénat tissulaire du foie, est réalisé dans le tampon phosphate (100 mg pour 9ml), 0.2M, pH7.4 à l'aide d'un broyeur homogénéiseur de Potter. Le principe consiste à mettre 200 µl de l'homogénat en présence de 1ml de TCA à 10% on rajoute 100µl de Butyl-Hydroxotoluène (BHT) à 500 ppm à 100°C pendant 30 min. Après centrifugation à 400 tours/min pendant 10 min, on récupère le surnageant et on rajoute un volume d'une solution aqueuse de TBA saturée à un même volume de l'homogénat. On chauffe à 100°C pendant un temps de 30 min et on lit l'absorbance à 532 nm.

#### c-Expression des résultats

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

DO : absorbance à 532 nm.

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

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

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

## I.2.2. Dosage des protéines totales

### a-Principe

La teneur en protéines est déterminée selon la méthode de Lowry et al. (1951). Ce procédé repose sur le fait que l'acide phosphotungstique et molybdique du réactif de Folin sont réduits en présence du complexe entre les ions  $\text{Cu}^{++}$  et les groupements tyrosine et tryptophane des protéines, formés en milieu alcalin. Une coloration bleue est formée, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des protéines. On réalise une courbe étalon de solution d'albumine à 1 mg/ml, l'absorbance est mesurée à 750 nm après développement de la couleur pendant 30 mn à l'abri de la lumière.

### b-Mode opératoire

#### 1. Extraction des protéines

100  $\mu\text{l}$  d'échantillon obtenu après broyage de tissu dans de triton X-100 (100 mg dans 9 ml de triton X -100) ; sont mis en 1ml de TCA à 1% on centrifuge à 4000 tours/min pendant un temps de 15 min, on jette le surnageant et on récupère le culot et on rajoute 1ml de TCA. On centrifuge pour la deuxième fois à 4000 tours/min pendant 15 min, on récupère le culot et on rajoute 1ml d'un mélange d'alcool /éther (v /v) puis on centrifuge on centrifuge à 4000 tours/min pendant un temps de 5 min on jette le surnageant et on sèche en appliquant les bords supérieurs des tubes avec du papier filtre. On lave avec 1 ml d'éther éthylique et on centrifuger à 4000 t /min pendant 5min, on jete le surnageant et on sèche le contenu des tubes à l'air chaud .Le culot étant parfaitement sec on rajoute à celui-ci 1 ml de NaOH.

#### 2. Dosage des protéines

On ajouter 200  $\mu\text{l}$  de l'homogénat à 1 ml de la solution A (Annexe 7) puis on agite et on les laisse reposer pendant 10 min à température ambiante après on rajouter 100  $\mu\text{l}$  de la solution B (Annexe 7). On laisse reposer 30 à 60 min à température ambiante et on lit la DO à 750 nm contre le blanc (eau bi-distillée).

) la détermination des concentrations des protéines est obtenue en utilisant la courbe étalon

### 3. Préparation de la courbe étalon

- )] Préparer une solution d'Albumine sérum bovin (BSA) ; mettre dans une série de huit (8) tubes une quantité croissante de la solution BSA allant de 0 à 200 et compléter à chaque fois avec de l'eau distillée à 200 µl (tableau IV ) (Annexe 8)

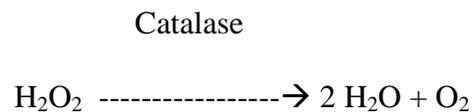
**Tableau III :** Les différentes concentrations de BSA servent à préparer la courbe d'étalon pour le dosage des protéines.

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

### I.2.3. Dosage de la catalase

#### a- Principe

La catalase (EC 1.11.1.6) dégrade le **peroxyde d'hydrogène** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et dioxygène suivant la réaction :



La disparition du peroxyde d'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie à 240 nm.

#### b- Mode opératoire

- )] Broyer 1g de l'échantillon dans 9 ml de triton X-100 à 1%
- )] Incuber à 35°C pour activer l'enzyme
- )] Préparer le tampon phosphate (50mM à ph=7) (Annexe 7)
- )] Préparer la solution de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30Mm) (Annexe 7)

**Tableau IV** : Les différentes étapes de dosage de la CAT (Aebi, 1974)

	Cuve de référence	Cuve d'échantillon
Tampon phosphate	1ml	/
Broyat	2ml	2ml
Solution de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	/	1ml

J) Lire l'absorbance à 240 nm pendant un temps de 15s.

### c-Expression des résultats

$$A_{t_1} - A_{t_2} = V/v \cdot \frac{2.3}{\Delta t} \cdot l \cdot C \quad A1/A2$$

V : Le volume total.

v : le volume de l'échantillon.

$\Delta t$  : variation du temps (15s)

A1 : l'absorbance à t=0s.

A2 : l'absorbance à t=15s.

Activité de la catalase en  $\mu\text{mol} / \text{min}$

2.3 : coefficient d'extinction.

### I.2.4. Etude histologique

Les prélèvements histologiques ont été traités au laboratoire d'histologie du service anaphate de l'hôpital professeur Nefissa Hamoud (ex : Parnet) à Alger, selon les techniques décrites par Martoja, (1967) et Gabe (1968).

Pour l'observation en Microscope optique, les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, déshydratation et éclaircissement, imprégnation, inclusion et mise en bloc, Confection des coupes et collage des rubans, déparaffinage et hydratation, coloration, montage et observation.

## 1. Fixation

La fixation sert d'assurer le maintien de la structure morphologique et de l'intégrité chimique des tissus tels qu'elles se présentant au moment de leur prélèvements.

Après son prélèvement, le foie et les reins sont pesés puis fixés dans le formol à 10% pendant 48 heures.

## 2. Déshydratation et éclaircissement

Les organes sont imprégnés dans sept bains d'alcool éthylique à concentration croissante :

- Alcool 70° (deux bains de 30 minutes).
- Alcool 90° (deux bains de 30 minutes).
- Alcool 100° (trois bains de 30 minutes).

L'éclaircissement est effectué dans un bain de xylène pendant 30 minutes (il peut servir un liquide d'attente)

## 3. Imprégnation

Dans une étuve réglée à 58° C, les organes sont imprégnés dans deux bains successifs : le premier bain constitué de 50% de butanol et 50% de paraffine et le deuxième bain comprenant de la paraffine pure. La durée est d'une heure pour chaque bain.

## 4. Inclusion et mise en bloc

L'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine.
- Placement des cassettes sur les quelles est inscrit l'état de l'animal
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 7 minutes.

## 5. Confection des coupes et collage des rubans

Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome de type Leica avec une épaisseur de 3 µm. Les rubans sont étalés dans un bain marie (37°C) puis récupérés et collés sur des lames en verre et ensuite séchés dans l'étuve réglée à 25°C pendant 24 heures.

## 6. Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent y pénétrer. Les coupes sont passées dans un bain de xylène pendant trente minutes, puis sont séchées dans l'étuve réglée à 25°C pendant trois minutes. Les coupes sont hydratées dans quatre bains d'éthanol décroissant : 100° ; 95° ; 90° ; 70° pendant deux minutes chacun puis sont rincées à l'eau courante.

## 7. Coloration

Les coupes sont plongées dans un bain d'Hématoxyline pendant quinze secondes puis sont rincées à l'eau courante pendant cinq minutes après ils sont plongés dans l'Eosine pendant trente secondes et finalement sont rincées une deuxième fois à l'eau courante.

## 8. Montage et observation

Une lamelle est fixée à l'aide d'un l'Eukitt sur chaque coupe. Les lames sont séchées et nettoyées par le xylène. Les coupes sont observées et prises en photos par un appareil numérique de type *Canon Power shot A620* adapté à un microscope photonique de type *Zeiss Axiostar plus* (Annexe 9), les photos sont par la suite analysées et discutées afin d'en tirer les conclusions de notre étude.

## 9. Calcul du grossissement final

Le grossissement est calculé en prenant compte du grossissement de l'objectif et de l'indice du microscope selon la formule :

$$Gf = Go \times Im \times Fa$$

Gf = grossissement final ; Go = grossissement de l'objectif ; Im = indice du microscope ; Fa = facteur d'agrandissement de la photo par rapport à la taille du cadrant de la visualisation de l'appareil numérique.

### 1.2.5. Analyse statistiques des résultats

Pour l'évolution de la croissance, le dosage du MDA, de l'activité de la Catalase et des protéines, chaque point expérimental correspond en une série de 4 rats, les données sont analysées par le test de Student ainsi que la comparaison entre les quatre lots. Les différences sont considérées significatives à  $p < 0.05$ . Tous les calculs sont réalisés grâce à un logiciel (XLSTAT).

## Chapitre II : Résultats et discussion

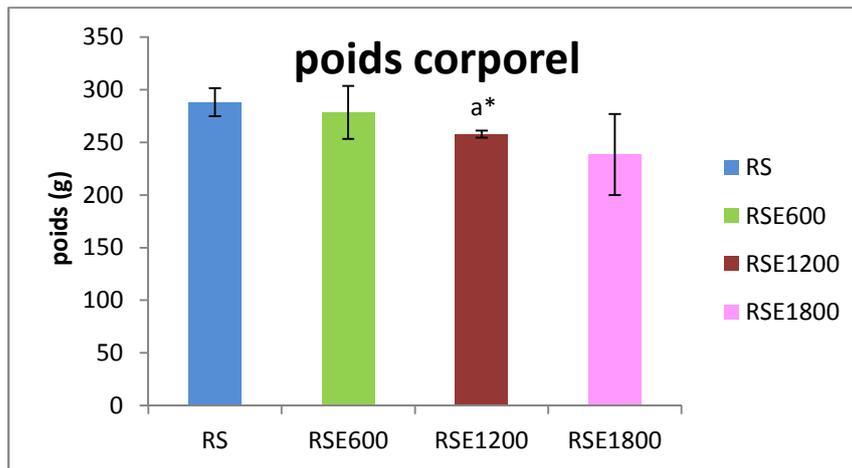
### II.1. Modification physiologique

#### II.1.1. Symptomatologie

Les symptômes classiques d'une carence en acides gras essentiels, telles les lésions de la queue et la perte de poil signalés par Sinclair et Collins (1968), ont été observés chez les rats soumis à un régime alimentaire supplémenté en 1200 et 1800 mg d'  $\alpha$ -T/Kg d'aliment (lots RSE<sub>1200</sub> et RSE<sub>1800</sub>). Lors des huit semaines de traitement, nous avons également obtenus chez les rats des mêmes lots une inappétence et une réduction de la prise alimentaire, les mêmes symptômes ont été observés par Abdo et *al.*, (1986). Nous supposons que cette diminution de la prise alimentaire est due à la dose élevée en  $\alpha$ -T. Signalons que pour les rats du lot RSE<sub>600</sub>, nous n'avons observé aucun de ces symptômes.

