



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies
Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Effets antioxydant et pro-oxydant de l'alpha-tocophérol sur le tissu
Cardiaque du rat mâle Wistar.**

Présenté par :

Soutenu le : 22/09/2020

M^{lle} EL DJOUHER Naouel

M^r MOUSSAOUI Abdelakder

Devant le Jury :

M^{me} Benazouz.F

MAA

SNV, Blida1

Président (e)

M^{me} Kanane.A

MAA

SNV,Blida 1

Examineur (ice)

M^{me} Rouaki.F

MCB

SNV,Blida 1

Promoteur (ice)

Session 2019/ 2020

Remerciements

En préambule à ce travail , nous souhaitons adresser ici tous nos remerciements aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué de près ou de loin, à l'élaboration et l'aboutissement de ce mémoire.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice de mémoire le Docteur ROUAKI pour ses précieux conseils, ses orientations, sa disponibilité, et aussi pour la patience dont elle a fait preuve.

Nos vifs remerciements vont aussi aux membres du jury

Dr. F. BENZAOUZ

Dr. A. Kanane

pour l'honneur qu'ils nous ont fait en évaluant ce travail

Table des matières

Titre	Page
Introduction	1
I.1 Le stress oxydatif	3
I.1.1 Généralités	3
I.1.2 Espèces réactives oxydantes	3
I.1.3 Physiopathologie du stress oxydatif	9
I.1.4 Le système de défense anti-oxydant	12
I.2 La vitamine E	16
I.2.1 Généralités	16
I.2.2 Structure de la vitamine E	16
I.2.3 Sources naturelles de la vitamine E	17
I.2.4 Propriétés physico-chimique de la vitamine E	17
I.2.5 Métabolisme de la vitamine E	18
I.2.6 Rôles de la vitamine E	19
II. Matériel et Méthodes	22
II.1 Matériel	23
II.1.1 lieu de stage	23
II.1.2 Animaux étudiés	23
II.1.3 Expérimentation	24
II.1.4 Supplémentation de l'aliment	24
II.1.5 Matériel non biologique (annexe 2)	25
II.2 Méthodes	26
II.2.1 Sacrifice et prélèvements	26
II.2.2 Traitement des prélèvements et confection des coupes histologiques	26
II.2.3 Dosage des protéines	28
II.2.4 Étude statistique	30
III. Résultats et discussion	31
III.1 Symptomatologie	32
III.2 Effets de la supplémentation en alpha tocophérol sur le poids corporel	32
III.3 Effets de la supplémentation en alpha tocophérol sur le poids du cœur	36
III.4 Effets de la supplémentation en alpha tocophérol sur le tissu cardiaque	37
III.5 Effets de la supplémentation d'un régime standard en doses croissantes d'alpha tocophérol sur la teneur en LPO et l'activité de la catalase	43
V. Conclusion et perspectives	47
Références bibliographiques	50
Annexes	55

RESUME

Le but de ce travail est de déterminer l'effet de la supplémentation d'un régime équilibré en différentes doses d'alpha-tocophérol (α -T) (500, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 et 1000 mg d' α -T /Kg d'aliment), sur les paramètres pondéraux ainsi que sur l'histologie du tissu cardiaque chez le rat Wistar, et ceci afin d'évaluer la dose pour laquelle l' α -T bascule de l'effet antioxydant en un effet prooxydant.

Les principaux résultats obtenus concernant les paramètres pondéraux ne montrent aucune variation significative du taux d'évolution du poids corporel pour les rats des lots RSE₅₀₀ au RSE₆₀₀, ces doses n'ont eu aucun effet sur la croissance des rats, par contre, nous avons obtenu une diminution significative à hautement significative du taux d'évolution du poids corporel respectivement pour les lots RSE₆₅₀ au RSE₉₀₀ et RSE₉₅₀ au RSE₁₀₀₀, ce qui suggère que pour ces doses l' α -T a affecté la croissance des rats.

Notons que la supplémentation de 500 à 1000 mg d' α -T/kg d'aliment n'a pas affecté le poids cardiaque puisqu'aucune variation significative n'a été enregistrée.