#### II.1.2. Effets de la supplémentation en $\alpha$ -T sur la variation de la croissance

Le suivi du poids corporel des différents lots de rats soumis aux différents régimes, a montré une légère baisse non significative de la croissance chez les rats du lot RSE<sub>600</sub> et ceci par rapport aux témoins (lot RS) (Figure. 5), nous supposons qu'à une telle supplémentation en  $\alpha$ -T (600 mg), celle-ci n'a pas affecté le poids corporel. Une étude réalisée en 1995 par Liu et *al.*, a montré des résultats identiques aux nôtres, en effet ces auteurs ont obtenu une légère diminution non significative du poids corporel chez des rats mâles Long Evans soumis pendant 6 semaines à un régime supplémenté avec 500 mg d'  $\alpha$ -T et ceci par rapport au témoin, ils déduisent que la supplémentation de 500 mg d'  $\alpha$ -T n'affecte pas la croissance corporelle.



**Figure 5 :** Effets de la supplémentation de l' -T (600, 1200 et 1800 mg<sup>l</sup>) par Kg d'aliment sur le poids corporel chez des rats en croissance.

Concernant la variation de la croissance des rats du lot RSE<sub>1200</sub>, nous avons obtenu une diminution significative du poids corporel par rapport aux rats témoins (lot RS) et une diminution non significative par rapport aux rats du lot RES<sub>600</sub> (Figure. 5), Ce résultat peut être expliqué par la diminution des prises quotidiennes en aliment, ce qui suggère que l' -T à cette dose (1200 mg/ Kg d'aliment) présente des effets néfastes sur la croissance corporelle du fait de la dégradation importante des lipides et des protéines. Notons que nos résultats corroborent avec ceux de Yang et Desai (1977), qui ont montré que le traitement de rats pendant 6 semaines avec des doses importantes en vitamine E : 1000 et 1200 mg d' -T/kg d'aliment) induisait une baisse significative de la croissance.

Une étude menée par Eder *et al.* (2002), a montré que la croissance n'a pas été affectée chez des rats mâles Sprague-Dawley en croissance nourris avec des régimes supplémentés en 1000 mg d' -T / kg d'aliment sur une période de 8 semaines, nous constatons que nos résultats ne se joignent pas à ceux d'Eder *et al.* (2002). Ainsi que ceux de Kiron *et al.* (2004), qui ont confirmé lors de leur étude qu'aucune différence du poids corporel n'a été obtenue chez des poissons alimentés avec des régimes supplémentés avec 1500 mg -T/kg d'aliment.

Concernant la variation de la croissance du poids corporel du lot RSE<sub>1800</sub>, nous avons obtenu une baisse non significative de la croissance par rapport aux lots : RS, RSE<sub>600</sub> et RSE<sub>1200</sub> (Figure. 5). Nous supposons que la baisse du poids corporel aux doses élevés d' -T (lot RSE<sub>1800</sub>), est due à l'accumulation du radical -Tocophéroxyl aux niveaux des tissus, et que ce radical n'a pu être régénéré suite à l'épuisement des agents réducteurs comme la vitamine C, de ce fait l' -T peut présenter des effets pro-oxydants comme à été décrit par

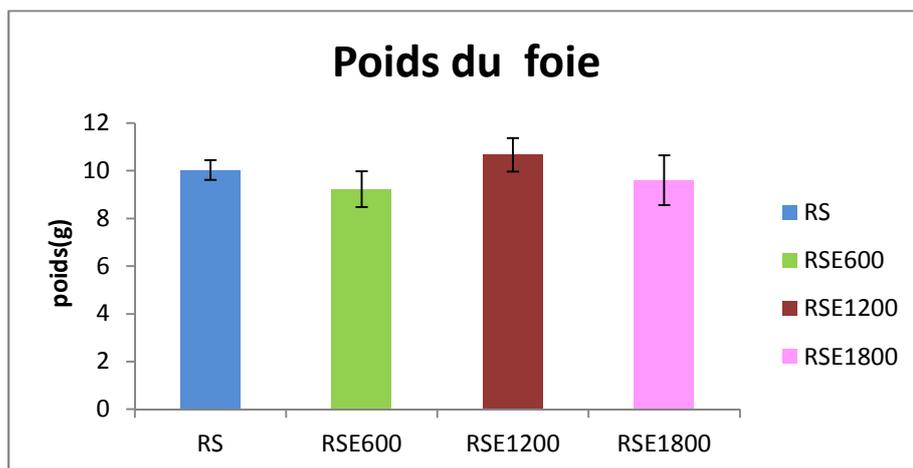
certain auteurs *in vitro* (Bowry et *al.*, 1992) et *in vivo* (Kontush et *al.*, 1996) et dans certaines conditions (selon la dose en  $\alpha$ -T et la durée de traitement).

En effet, Une étude menée par March et *al.*, (1975) a montré que le taux de croissance a été manifestement réduit chez des poussins dont le régime alimentaire est supplémenté en 2000 mg de vitamine E/kg pendant 50 jours.

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

### II.1.3. Effets de la supplémentation en différentes doses d' $\alpha$ -T sur la variation du tissu hépatique

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de la variation du poids du foie, après 8 semaines de traitements avec un régime standard supplémenté en différentes doses d'  $\alpha$ -T (600, 1200 et 1800 mg/Kg d'aliment), ont montré que pour le lot RSE<sub>600</sub> une baisse non significative a été obtenu et ceci par rapport au lot RS (Figure. 6). Nous suggérons que cette baisse est due à une perte de poids.



**Figure 6 :** Effets de la supplémentation de l'  $\alpha$ -T (600, 1200, 1800mg/Kg d'aliment) sur le poids du foie chez des rats en croissance.

Une étude réalisée en 2010 par Nascimento et *al.*, avait pour objectif l'effet d'une dose pharmacologique d'  $\alpha$ -T sur le tissu cardiaque de rats Wistar adultes. Cette étude a

montrée que l'administration d'une quantité de 250 mg/Kg de rat/jour d' -T sur une période de 7 semaines induisait la diminution du poids du tissu hépatique comparé à celui du témoin.

La variation du poids du tissu hépatique des rats du lot RSE<sub>1200</sub>, ont montré une augmentation non significative à ceux des lots RS et RSE<sub>600</sub> (Figure. 6), nous supposons que cette augmentation est due au développement du tissu hépatique. En 1983, Wheldon et *al.*, quand à eux ont obtenu une augmentation du poids du foie de rats mâles soumis à un régime alimentaire supplémenté en 1000 mg d' -acétate de tocophéryl /kg de poids corporel / jour.

Enfin, les rats du lot RSE<sub>1800</sub> montrent une baisse non significative par rapport aux lots RSE<sub>1200</sub> et RS, et une augmentation non significative (Figure. 6) par rapport au lot RSE<sub>600</sub>.

Par contre Abdo et *al.* (1986), ont observés une hypertrophie du foie chez des rats mâles nourris avec un régime supplémenté en 2000 mg d' -T/ kg d'aliment, indiqué par une augmentation significative du poids du foie, mais aucune modification histopathologique n'a été observée.

## **II.2. Effet de la supplémentation en -T sur quelques paramètres du stress oxydant**

### **II.2.1. Effets des différents régimes sur les paramètres biochimiques (le taux en MDA, la teneur en protéines, l'activité de la CAT) et sur l'histologie du tissu hépatique**

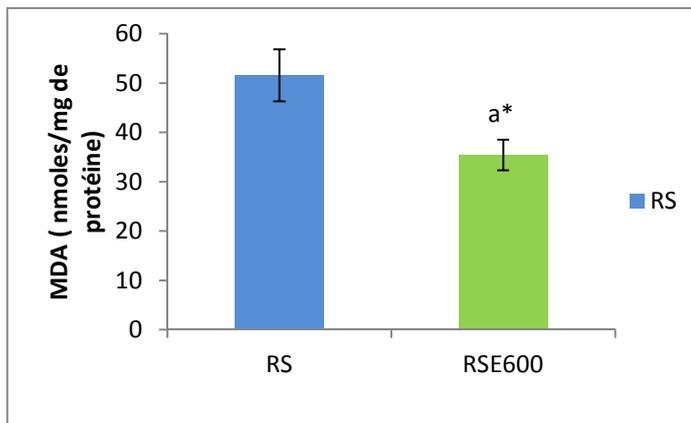
Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à l'effet de la supplémentation de doses croissantes en -T (600, 1200 et 1800 mg/kg d'aliment) sur quelques paramètres biochimique du stress oxydatif (CAT, teneur en protéines et MDA) ainsi que sur l'histologie du tissu hépatique de rats Wistar en croissance.

#### **II.2.1.1. Effets de la supplémentation de 600 mg d' -T/kg d'aliment sur le taux en MDA, la teneur en protéines et l'activité de la CAT du tissu hépatique**

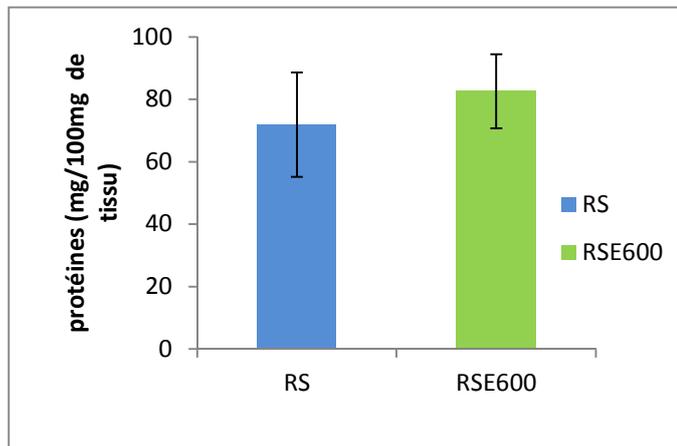
Les effets de la supplémentation d'un régime standard (RS) en 600 mg/ Kg d'aliment (lot RSE<sub>600</sub>) sur quelques paramètres dosés lors du stress oxydant, à savoir, le taux en MDA, la teneur en protéines et la CAT, ont montré une baisse significative du taux en MDA par rapport au lot RS (Figure. 7. a). Il faut noter que le MDA est un produit de peroxydation des acides gras polyinsaturés, cette baisse est due à la supplémentation du régime en une dose adéquate en -T (600 mg) et qui a eu pour effet un scavengers, protégeant ainsi le foie contre les attaques des radicaux libres. Concernant la teneur en protéines et l'activité enzymatique de

la CAT du lot RSE<sub>600</sub> par rapport au lot témoin (RS), nous avons obtenu une augmentation non significative de ces deux paramètres biochimiques (Figure. 7. b et c), il est vrai que la vitamine E protège *in vivo* les structures sensibles à l'oxydation: les lipides dans les membranes et les lipoprotéines, les protéines et les bases nucléotidiques des brins d'ADN. Les fonctions anti-oxydantes de la vitamine E permettent d'éviter l'oxydation des structures auxquelles se trouvent associées et de protéger ainsi non seulement le caractère essentiel des AGPI, mais aussi l'intégrité de la structure des protéines et des nucléotides (Léger, 1992).

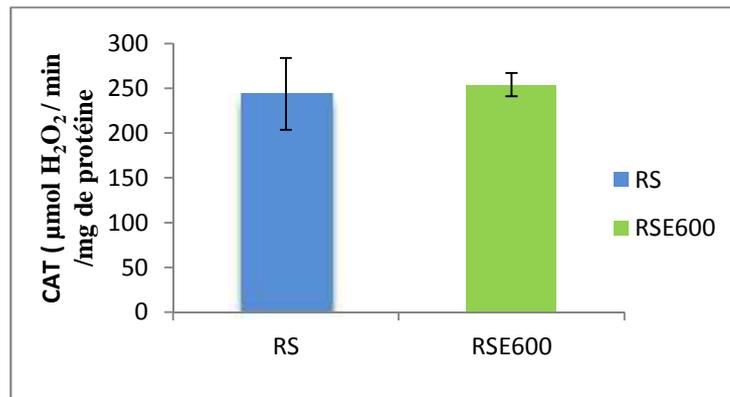
a.



b.



c.



**Figure 7. (a à c) :** Effet de la supplémentation en 600 mg d'  $\alpha$ -T/kg d'aliment: RS<sub>600</sub>, sur le taux en MDA la teneur en protéine, et l'activité de la CAT du tissu hépatique chez les rats en croissance par rapport au lot RS.

Une étude menée par Csallany et *al.*, (1977) montre l'effet protecteur de la vitamine E lors d'un stress oxydatif, ils ont observé qu'après 8 semaines de régime carencé en vitamine E, le taux en lipofuscine hépatique est significativement plus élevé chez le lot témoin que chez les lots supplémentés en vitamine E, ils ont déduit que cette vitamine a un rôle protecteur vis-à-vis des radicaux libres. De nombreuses recherches se sont succédées après celle de Csallany et *al.*, (1977), prouvant à chaque fois que la vitamine E a un effet protecteur contre les radicaux libres; c'est ainsi que l'étude réalisée par Wagner en 1996 a montré *in vivo* qu'en présence d'un stress oxydatif puissant, le taux d'oxydation de lipide cellulaire a été ralenti par la vitamine E.

En 2008, Hajiani et *al.* ont obtenu un effet anti-oxydant de la vitamine E après administration à faibles doses, et ont déduit qu'elle pouvait permettre l'augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes (CAT, SOD et GPx).

L'ensemble des études citées viennent corroborer nos résultats, en effet dans la présente étude nous avons observé une augmentation non significative de la CAT parallèlement à une diminution significative du taux en MDA. La teneur en  $\alpha$ -T est de 600 mg/kg d'aliments pour le lot RSE<sub>600</sub>, cette valeur est excédentaire par rapport au minimum conseillé qui est de 50 à 60 mg/ kg d'aliments pour le rat (Oarada et *al.*, 1988). Selon Bowry et Stocker (1993), la vitamine E doit son effet biologique à sa fonction comme antioxydant

liposoluble, prenant en charge la majorité des radicaux libres. L'  $\alpha$ -T est biologiquement et chimiquement la forme la plus active de la vitamine E.

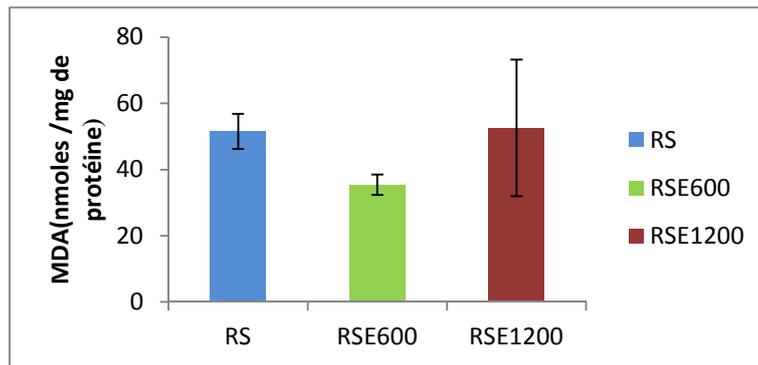
La vitamine E joue un rôle important dans la détoxification des LPO, l'  $\alpha$ -T protège les acides gras polyéthyléniques membranaires, son action s'effectue en phase lipidique. Cette vitamine E, après avoir piégé les radicaux libres, doit être régénérée. En effet, étant donné que les autres systèmes de protection contre les radicaux libres se situent dans divers compartiments cellulaires, notamment le cytosol, les interactions entre les phases lipidiques et liquides sont probablement plus élaborées, sont principalement impliquée la vitamine C, le glutathion ainsi que la GPx, la CAT, les SOD et d'autres enzymes (Bourre, 1996).

Enfin, Bowry et *al.* (1995) ont montré que pour prévenir l'oxydation des lipoprotéines *in vivo*, il est essentiel que l'ensemble des radicaux tocophéroxyl soient réduits par des composants qui les rendront incapables de poursuivre la chaîne de peroxydation. Dans des conditions normales ceci semblerait être réalisé par deux antioxydants, c'est-à-dire la vitamine C (dans le plasma) et CoQ10H<sub>2</sub> (dans LDL), qui empêchent l'oxydation de LDL et ceci par deux mécanismes tout à fait distincts.

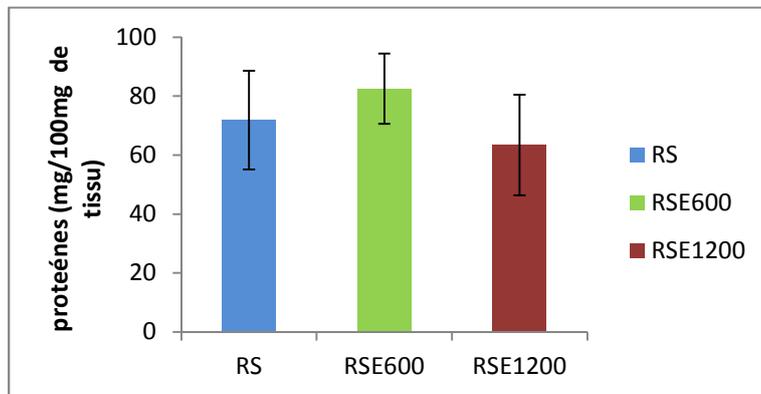
#### **II.2.1.2. Effets de la supplémentation de 1200 mg d' $\alpha$ -T/kg d'aliment sur le taux en MDA, l'activité de la catalase et la teneur en protéines du tissu hépatique**

Les rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec 1200 mg d'  $\alpha$ -T/kg d'aliment (RSE<sub>1200</sub>), montrent une augmentation non significative du taux en MDA (Figure. 8. a), en 2009, Sendure et *al.*, définissent le MDA, comme étant l'un des indicateurs de la peroxydation lipidique le plus fréquemment utilisé, le MDA est connu pour être un biomarqueur potentiel du stress oxydatif. Par contre, la teneur en protéines et l'activité anti-oxydante de la CAT (Figure. 8. b et c) du lot RSE<sub>1200</sub> ont baissées d'une manière non significative par rapport à ceux des lots RS et RSE<sub>600</sub>. L'ensemble de ces résultats suggèrent un effet pro-oxydatif de l'  $\alpha$ -T à 1200 mg/kg d'aliment; de nombreuses études réalisées *in vitro* ont montré qu'une supplémentation élevée en  $\alpha$ -T a une activité pro-oxydative, mais très peu d'études ont examiné cet effet *in vivo* d'où l'intérêt de la présente étude qui a été entreprise pour examiner le potentiel pro-oxydant de doses élevées de vitamine E au niveau du foie chez le rat en croissance.

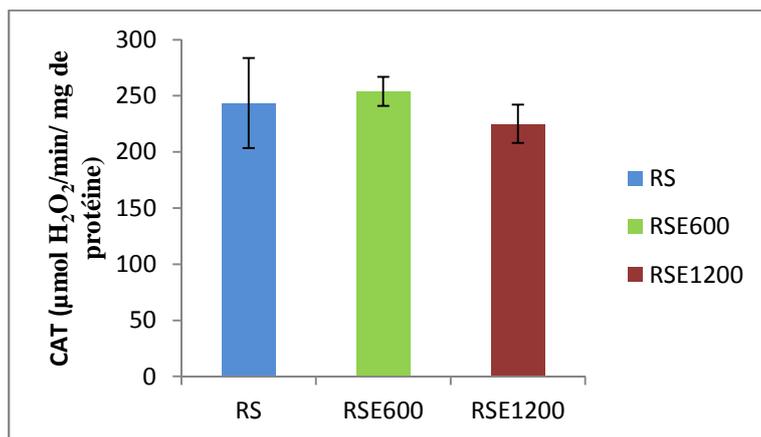
a.



b.



c.



**Figure 8. (a à c) :** Effet de la supplémentation en 1200 mg d' -T/kg d'aliment: RS<sub>1200</sub>, sur le taux en MDA, la teneur en protéine et l'activité de la CAT du tissu hépatique chez les rats en croissance par rapport aux lots: RS, RSE<sub>600</sub>.

En 2008, Hajiani et *al.* avaient réalisé une étude qui avait pour objectif d'examiner l'effet pro-oxydant de la vitamine E face à son effet antioxydant et ceci en fonction de la durée de traitement et de la dose en vitamine E. Ces auteurs ont traité des rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley par administration intramusculaire bihebdomadaire de 100, 300 et 600 mg / kg de vitamine E sur des périodes de 2, 4 et 6 semaines. Ils ont observé que la vitamine E a un effet antioxydant quand elle est administrée à de faibles doses et sur des périodes courtes et permet l'augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes. 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 anti-oxydantes à savoir la SOD, la GPx et la CAT.

Ils émettent l'hypothèse que la vitamine E régule les enzymes anti-oxydantes par un effet chimique direct. Ces auteurs expliquent cette régulation de la même manière que Buettner (1993), expliqua l'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 anti-oxydantes, d'autre part, résident dans la phase aqueuse de la cellule. L'interaction prouvée *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' -T au niveau de l'interface membrane-eau et 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 anti-oxydantes.