L'étude histologique du cœur a montré un parenchyme cardiaque normal pour les lots RSE₅₀₀ à RSE₆₀₀, cependant on a observé à partir du lot RSE₆₅₀ un début d'infiltration lymphocytaire, d'importantes congestions, cet état altéré a évolué par mesure que la dose augmentait et s'est traduit en foyers nécrotiques ; pour ces doses l' α -T n'a pas agi en tant qu'antioxydant mais a eu plutôt tendance à agir en tant que pro-oxydant.

En finalité, nous pouvons annoncer que la dose 650 mg d' α -T/Kg d'aliment est la dose pour laquelle l' α -T a basculé de son effet antioxydant en un effet prooxydant.

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

ABSTRACT

The aim of our work is to determine the effect of supplementation of a alpha-tocopherol (α T) at different doses (500,600,650,700,750,800,850,900,950,1000mg of α -T / kg feed), on the on weight parameters as well as cardiac tissue histology of and some biochemical parameters of oxidative stress: protein content, Malondialdehyde (MDA) and catalase antioxidant enzyme (CAT) activity in a growing Wistar Rat. As well as the histology of heart tissue in Wistar rats in order to evaluate the dose at which α -T switches from an antioxidant effect to a prooxidant effect.

At the end of this experimental study, the main results obtained concerning the weight parameters showed no significant variation in the rate of body weight change for rats supplemented with 500 to 700 mg α -T/kg feed, these doses had no effect on the growth of the rats, on the other hand for the batches supplemented with 750 to 900 and 950, 1000 mg α -T/kg feed the growth of the rats was affected this was manifested by a significant to highly significant rate of body weight change respectively.

The histological study of the heart showed a normal cardiac parenchyma for lots RS500 to RSE700, however, from lot RSE750 an onset of lymphocyte infiltration, severe congestions, this altered state evolved as the dose increased and resulted in necrotic foci. In this case α -T did not act as an antioxidant but rather tended to act as a prooxidant. T/kg of food

Finally, we can announce that at the 750 mg dose of α -dose the α -T has switched from its antioxidant effect to a prooxidant effect.

After the trial period, the histological analysis of the heart of mice treated with 700 mg of α -T/kg of feed showed a, nevertheless following the supplementation of doses showed the beginning signs of an inflammation characterized by edema , congestion this state developed with higher doses of simultaneously to cellular alteration necrosis.

Regarding protein content, the rate of MDA and the antioxidant enzyme catalase activity, we've based on the histological results as well as those of synthesized articles, from there we assume that a small increase in protein content, accompanied by an important decrease in MDA and CAT activity of the batch supplemented with the dose varying from 500 to 700 mg of α -T / kg of food compared to the control batch, which demonstrates the protective antioxidant effect of α -T . On the other hand, for the batches supplemented with 700, 750, 800,

850, 900, 950 and 1000 mg of α T/kg, we would have obtained a considerable decrease in protein concentration and a negligible decrease in catalase accompanied by an impressive increase in MDA levels. Hence we conclude that α -T did not act as an antioxidant but rather as a pro-oxidant.

Key Words :Alpha-tocopherol, antioxidant, pro-oxidant, rat, Heart

المخلص

الهدف من هذا العمل هو تحديد تأثير استكمال نظام غذائي متوازن بجرعات مختلفة من α -T (alpha-tocopherol) 500 ، 600 ، 650 ، 700 ، 750 ، 800 ، 850 ، 900 ، و 1000 مجم من α -T / Kg من الطعام ، على معايير الوزن وكذلك على أنسجة أنسجة القلب في جرد Wistar ، من أجل تقييم الجرعة التي يتم تبديل α -T منها تأثير مضادات الأكسدة في تأثير المؤكسدة.

النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها فيما يتعلق بمعلمات الوزن لا تظهر أي اختلاف معنوي في معدل التغير في وزن الجسم لفئران دفعات RSE₅₀₀ إلى RSE₆₀₀ ، ولم يكن لهذه الجرعات أي تأثير على نمو الفئران ، ومن ناحية أخرى ، حصلنا على انخفاض كبير إلى كبير في معدل التغير في وزن الجسم على التوالي بالنسبة للدفعات RSE₆₅₀ إلى RSE₉₀₀ و RSE₉₅₀ إلى RSE₁₀₀₀ ، مما يشير إلى أن هذه الجرعات أثرت على نمو الفئران.