Nos résultats se joignent à ceux d'Eder et *al.* (2002) qui ont étudié l'effet de la supplémentation de l' -T chez des rats (100, 1000, 10000 d' -T/ Kg d'aliment) pendant 8 semaines. Ils ont obtenu à une dose de 1000 mg d' -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 anti-oxydantes. De même Blasiak et *al.* (2002), ont obtenu une augmentation des dommages au niveau de l'ADN de cultures cellulaires, attribués à l' -T, suite à des agressions générant des ROS.

En 2003, Favier a expliqué la diminution de la teneur en protéine par le faite de leur sensibilité aux attaques radicalaires, surtout celles qui comportent le groupement sulfhydryde (SH), c'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors subir des réticulation par formation des ponts bi-tyrosine détectables par fluorescence, soit subir des

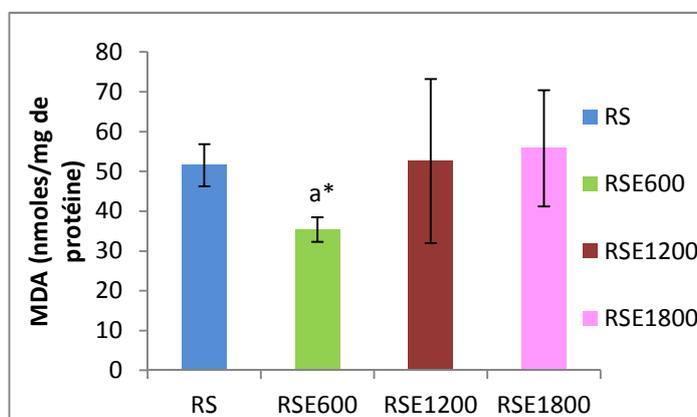
coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agression modérée. Selon Ponkory (2003), les protéines réagissent avec les radicaux libres lipidiques pour former des molécules protéiques radicalaires qui peuvent à leur tour interagir pour générer soit des lipoprotéines soit des oligomères protéiques, principalement sous forme de dimère mais également à des degrés de polymérisation très élevés. Durant la dimérisation la solubilité et la biodisponibilité des protéines diminuent.

Dans notre cas, nous avons obtenu un effet pro-oxydant de l' -T, démontré par la baisse de l'activité anti-oxydante de la CAT mais également par l'élévation du taux en MDA. Nos résultats confirment l'existence d'un stress oxydatif modéré chez les rats du lot RSE<sub>1200</sub>.

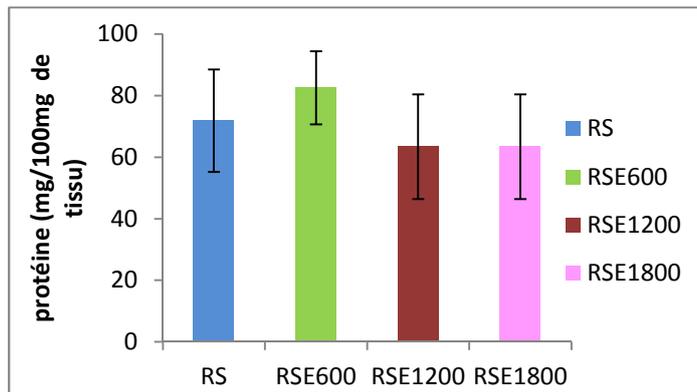
### II.2.1.3. Effets de la supplémentation de 1800 mg d' -T/kg d'aliment sur le taux en MDA, l'activité de la catalase et la teneur en protéines du tissu hépatique

Le lot de rats nourri avec un régime standard et supplémenté en 1800 mg d' -T/Kg d'aliment (lot RSE<sub>1800</sub>), présente des variations du taux en MDA, de la teneur en protéines et de l'activité antioxydante de la CAT par rapport aux lots : RS, RSE<sub>600</sub> et RSE<sub>1200</sub>. Il est vrai que (08) huit semaines de traitement, nous ont permis d'obtenir une augmentation non significative du taux en MDA (Fig. 9. a), nous supposons que cette augmentation est due à la supplémentation du régime en une dose importante en -T (1800 mg), celle-ci a eu un effet pro-oxydant du fait que l'augmentation du taux en MDA était accompagnée d'une diminution non significative de la teneur en protéines et de l'activité anti-oxydante de la CAT (Fig. 9. b et c). Ponkory, (2003), a énoncé que les protéines pouvaient être attaquées par les radicaux libres, même à des concentrations élevées en anti-oxydants.

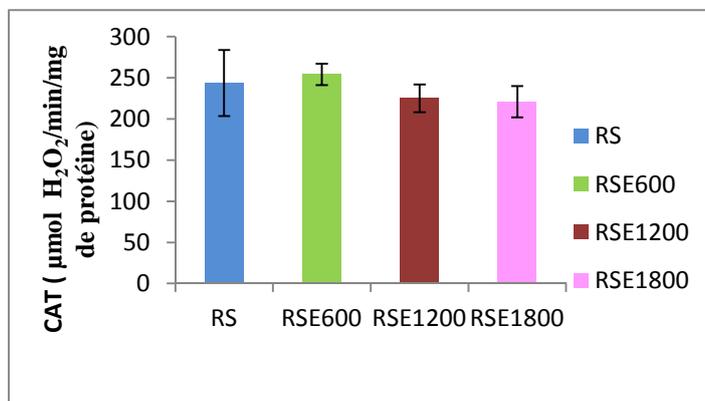
a.



b.



c.



**Figure 9. (a à c) :** Effet de la supplémentation en 1800 mg d'  $\alpha$ -T/kg d'aliment: RS<sub>1800</sub>, sur le teneur en MDA, la teneur en protéine, et l'activité de la CAT du tissu hépatique chez les rats en croissance par rapport aux lots: RS, RSE<sub>600</sub>, RSE<sub>1200</sub>.

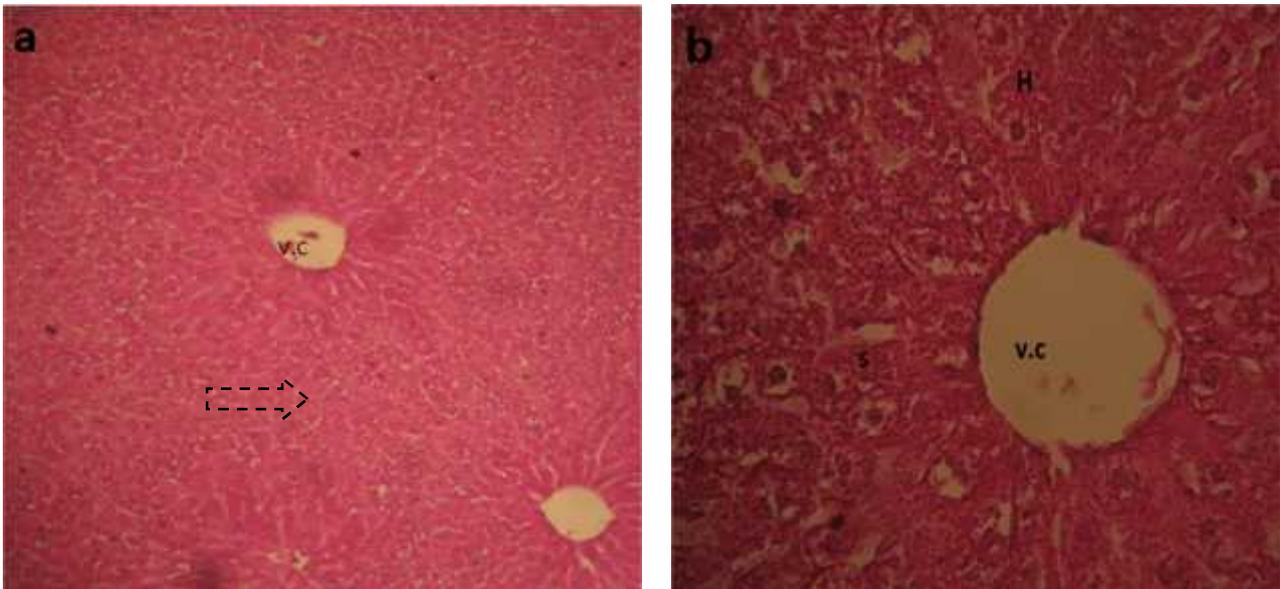
Il faut noter que le MDA est un marqueur de la lipoperoxydation, c'est un produit de décomposition oxydative de lipides insaturés, comme la formation de produits secondaires lors du métabolisme de l'acide arachidonique (Sendure et *al.*, 2009). L'excès de MDA produit dans un tissu peut se combiner aux groupements aminés libres des protéines (essentiellement les résidus lysines), conduisant à la formation de produits d'addition susceptibles d'altérer les propriétés biologiques des protéines concernées. En outre, les protéines modifiées par le MDA sont immunogènes et peuvent conduire à la formation d'anticorps dirigés en particulier contre les résidus lysines modifiés par le MDA, comme il en a déjà été détecté chez l'Homme, notamment en association avec les maladies cardiovasculaires (Cillard et Cillard, 2006 ; Michel et *al.*, 2008).

En 2008, Duranteau, déduit qu'un stress oxydant important et prolongé peut mener à un déséquilibre de la balance entre la production d'ERO ou d'ERN et les défenses anti-oxydantes de l'organisme.

En finalité, les résultats obtenus concernant le lot RSE<sub>600</sub> confirment l'existence d'un stress oxydant modéré qui est traduit par l'effet pro-oxydant d'une telle dose d' -T. En effet en 1996, Kontush et *al.*, ont montrés que dans les états d'oxydation modérées et en l'absence d'autres co-antioxydants tels que l'ascorbate, l' -T se comportait comme un pro-oxydant en favorisant le taux de peroxydation des lipides dans le plasma humain et l'oxydation des LDL *in vitro*. Ils ont postulé que dans les circonstances mentionnées ci-dessus, le radical -T ne pouvait pas former des composés stables en se combinant avec un autre radical libre ou en faisant don d'un électron libre à un autre antioxydant. Par conséquent, elle interagit avec d'autres macromolécules telles que des lipides, ce qui génère plus de radicaux libres.