لاحظ أن مكملات من 500 إلى 1000 مجم من α -T / كجم من الطعام لم تؤثر على وزن القلب حيث لم يتم تسجيل أي اختلاف كبير.

أظهرت الدراسة النسيجية للقلب وجود حمة قلبية طبيعية للدفعات RSE₅₀₀ إلى RSE₇₀₀ ، ومع ذلك ، بدءًا من الدفعة RSE₇₅₀ ، بدأ التسلل للمفاوي ، لوحظ احتقان شديد ، وتطورت هذه الحالة المتغيرة مع زيادة الجرعة. زيادة ونتج عن بؤر نخرية. عند هذه الجرعات ، لا تعمل α -T كمضاد للأكسدة ولكنها تميل إلى العمل كمضادة للأكسدة.

أخيرًا ، يمكننا أن نعلن أن جرعة 750 مجم من α -T / Kg من الطعام هي الجرعة التي تحول عندها α -T من تأثيرها المضاد للأكسدة إلى تأثير المؤكسدة.

الكلمات المفتاحية: ألفا توكوفيرول ، مضادات الأكسدة ، المؤكسدة ، الجرد ، القلب.

Liste des figures

Figure 01 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.....	04
Figure 02 : Modes d'actions du radical hydroxyl	06
Figure 03 : Réaction en chaine de peroxydation lipidique et formation des dérivés des radicaux peroxydes (Barrera et <i>al.</i> , 2018).....	08
Figure 04 : Structure du RRR-alpha-Tocophérol et des différents vitamères.....	16
Figure 05 : Mécanisme antioxydant de l'alpha tocophérol et sa régénération.....	19
Figure 06 : Action pro-oxydante de l'alpha tocophérol	20
Figure07 : Rats mis en cage.....	22
Figure 08 : Aliments fournis aux rats	24
Figure 09 : La vitamine E utilisée sous forme de poudre.....	24
Figure 10 : Taux d'évolution du poids corporel du lot RS et des lots RSE	33
Figure 11 : Effet de la supplémentation d'un RS en différentes doses d'α-T sur le poids du tissu cardiaque des rats.....	35
Figure 12 : Micrographie des tissus cardiaques des lots RS,RSE 500,RSE 600... ..,	36
Figure 13 : .Micrographie des tissus cardiaques des lots .RSE 650 et RSE 700.....	37
Figure 14 : Micrographie des tissus cardiaques du lot RSE 750	38
Figure 15 : Micrographie des tissus cardiaques du lot RSE 800	38
Figure 16 : Micrographie des tissus cardiaques du lot RSE 850.....	39
Figure 17 : Micrographie des tissus cardiaques du lot RSE900.....	40
Figure 18 : .Micrographie des tissus cardiaques des lots .RSE 950 et RSE 1000.....	40

Liste des tableaux

Tableau I	Espèces réactives de l'azote et leurs formations	6
Tableau II	Produits issus par oxydation d'acides aminés	8
Tableau III	Antioxydants endogènes et exogènes	12
Tableau IV	Importantes découvertes sur la vitamine E (non exhaustive)	15
Tableau V	Propriétés physico-chimiques de la vitamine E (alpha tocopherol).....	17
Tableau VI	Répartition des lots et régimes alimentaires.....	23
Tableau VII	Les différentes étapes de dosage de la CAT	29
Tableau VIII	Taux d'évolution du poids corporel.....	32

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

AGPI: Acides Gras Polyinsaturés

α -T: alpha - Tocophérol.

α - TTP: α -Tocophérol TransferProtein

α -T \cdot : Radical α Tocophéroxyl.

BSA: bovineSérum Albumine.

CAT: Catalase

CEHC : Carboxyethyl Hydroxy-Chromanes.

CRM : chaîne respiratoire mitochondriale

CD36: cluster of differentiation 36

ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène.

ERA: Espèces Réactives de l'Azotes

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

GPx: Glutathion Peroxydase.

GSH: Glutathion.

GSSG: Glutathion-Disulfure.

GR: Glutathion Réductase.

GS \cdot : Radical Thiols.

GSSG: Glutathion-Disulfure.

GSR: Glutathion Réductase.

HDL: High density lipoprotéin.

H₂O₂: Peroxyde D'hydrogène.

HNO₂ : Acide Nitrique.

HNO : Nitroxyle

HOCL: Acide Hypochloreux.

IUPAC-IUB: International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature

ICAM -1: InterCellular Adhesion Molecule

LDL: Low density lipoprotein.

LPL: lipoprotéine lipase

LPO: lipoperoxydation
LPS: lipopolysaccharide
L•: Radical Alkyle.
LH: Radical lipidique
LOO•: radical peroxyde
LOOH: Hydroperoxydes.
MDA: Malondialdehyde.
MPO: myeloperoxidase
NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate Hydrogène.
NADP+: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.
NO •: Monoxyde d'azote.
NOS: Nitrique Oxyde Synthase.
NO₂: Dioxyde d'azote
NaCl: Chlorure de Sodium.
NF-κB: nuclear factor-kappa B
O₂⁻: Oxygène Singlet
OH: Anion Hydroxyde.
O⁻•: Anion Superoxyde.
OH•: Radical Hydroxyl.
ONAB: Office National des Aliments de Bétail
ONOO⁻ : Peroxynitrite
RL : Radical libre.
RO •: Radical Alkoxy
ROO •: Radical Peroxyl.
ROOH: Hydroperoxyde.
RS: Régime Standard
RSE500: Régime Standard supplémenté en 500 mg d'α-tocophérol /kg d'aliment.
RSE600: Régime Standard supplémenté en 600 mg d'α-tocophérol /kg d'aliment.
RSE650: Régime Standard supplémenté en 650 mg d'α-tocophérol /kg d'aliment.
RSE700: Régime Standard supplémenté en 700 mg d'α-tocophérol /kg d'aliment.

RSE750: Régime Standard supplémenté en 7500 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

RSE800: Régime Standard supplémenté en 800 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

RSE850: Régime Standard supplémenté en 850 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

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

RSE950: Régime Standard supplémenté en 950 mg d' α -tocophérol /kg d'aliment.

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

SOD: Superoxyde Dismutase

TBA: Acide Thiobarbiturique

VLDL: very low density lipoprotein

VCAM-1 vascular cell adhesion molecule 1

INTRODUCTION

Suite aux activités métaboliques cellulaires normales, ou à une exposition à des facteurs externes, des entités chimiques communément appelées espèces réactives oxydantes sont générées, regroupant les espèces dérivant de l'oxygène (ERO) et du monoxyde d'azote (ERA), ces espèces peuvent être radicalaires ou non (**Del Río, 2015**).

Les variations de ces espèces réactives induisent un effet paradoxal sur la cellule, bénéfique à des niveaux faibles ou modérés (**Valko et al., 2007**), ou délétères à des niveaux élevés, induisant ainsi un stress oxydatif ou un stress nitrosatif. Ce stress est la résultante d'un déséquilibre entre une génération excessive des espèces réactives oxydantes et une capacité d'élimination par un système antioxydant réduite (**Sies, 1991**), cet état, s'il est prolongé peut directement ou indirectement induire des maladies chroniques tels que les maladies cardiovasculaires (**Phaniendra, Jestadi et Periyasamy, 2015**).

Afin de contrecarrer le stress oxydatif les organismes vivants sont dotés d'un système de défense enzymatique antioxydant (la superoxyde dismutase : SOD, la catalase : CAT et la glutathion peroxydase : GPX) qui a la capacité de prévenir ou ralentir l'oxydation des macromolécules. Un deuxième système antioxydant d'origine exogène constitué de vitamines (vitamines E, C et A), de polyphénols et bien d'autres molécules participant au maintien de l'homéostasie redox (oxydoréduction) et donc l'homéostasie de l'organisme (**Bouayed et Bohn, 2010**).

La vitamine E, molécule liposoluble, connue pour ses propriétés antioxydantes en inhibant la peroxydation dans les membranes phospholipidiques s'étend aussi vers des fonctions non antioxydantes telle que la signalisation cellulaire et la régulation de l'expression génique (**Azzi et Stocker, 2000**). Cependant, des concentrations élevées de celle-ci peuvent engendrer l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (**Bowry et Stocker, 1993**) lorsque son radical tocophéroxyle réagit avec des acides gras insaturés dans la lipoprotéine conduisant ainsi à la formation d'autres radicaux libres toxiques. On parle de peroxydation médiée par les tocophérols (**Schneider, 2005**).