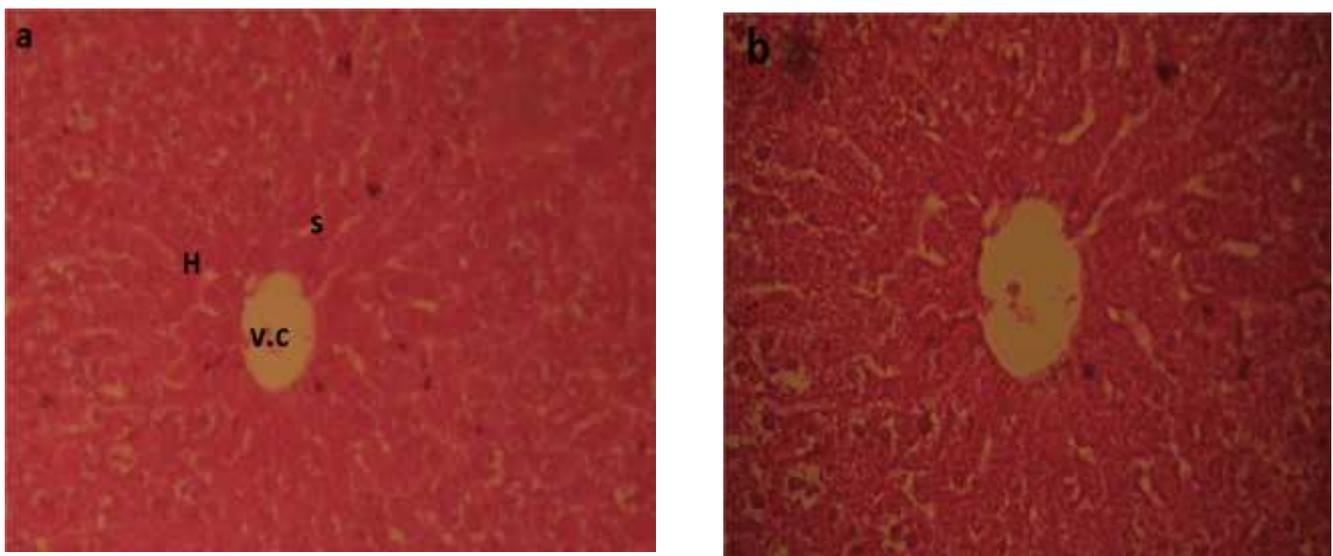
Nos résultats confirment l'existence d'un stress oxydant important chez les rats du lot RSE<sub>1800</sub>. Ce stress est probablement dû à un excès en -T (1800mg).

#### II.2.1.4. Effets de la supplémentation en $\alpha$ -T aux taux de 600,1200 et 1800 mg/kg d'aliment sur le tissu hépatique chez les rats en croissance



**Figure 10 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a : 10x, b : 40x, *H&E*) montrant une architecture normale chez lot RS (V.C veine centro-lobulaire S :sinusoïde, H hépatocyte,  $\dashrightarrow$  Espace porte ).

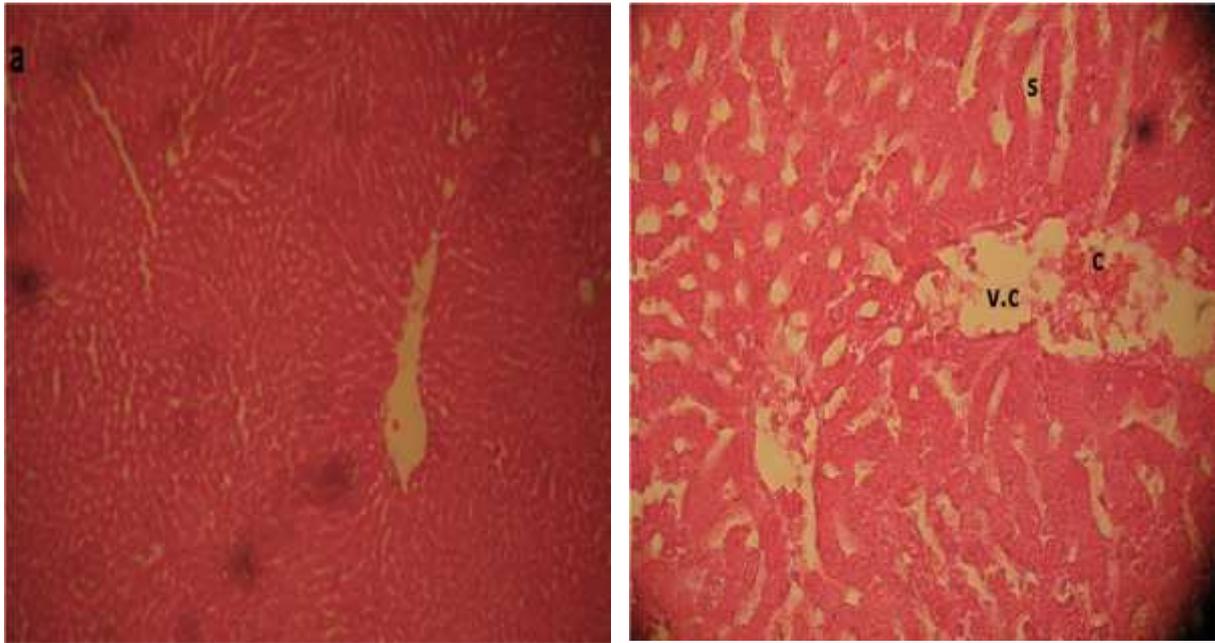
Les coupes histologiques du lot RS (Figure 10) ont montré une architecture hépatique normale : plaque d'hépatocytes disposée radialement, sinusoides convergent vers la veine centrale.



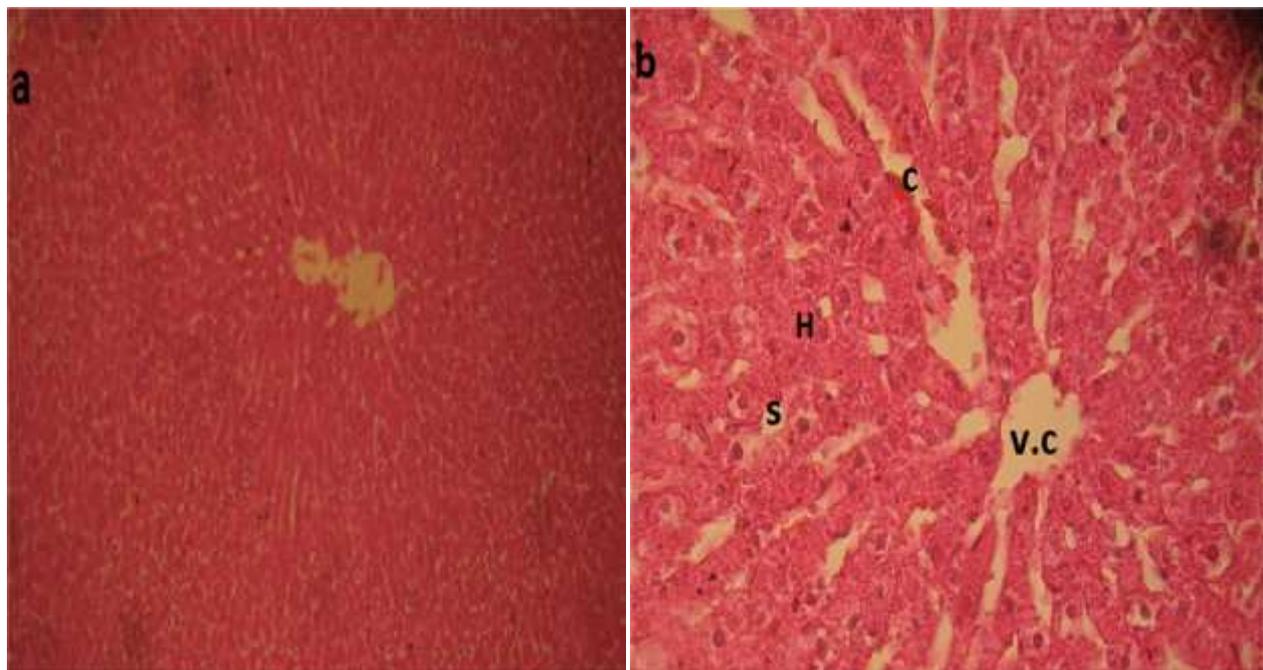
**Figure 11 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a :10x, b :40x , *H&E*) montrant une architecture normale chez le lot RSE<sub>600</sub> (V.C veine centro-lobulaire, S :sinusoïde, H hépatocyte ).

Les coupes histologiques du lot RSE<sub>600</sub> (figure 11), montrent également une architecture bien conservée des cellules hépatiques avec des micro-vacuoles rares dans le cytoplasme des hépatocytes de la zone médiane. Il a été montré dans ce cas que 600 mg d' -T incorporés dans 1 kg de régime a protégé les rats contre les effets délétères des radicaux libres. En effet, selon Sridevi et *al.* (2007), la fonction principale de l' -T est de prévenir la peroxydation des phospholipides membranaires et des dommages membranaires via l'activité antioxydante. Ainsi, l'activité antioxydante de la vitamine E a la capacité d'éviter l'apparition de maladies chroniques, particulièrement celles causées par un composant du stress oxydatif : comme les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose et le cancer (Stampfer et *al.*, 1993; Nwanguma et *al.*, 1998).

En 2014, une étude a été réalisée portant sur l'effet de la supplémentation en -T d'un régime équilibré sur l'histologie du tissu hépatique. Nos résultats corroborent avec qui à été réalisé par Araound et *al.*, celle-ci a été réalisé sur un groupe de rats males à qui ont administrés de l' -T dissous dans de l'huile de maïs à une dose de 200mg / Kg du rat / jour , les résultats ont montré aucune modification histologique du foie avec un arrangement normal des hépatocytes.



**Figure 12 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a : 10x, b :40x , H&E) montrant une désorganisation de l'architecture des composants du foie de rats soumis à 1200 mg d' -T: lot RSE1200 (V.C: veine centro-lobulaire, S :sinusoïde, H : hépatocyte C :congestion).



**Figure 13 (a et b) :** Micrographie du foie de rat (a: 10x, b: 40x ; H&E) montrant une désorganisation de l'architecture des composants du foie de rats soumis à 1800mg d' -T: lot RSE<sub>1800</sub> (V.C: veine centro-lobulaire, S :sinusoïde, H : hépatocyte ,C :congestion).

Concernant les coupes histologiques du lot RSE<sub>1200</sub> (Figure 12), nous avons observé un début de la congestion de la veine centro-lobulaire et un élargissement de l'espace sinusoïdale, par contre le lot RSE<sub>1800</sub> (Figure 13), quand à lui montre une congestion de la veine centro-lobulaire et également un élargissement de l'espace sinusoïdale, ces observations montrent l'effet néfaste de telles supplémentsations. Cet effet a été obtenu en 2010, par Nascimento et *al.*, ces auteurs ont réalisé une étude qui avait pour objectif l'effet d'une dose pharmacologique d' -T sur le tissu cardiaque de rats Wistar adultes. Des groupes expérimentaux de rats ont été constitués, et à qui on administré une quantité d' -T variant de 87.5 à 1000 mg/rat/jour et ceci sur une période de 7 semaines. Les coupes histologiques ont montré aucun changement pathologique chez le lot témoin par contre pour ceux supplémenté en en doses élevées en -T, des dommages cellulaires importants sont apparents et montrant une désorganisation morphologique des myocytes ainsi que la présence d'œdèmes. Ces auteurs déduisent que de telles doses d' -T induisent une cardiotoxicité chez les rats wistar sains traduite par des changements au niveau du tissu cardiaque accompagnés de nécrose des cardiomyocytes. Ils rapportent également que les effets néfastes obtenus dans cette étude sont dues à des doses non physiologiques d' -T.

La fonction anti-oxydante de la vitamine E dépend de plusieurs facteurs, à savoir les conditions de stress (modérées ou sévères) et la présence de co-antioxydants. Il est connu que l'augmentation de la concentration en -T aboutit à l'augmentation de radicaux -tocopheroxyl, qui peuvent amorcer la cascade de peroxydation des lipides (Upston et *al.*, 1999). Quand le système anti-oxydant est équilibré, cette action pro-oxydante de l' -tocopheroxyl est inhibée par les co-antioxydants. Cependant, les concentrations élevées d' -T surproduisent des radicaux -tocopheroxyl, qui ne peuvent plus être efficacement désintoxiqués par les co-antioxydants (Stocker, 1999).

Citons une étude récente réalisée par Dahdouh et *al.* (2014), dont les résultats ne corroborent pas aux nôtres, ces auteurs n'ont trouvé aucun changement à l'échelle tissulaire de foie de souris âgées de 60 jours traité avec un régime équilibré et supplémenté en 1 g d' -T /Kg de régime.

# Conclusion

## CONCLUSION :

Dans cette présente étude, notre travail consiste à mettre en évidence l'impact de la supplémentation de différentes doses d'  $\alpha$ -T (600, 1200 et 1800 mg/kg d'aliment) sur l'activité d'une enzyme impliquée dans la protection contre la peroxydation lipidique (catalase), sur la teneur en protéines et le taux en malondialdéhyde, ainsi que sur l'histologie du tissu hépatique chez le rat mâle en croissance.

Au terme de cette étude, l'analyse de l'ensemble des résultats montre que :

**Sur le plan de la croissance :** une baisse non significative de la croissance des rats a été observée après administration de 600 mg d'  $\alpha$ -T/kg d'aliment (lot RSE<sub>600</sub>), ceci peut être expliqué par le fait que l'  $\alpha$ -T exerce un effet protecteur vis à vis des radicaux libres et qu'une dose de 600mg n'affecte pas la croissance corporelle. Concernant le lot RSE<sub>1200</sub>, nous avons obtenu une diminution significative du poids corporel par rapport au lot RS et non significative par rapport au lot RSE<sub>600</sub>. Les résultats obtenus après administration de 1200 mg d'  $\alpha$ -T/kg d'aliment chez les rats du lot RSE<sub>1200</sub> peuvent être expliqués par la diminution des prises journalières en aliment, ce qui suggère que l'  $\alpha$ -T à cette dose présente des effets néfastes sur la croissance corporelle du fait de la dégradation importante des lipides et des protéines (Yang et Desai, 1977). Pour le lot RSE<sub>1800</sub>, nous avons également obtenu une baisse non significative du poids corporel des rats par rapport aux lots : RS, RSE<sub>600</sub>, et RSE<sub>1200</sub>, ceci est due à l'accumulation du radical  $\alpha$ -Tocophéroxyl aux niveaux des tissus, et que ce radical n'a pu être régénéré suite à l'épuisement des agents réducteurs comme la vitamine C, de ce fait l'  $\alpha$ -T peut présenter des effets pro-oxydants.

**Sur le plan métabolique :** les résultats montrent une diminution non significative du taux en MDA chez le lot RSE<sub>600</sub>, parallèlement à une augmentation de la teneur en protéine et de l'activité enzymatique anti-oxydante de la CAT par rapport au lot témoin (RS). Ceci est dû à la supplémentation du régime en une dose adéquate en  $\alpha$ -T (600 mg) démontrant la stabilisation du stress au niveau du foie et qui a eu pour effet un rôle antioxydant, protégeant ainsi le foie contre les attaques des radicaux libres.

Il est à noter que les résultats obtenus lors de la supplémentation de 1200 mg d'  $\alpha$ -T/kg d'aliment montrent une augmentation non significative du taux en MDA accompagnée d'une diminution non significative de la teneur en protéine et de l'activité enzymatique anti-

oxydante de la CAT par rapport aux lots : RS et RSE<sub>600</sub>. L'ensemble de ces résultats suggèrent un effet pro-oxydatif de l' -T à 1200 mg/kg d'aliment; de nombreuses études réalisées *in vivo* et *in vitro* ont montré qu'une supplémentation élevée en -T a une activité pro-oxydative (Bowry et *al.*, 1993 ; Kontush, 1996).

D'autre part, nous avons obtenu chez le lot RSE<sub>1800</sub> une augmentation significative du taux en MDA et une diminution non significative de la teneur en protéine et de la CAT par rapport aux lots : RS, RSE<sub>600</sub> et RSE<sub>1200</sub>. Une dose importante d' -T (1800mg) augmente la teneur en MDA et diminue l'activité des enzymes antioxydantes, celle-ci a eu un effet pro-oxydant. Il est connu que lors de l'oxydation l' -T est transformé en radical tocophéroxyl, si ce dernier n'est pas éliminé, il y a augmentation des LPO, processus connu sous le nom de « tocophérol médiateur de peroxydation ».

**Sur le plan histologique :** Pour les coupes histologiques du lot RSE<sub>600</sub>, nous avons observé une architecture bien conservée des cellules hépatiques avec des micro-vacuoles rares dans le cytoplasme des hépatocytes de la zone médiane. Il a été montré dans ce cas que 600 mg d' -T incorporés dans 1 kg de régime a protégé les rats contre les effets délétères des radicaux libres.

Par contre les coupes histologiques des lot RSE<sub>1200</sub> et le lot RSE<sub>1800</sub> ont montré une désorganisation de l'architecture hépatique normale avec une apparition de la congestion de la veine centro-lobulaire et un élargissement des espaces sinusoïdales, ces observations montrent l'effet néfaste de telles supplémentations.

A l'issu de ce travail plusieurs orientations d'études peuvent être envisagées :

- De constituer plusieurs lots à doses croissantes d' -T (entre 600 et 1200 mg) afin de déterminer la dose précise ou l'effet anti-oxydant de l' -T devient pro-oxydant,
- De doser d'autres paramètres de la balance anti-oxydante/pro-oxydante,
- Il serait également intéressant d'étudier l'effet pro-oxydant de l' -T au niveau d'autres organes.
- D'étudier l'effet pro-oxydant de l' -T sur les fonctions des organes.

# **Références Bibliographiques**

**Abdo, K. M., Rao, G. C., Dinowitz, M., Kanagalingam, K. (1986).** L'étude de toxicité de l'acétate de tocophérol (vitamine E) pendant treize semaines sur 344 rats. Vol. 24, n°10, pp. 1043-1050.

**Aebi, H. (1974).** Les méthodes d'analyses enzymatiques pp. 673-684.

**Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Khaled, L., Najjar, M.N., Kenzani, A., Houas, Z. (2014).** Effets toxiques de méthamidophos sur l'activité reinale et hépatique de rat, et d'améliorer les effets de l'alpha-Tocopherol, n°31, pp. 842-854.

**Basset, C. L., Fuhr, P., Monsch, A., Baronti, F., Burkhard, P. (2007).** Définition et diagnostic de la démence de la maladie de parkinson : Recommandation du groupe Suisse d'Etude de la démence de la maladie de parkinson. Vol. 158, n°4, pp. 166-177.

**Bentinger, M., Tekle, M., Dallner, G. (2010).** Coenzyme Q « Biosynthèse et fonctions », Vol.34, pp.74-79.

**Bourre, J. M. (1996).** Développement du cerveau et acides gras polyinsaturés. Vol.3, pp.173-178.

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

**Bowry, V. W., Igold, S., Stocker, R. (1992).** La vitamine E dans une lipoprotéine de basse densité humaine. Quand et comment cet antioxydant devient un prooxydant. Vol.288, pp.341 – 344.

**Bowry, V. W., Stocker R. (1993).** L'effet pro-oxydant de la vitamine E sur l'oxydation amorcée par des radicaux de faible densité humaine Lipoprotein. Vol.115, pp. 6029-6044.

**Bowry, V. W., Mohr, D., Cleary, J., Stocker, R. (1995).** Prévention de la peroxydation tocophérol médiée en lipoprotéines de faible densité humaine ubiquinol, Vol.270, pp. 5756 – 5763.

**Bray, R. C., Cockle, S. A., Fielden, E. M., Roberts, P. B., Rotilio, G., Calabrese, L. (1974).** Réduction et inactivation du superoxyde dismutase par le peroxide d'hydrogène. Vol.139, pp. 43–48.

**Brigelius-Flohe, R., Traber., M. G. (1999).** "Vitamine E: fonction et métabolisme." .Vol.10, pp. 1145-1155.

**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.

**Cillard, J., Cillard P. (2006).** Mécanisme de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations, n°13, pp.24-29.

**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.

**Dahdouh, F., Djabar, M. R., Kechrid, Z. (2014).** Les vitamines C et E Combinaison potentiellement Empêchant le stress oxydatif, pp. 938-946.