Dans la littérature, les avis divergent quant aux effets de la vitamine E sur l'organisme et peu d'études n'ont été consacrées à cette thématique, à savoir, les effets de la supplémentation de doses croissantes d'alpha tocophérol (de 500 à 1000) mg/kg d'aliment sur le tissu cardiaque de rats mâles de souche wistar pendant une durée de 11 semaines.

Chapitre I : Étude bibliographique

I.1 Le stress oxydatif

I.1.1 Généralités

Le stress oxydatif est globalement défini comme une rupture dans la balance entre, d'un côté, des espèces réactives oxydantes (ERO) constituées de molécules radicalaires que l'on nomme radicaux libres (RL) ou non-radicalaires mais tout aussi réactives, et un groupe de molécules constituant le système de défense antioxydant de l'autre, en faveur des ERO (**Sies et Jones, 2007**). Dans ce cas de figure où le système antioxydant ne peut contrecarrer l'action de forte concentration d'ERO, ces dernières peuvent endommager des biomolécules et altérer l'homéostasie de l'organisme pouvant le mener vers des situations pathologiques (**Poljsak et al., 2013 ; Pisoschi et Pop, 2015**).

I.1.2 Espèces réactives oxydantes

Les ERO peuvent être radicalaires ou non-radicalaires et comportent les espèces dérivées de l'oxygène, en anglais *ROS* pour (*reactive oxygen species*), les espèces réactives de l'azote (ERA), du chlore (ERC), du fer (ERF) et du sulfure (ERS) (**Halliwell et Gutteridge, 2015**).

Une ERO radicalaire ou RL est une espèce chimique ayant au moins un électron célibataire sur son orbital externe que l'on représente par un point (\bullet), cette configuration provoque une attraction du RL dans un champ magnétique, l'électron voulant s'apparier à un autre d'une autre molécule, ce qui rend le RL peu stable et réactif, réactivité qui varie selon l'espèce. L'apparition d'un RL entraîne généralement des réactions en chaîne, aboutissant à la formation d'autres RL, la machinerie prendra fin lorsque deux RL se rencontrent pour former une liaison covalente.

Certaines espèces non-radicalaires (sans aucun électron célibataire sur leur couche externe) font partie des ERO car, malgré leur état fondamental, elles sont très réactives comme l'ERA le peroxyde d'azote (ONOO^-) et peuvent engendrer la formation de RL comme l'ERO, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

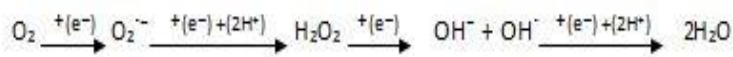
I.1.2.1 Sources des espèces réactives oxydantes

Les ERO peuvent être produites par des réactions d'auto-oxydation de certaines molécules comme la dopamine et les hydroquinones, par des enzymes, dans différents types et compartiments cellulaires et même dans l'espace extracellulaire (Bhattacharyya *et al.*, 2014)

La mitochondrie est la plus importante source d'ERO avec, au moins 10 sites de production à son actif (Dröse et Brandt, 2012 ; Larosa et Remacle, 2018). Il existe aussi plusieurs sources exogènes d'ER, comme la fumée de tabac, l'alcool, l'alimentation, la chimiothérapie, les radiations ionisantes....

I.1.2.2 Espèces réactives de l'oxygène

Théoriquement, le dioxygène (O₂) est une espèce radicalaire car il possède deux électrons célibataires sur son orbital externe, ces derniers ont la même configuration ou même spin (parallèle), ce qui rend la molécule relativement stable. Cette configuration fait que l'O₂ accepte un électron à la fois expliquant sa réactivité lente avec les espèces non radicalaires (Gilbert. DL. (éd). 1981). Ces réductions mono-électronique de l'O₂ forment des intermédiaires réactifs nommés les ERO primaires que sont l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le H₂O₂ et le radical hydroxyle (OH[•]), jusqu'à la formation de deux molécules d'eau, (réaction (01)).



le radical hydroxyle jusqu'à la formation (01)

De ces ERO primaires, naissent d'autres espèces actives de l'oxygène (Figure 1) (Favier, 2003).