- Delattre, J. J., Beaudoux, D., Bonnefont, R. (2005).** "Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques, pp. 87-108.
- Delattre, J. J., Beaudoux, D., Bonnefont, R. (2007).** Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques.
- Deneke, S. M., Krinsky N. I. (1982).** Interaction de l'oxygène avec les caroténoïdes. Vol. 69, pp.205-210. Evaluation comparative de l'acide thiobarbiturique pour la détermination du malondialdéhyde en matériaux biologiques. Vol.15, pp.353-363.
- Duranteau, J. (2008).** Conséquences cliniques du stress oxydant. Masson Elsevier, série 3, pp.5-6.
- Eder, K., Flader, D., Hirche, F., Brandsch, C. (2002).** L'excès alimentaire en vitamine E diminue l'activité antioxydante des enzymes dans les érythrocytes des Rats, n°132, pp. 3400–3404.
- El Atyqy, M. (2007).** Chimie alimentaire/Mozilla Firefox : [www.azaquar.com](http://www.azaquar.com).
- Evans Pet, B., Halliwell. (1999).** Les radicaux libres et audition : Causes, conséquences , et les critères, Vol.884, pp.19-40.
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant : «intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique ». L'actualité chimique , p 17 : 501-512.
- Fu, J., Zhang, Hang, W., Mai, K., Feng, X., Xu, W., Liu fu, Z., Ma, M., Ai, A. (2007).** Effets de la vitamine E sur l'activité des enzymes antioxydantes et des compositions d'acides gras.Vol.26, pp.809–814.
- Fujii, J., Taniguchi, N. (1999).** La régulation négative des superoxyde dismutases et la glutathion peroxydase par des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Vol. 31, pp. 301–308.
- Fridovich. (1997).** Anion radical superoxyde, superoxide dismutases.Vol. 272, pp. 18515–18517.
- Gabe, M. (1968).** Techniques histologiques. Paris: Masson, pp.1113.
- Garrido-Polonio, C., Garcia-Linares, M. C., Garcia- Arias, M. T., Lopez-Varela, S., Garcia-Fernandez, M. C., Terpstra, A.H. M., Sanchez-Muniz, F. J. (2004).** Huile oxydée de tournesol augmente le foie et le sérum et modifie la composition des lipoprotéines chez les rats. Vol. 92, pp.257 – 265.
- Graille, J., (2003).** Lipides et corps gras alimentaire. Paris : pp. 1-55.
- Halliwell, B., Gutteridge J. M. (1990).** "Role des radicaux libres et les ions catalytiques chez l'humain. Vol. 186, pp. 1-85.
- Hajiani, M., Golestani, A., Sharifabrizi, A., Rastegar, R., Payabvash, S., Salmasi, A. H., Dehpour, A. R., Pasalar, P. (2008).** La modulation dépendante de la dose systémique de la peroxydation des lipides et l'activité des enzymes anti-oxydantes de la vitamine E chez le rat. Vol. 13, pp. 60 – 66.

**Hennebelle, T. (2006).** "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." *Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat*, pp.303.

**Hochstein, P., Sevanian, A. (1968).** Mécanismes et conséquences de la peroxydation des lipides en système biologique, pp. 376.

**Ingold, K. U., Bowry, V. W., Stocker, R., Walling, C. (1993).** Sciences médicales auto-oxydation des lipides et anti-oxydation par l' $\alpha$ -tocophérol et de l'ubiquinol en solution homogène et dans des dispersions aqueuses de lipides : conséquences non reconnues de la taille des particules de lipide comme cité en exemple par oxydation de lipoprotéines de basse densité humaine (athérosclérose/ascorbate/superoxyde/protéine thiols). Vol. 90, pp 45-49.

**Jadot, G. (1981).** Le rat de laboratoire. Réactifs biologie. Paris : Masson, pp.115.

**Khelil, S., Ferchichia, S., Gammoudia, I., Jaidanea, Z., Chaheda, H., Dandanaa, A., Noichria, Y., Chalghouma, A., Ernezb, S., Jeridib, J., Mileda, A. (2010).** Hyperhomocystéinémie et stress oxydant chez les insuffisances cardiaques. Immuno-analyse et biologie spécialisée. Vol. 25, pp.191-196.

**Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S., Watanabe, T. (2004).** Le statut antioxydant et les réponses immunitaires non spécifiques à la truite arc ( *Oncorhynchus mykiss* ) nourris deux niveaux de vitamine E ainsi que trois sources de lipides. Vol. 234, pp. 361 – 379.

**Kontush, A., Finckh, B., Karten, B., Kohlschu, A., Beisiegel, U. (1996).** Activité pro-oxydante et anti-oxydante de l' $\alpha$ -tocophérol en plasma humain et LDL isolé. Vol. 37, pp. 1436 – 1448.

**Laguerre, L., Lopez-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps Gras Lipides*. Vol 14, n° 5, pp. 278-92.

**Laurent, D. (1992).** Atlas de poche de physiologie. 2<sup>ème</sup> édition française, Flammarion ed. Paris, pp. 218-220.

**Le Grusse, J., Watier, B. (1993).** Les vitamines, données biochimiques, nutritionnelles et chimiques. Paris : centre d'étude et d'information sur les vitamines, p.303.

**Léger, D. L. (1992).** Anti-oxydants d'origine alimentaire: diversité, modes d'action antioxydante , interactions. *Oléagineux. Corps Gras*.Vol. 13, n°1, pp. 59-69.

**Leopoldini, M. N., Russo, M. (2011).** La base moléculaire de mécanisme d'antioxydants polyphénoliques naturels. Vol. 125, pp. 288-306.

**Liu, J. F., Huang, C. J. (1995).** Rétention de l' $\alpha$ - tocophérol chez les rats mâles est par des régimes d'alimentation contenant de l'huile de friture oxydée .Vol. 125, pp. 3071-3080.

**Lowry, O. M., Rosenbrough, R. P., Williams, M. A. (1951).** Mesure de la protéine avec le réactif au phénol de Folin. Vol. 226, pp. 497-509.

**Lyn Patrick, N. D. (2006).** Toxicité du Plomb Partie II: Le rôle des dommages des radicaux libres et l'utilisation des antioxydants dans la pathologie et le traitement de la toxicité du plomb. *Altern Med Rev.* Vol 11(2), pp. 114-127.

**March, B. E., Wong, E., Seier, L., Sim, J., Biely, J. (1973).** Hypervitaminose E dans le poussin. *J. Nutr.* Vol 103 pp: 371-377.

**Margaritis, I., Palazzetti, S., Rousseau, A. S., Richard, M.J., Favier, A. (2003).** La supplémentation en antioxydants et l'exercice rétrécissant améliorent la réponse induite exercice. *J Am Coll Nutr.* Vol 22(2), pp. 147-156.

**Martoja, R., Martoja-Pierson, M. (1967).** Initiation aux Techniques de l'Histologie animale. Paris: Masson p. 345.

**Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, C., Filesi, C., Giovannini. (2005).** Nouveaux mécanismes de composés antioxydants naturels dans les systèmes biologiques: Implication de glutathion et les enzymes liés glutathion. *Journal of Nutritional Biochemistry.* Vol 16(10), pp. 577-586.

**Mates, J., Perez, C. (1999).** Nunez de castro, les enzymes anti-oxydantes et les maladies humaines. *Clin Biochem.* Vol. 32, pp. 595-603.

**McCall, M. R., Frei. (1999).** " vitamines antioxydantes peuvent réduire sensiblement les dommages oxydatifs chez les humains?" *Free Radical Biology and Medicine B.* Vol 26(7-8) pp. 1034-1053.

**McCuaig, L. W., Motzok, I. (1970).** Excessive alimentaire en vitamine E: Son soulagement de hypervitaminose A et l'absence de toxicité. *Poultry Sci.* Vol. 49, pp. 1050-1052.

**McMichael, M. (2007).** " Le stress oxydatif, antioxydants, et l'évaluation du stress oxydatif chez les chiens et les chats. " *JAVMA.* Vol 231(5) pp.714-720.

**Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., Thérond, P. (2008).** Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytique. *Annales de biologie Clinique.* Vol 66, n°6, pp. 605-20.

**Mukai, K. (1993).** Synthèse et étude cinétique des actions antioxydantes et pro-oxydants de vitamine E dérivés. Dans: la vitamine E dans la santé et la maladie (Packer, L. & Fuchs, J., eds.), Marcel Dekker, New York, NY. pp. 97-119.

**Nascimento, M. C. MO., Matsubara, B. B., Matsubara, L. S., Correa, C. R., Pereira, E. J., Moreira, P. L., Carvalho, F. A., Burini, C. H., Padovani, C. R., Yeum, K. J., Ferreira, A. L. A. (2010).** Les dose pharmacologique d'alpha-tocophérol induit la cardiotoxicité chez des rats Wistar déterminés par échocardiographie et histologie. *Human and Experimental Toxicology.* Vol 30 (10), pp. 1540-1548.

**Nicole, S. (1999).** France Désilets MOA, audiologiste institute Raymond-Dewar.

**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.

**Oarada, M., Ito, E., Terao, K., Miyazawa, T., Fujimoto, K., Kaneda, T. (1988).** L'effet du régime alimentaire lipidique hydroperoxyde sur les tissus lymphoïdes chez la souris. *Biochimica et Biophysica Acta.* Vol. 960 (2) pp. 229-235.

**Pincemail, J., Defraigne J. O., Meurisse M., Limet R. (1998).** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaire 2eme partie : la vitamine E.

**Ponkory. (2003).** Lipides et corps gras alimentaires. Paris : Tec et Doc, pp. 61.

**Powers, S., Jackson, M. (2008).** " L'exercice induit par stress oxydatif: mécanismes cellulaires et de l'impact sur la production de la force musculaire." *Physiol Rev.* Vol. 88 pp. 1243-1276.

**Pré, J. (1991).** La lipoperoxydation. In *path boil*, 39, n°7, pp. 716-739.

**Pritchard, J. B., Miller, D. S. (1993).** " Mécanismes de médiation de la sécrétion rénale des anions organiques et cations." *Physiol Rev.* Vol. 73(4) pp. 765-796.

**Retsky, K. L., K. Chen., J., Zeind, B., Frei. (1999).** " L'inhibition de l'oxydation des LDL induite par le cuivre par la vitamine C est associée à une diminution du cuivre de liaison au LDL et à la formation de 2-oxo-histidine." *Free Radical Biology and Medicine.* Vol. 26(1-2), pp. 90-98.

**Salvayre, A. N., Salvayre, R. (2005).** Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif: Implication en physiopathologie vasculaire. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides.* Vol. 12, N°5, pp. 433-8.

**Schroeter, H. C., Boyd, J. P. E., Spencer, R. J., Williams, E., Cadenas et C., Rice-Evans. (2002).** " MAPK signalisation dans la neurodégénérescence: Influences de flavonoïdes et de l'oxyde nitrique." *Neurobiology of Aging* Vol. 23(5), pp. 861-880.

**Sendur, O., Turan, Y., Tastaban, E., Serter, M. (2009).** Statut anti-oxydant chez des patientes ostéoporotiques : une étude contrôlé. *Rev. Rhum.* Vol. 76, pp. 887-891.

**Sharma, N., Desigan, B., Ghosh, S., Ganguly, N. K., Majumdar, S. (1999).** Effet de la vitamine E antioxydante facteur de protection dans l'athérosclérose expérimentale chez des singes rhésus. *Annals de Nutrition et Métabolisme.* Vol. 43, pp. 181-190.

**Shils, M. E., Shike, M., Ross, A. C., Caballero, B., Cousins, R. J. (2006).** Nutrition moderne dans la santé et la maladie. Tenth Edition. Lippincott Williams et Wilkins.

**Sies, H., Stall, W., Sundquist, A. R. (1992).** Fonctions antioxydantes des vitamines. Vitamine E anc C, bêta-carotène et autres caretonoids. *Ann NY Acad Sci USA.* Vol. 669, pp. 7-22.

**Sinclair, A. J., Collins, F. D. (1968).** Foies gras chez les rats déficients en acides gras essentiels. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol. 152, pp. 498-510.

**Smirnoff, N. (2005).** " Antioxydants et réactifs espèces d'oxygène dans les plantes."

**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 -tocophérol. *Biomed Biomed. Pharmacother.* Vol. 61, pp. 435 – 440.

**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.

**Stocker, R. (1999).** L'ambivalence de la vitamine E dans l'athérogenèse. *TIBS.*Vol. 24, pp. 219.

**Thomas, S. R., Neuzil, J. & Stocker, R. (1996).** Cosupplémentation avec la coenzyme Q empêche l'effet pro-oxydant de l'alpha-tocophérol et augmente la résistance du LDL à la transition d'initiation de l'oxydation de métal-dépendante. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Vol. 16, pp. 687–696.

**Traber, M. G., Atkinson, J. (2007).** La vitamine E, antioxydant et rien de plus. *Free Radical Biology Medicine.* Vol. 43, pp. 4–15.

**Upston, J. M., Terentis, A. C., Stocker, R. (1999).** Peroxydation Tocopherol médiateur (TMP) des lipoprotéines: implications pour la vitamine E comme un supplément antiathérogène potentiel. *FASEB J.*Vol. 13, pp. 977-994.

**Valko, M., M, Izakovic., M, Mazur., C. J., Rhodes et J., Telser. (2004).** " Rôle des radicaux oxygène dans les lésions de l'ADN et de l'incidence du cancer." *Molecular and Cellular Biochemistry* 266(1-2): 37-56. Graille J., 2003. *Lipides et corps gras alimentaire* . Paris : Tec et Doc, pp.1-55.

**Valko, M., C. J., Rhodes, J., Moncol, M., Izakovic et M., Mazur. (2006).** " Les radicaux libres, des métaux et des antioxydants dans le cancer induit par le stress oxydatif." *Chemico-Biological Interactions.*Vol. 160(1), pp. 1-40.

**Wagner, B. A., Buettner, G. R., Burns, C. P. (1996).** La vitamine E ralentit le taux de la peroxydation lipidique radicalaire dans les cellules. *Arch Biochem Biophys.* Vol. 334, pp. 261–267.

**Wardman, P. et L. P., Candeias. (1996).** " Fenton chimie: Une introduction." *Radiation Research.*Vol. 145(5) pp. 523-531.

**Winkler, B. S., S. M., Orselli. (1994).** " Le couple redox entre le glutathion et l'acide ascorbique: un point de vue chimique et physiologique." *Free Radic Biol Med.*

**Yang, N. Y. J., Desai, A. D. (1977).** Effet des niveaux élevés de vitamine E alimentaire sur les indices hématologiques et les paramètres biochimiques chez les rats. *J. Nutr.*Vol. 107 , pp. 1410-1417.

# **Annexes**



**Figure 1** : La répartition des rats en quatre (04) lots.

**Tableau I** : Composition de régime alimentaire standard (ONAB, Algérie).

<b>Ingrédients</b>	<b>Pourcentage (%)</b>	<b>Quantité g /kg d'aliment</b>
Mais	52.80	528
Son	10.80	108
Soja	32.10	321
Calcaire	1.50	15
Phosphate	0.80	8
C.M.V(Complément Minéralo-Vitaminique)	2	20
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>1000g</b>



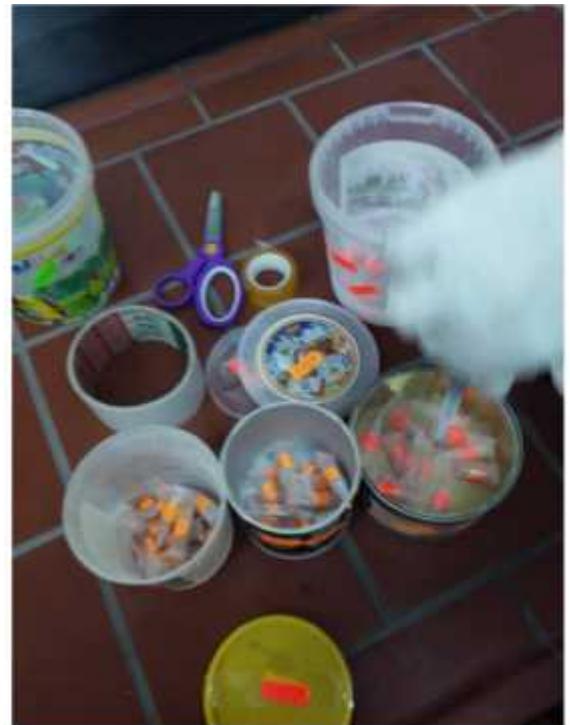
**Figure 2:** L'anesthésie des rats avec l'éther.



**Figure 3 :** Dissection abdominale du rat.



**Figure 4:** Rinçage du foie dans le PBS.



**Figure 5:** Répartition des fragments du foie.



**Figure 6. :** Boite de la vitamine E (100 mg)



**Figure 7:** Les gélules de 100 mg

**Verrerie et autres :**

- ) Pipettes Pasteur
- ) Balance normale
- ) Balance de précision
- ) Tube à essai
- ) Becher
- ) Micro pipette
- ) Trousse de dissection
- ) Piluliers
- ) Tube EDTA
- ) Epindorffes
- ) Pissette
- ) Burette de 50 ml
- ) Entonnoir

**Réactifs et solutions :**

- ) Ether
- ) Ethanol
- ) phosphate de potassium
- ) tampon phosphate
- ) sulfate de cuivre
- ) Triton X-100
- ) Peroxyde d'hydrogène
- ) Butyl-Hydroxotoluène (BHT)
- ) Eau physiologique à 9‰
- ) tampon phosphate salin
- ) Folin

**Appareillage :**

- ) Bain marie de type Memmert
- ) Agitateur de type Assistent TMA 2071
- ) Centrifugeuse de type Mettich Universal 320R
- ) Broyeur de type IKA
- ) Spectrophotomètre UV mini 1240 SHIMADZE
- ) Balance de précision de type JA 3003N
- ) Balance normale de type KURN KB
- ) Appareil photo de type *Canon Power shot A620*
- ) Microscope photonique de *Zeiss Axiostar plus*
- ) Vortex de type Spuart

## Préparation des solutions pour le dosage des protéines :

### ➤ Préparation de la solution A

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

### ➤ Préparation de la solution B

- )] Folin dilué au  $\frac{1}{2}$  dans de l'eau distillée.

## Préparation des solutions pour le dosage de la catalase :

### ➤ Préparation du tampon phosphate (50 mM à $\text{pH}=7$ ):

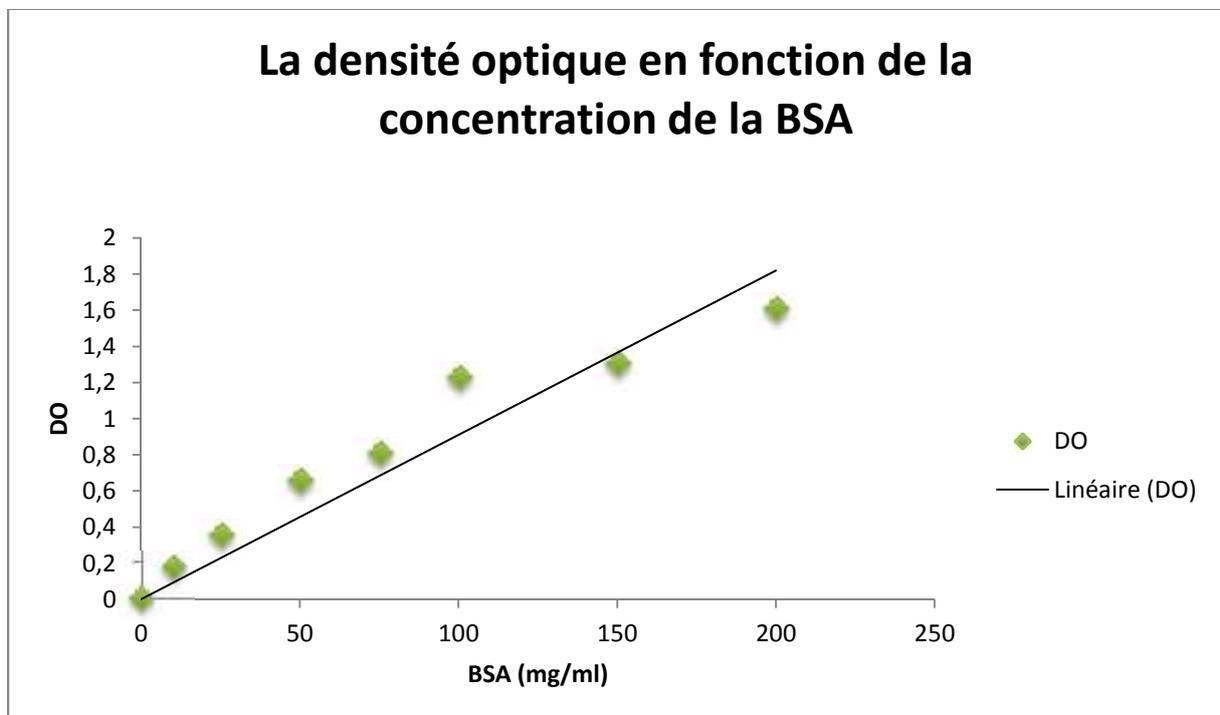
- )] Dissoudre 6.81 g de Phosphate de potassium monobasique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dans 1000 ml de l'eau distillé (solution1).
- )] Dissoudre 8.90 g de Hydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dans 1000 ml de l'eau distillé (solution 2).
- )] Mélanger la solution1 avec la solution 2 avec les proportions (1 :1.5).

### ➤ Préparation de la solution de peroxyde d'hydrogène (30mM) :

- )] Diluer 0.34 de peroxyde d'hydrogène de 30% dans 100 ml de tampon phosphate.

**Courbe d'étalonnage préparée à partir des concentrations de BSA :**

[BSA](mg /ml)	0	10	25	50	75	100	150	200
DO	0	0.17	0.35	0.65	0.8	1.22	1.3	1.6





**Figure 8 :** Appareil numérique adapté à un microscope photonique.