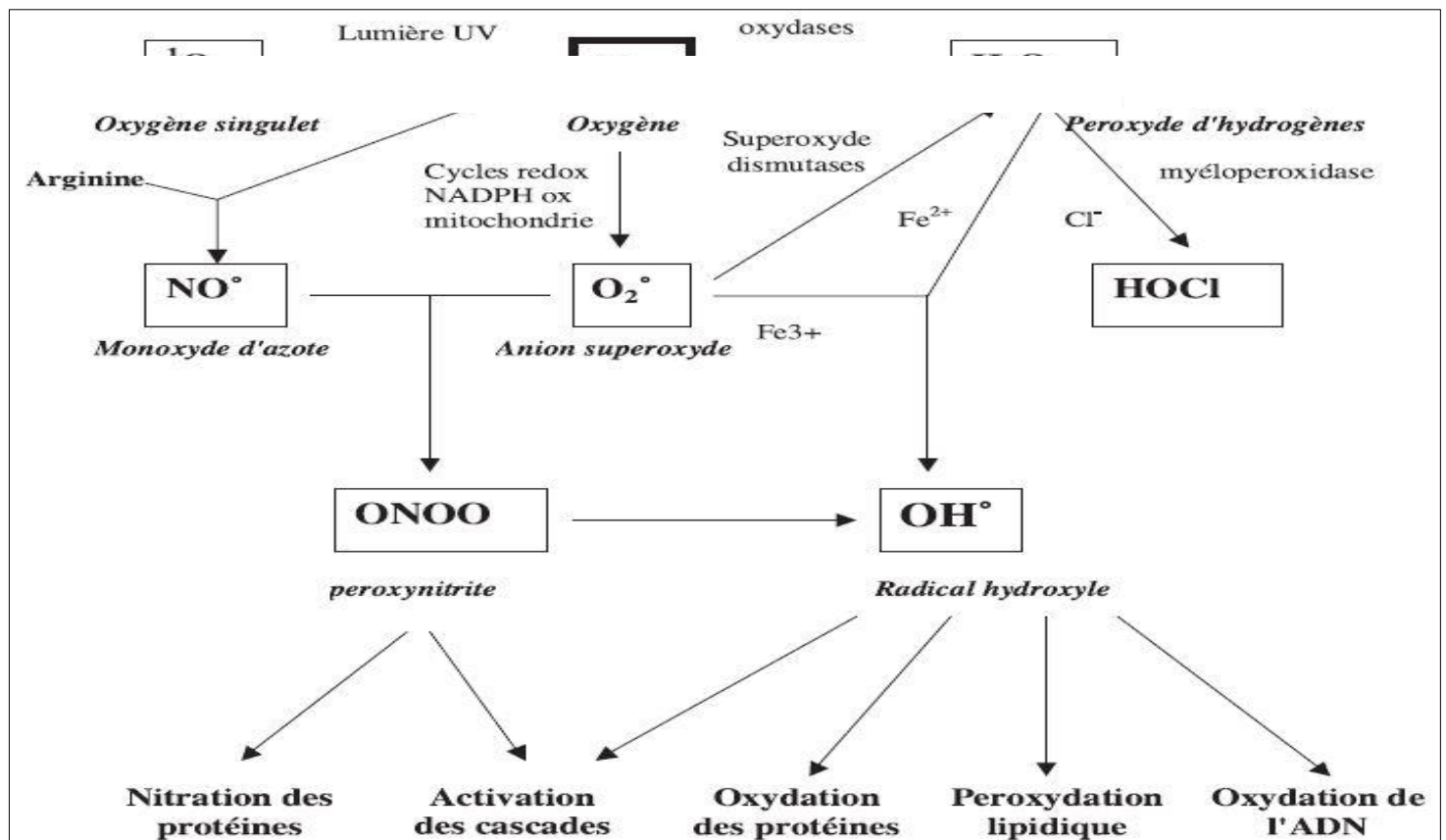
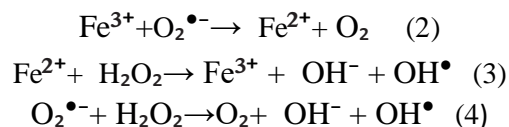


Figure 1 Origines des différents radicaux libres oxygènes et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003)

a) **Le radical Superoxyde** ayant une faible réactivité en raison de sa constante de vitesse très faible, O₂•⁻ est l'ERO la moins réactive. Toutefois il est caractérisé par sa toxicité indirecte, car il peut produire d'autres ERO très réactives comme OH• via la réaction d'Haber-Weiss (réactions (2-4)) ou l'OONO⁻ en s'associant au monoxyde d'azote radicalaire (NO•).



b) **Le radical hydroxyle (OH•)** est considéré comme étant l'ERO la plus réactive, ayant une demi-vie très courte (10⁻⁹ s), dès sa production, le OH• réagit aussitôt avec les molécules se trouvant autour de lui (Pastor *et al.*, 2000). Il peut être produit via la réaction de Fenton (réaction (05)), par les UV sur le H₂O₂, suite à la réaction de l'acide hypochloreux (HOCl) avec O₂•⁻ (Folkes, Candeias et Wardman, 1995) (réaction(06)), par les quinones et semi-quinones (réaction d'oxydoréduction de l'H₂O₂) (Halliwell et Gutteridge, 2015).

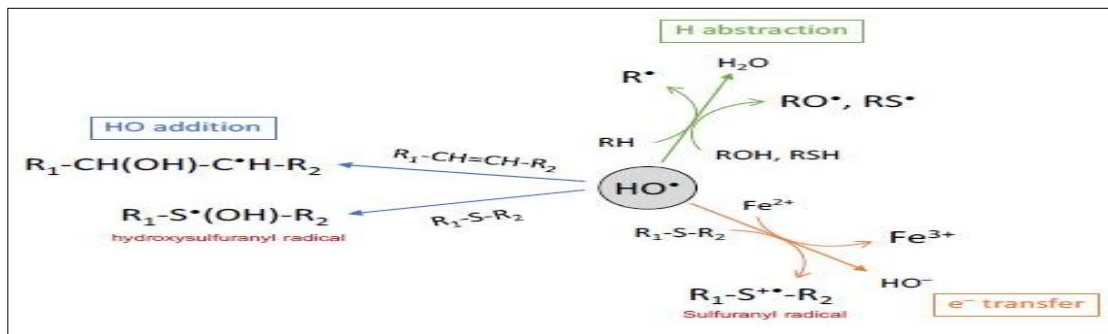
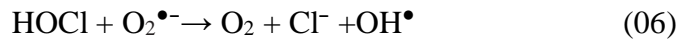


Figure2. Modes d'actions du radical hydroxyle (Collin, 2019)

OH^\bullet peut agir selon trois modes d'actions, en arrachant soit un électron soit un atome d'hydrogène ou bien, en s'ajoutant sur une double liaison (Collin, 2019) (figure 02).

c) **Les radicaux peroxydes (ROO^\bullet)** font partie des ERO secondaires, résultant de l'oxydation de molécules organiques par les RL, par exemple l'abstraction d'un atome d'hydrogène d'un acide gras polyinsaturé (AGPI) ou d'une molécule de glucose par OH^\bullet . Les ROO^\bullet peuvent oxyder d'autres molécules de la même manière faisant poursuivre les réactions d'oxydations en chaînes.

d) **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)** est produit en permanence dans plusieurs compartiments cellulaires dont la mitochondrie et le peroxyosome. H_2O_2 est peu réactif avec les biomolécules. Cependant il inactive quelques protéines par oxydation de leurs groupes sulfhydriles menant à l'apparition d'acide sulfonique (réaction(7)). $\text{RS}^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{RSOH} + \text{H}_2\text{O}$ (7)

Il peut diffuser dans et entre les cellules et à forte concentrations, H_2O_2 est cytotoxique (Pedroso et al., 2009). Des physiologistes parlent de canaux permettant la diffusion du H_2O_2 à travers les membranes plasmiques et membranes internes des mitochondries, les peroxyporines (Sies, 2014).

e) **L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)** est une forme excitée de l'oxygène et peut être produit après réaction entre deux ROO^\bullet . C'est un oxydant très réactif (Hojo et al., 2000) d'une demi-vie de 10^{-6} s et il peut transférer son énergie aux molécules induisant leurs excitations (Foote et al, 1995).

f) **L'acide hypochloreux (HOCL)**. Les myéloperoxydase (MPO) catalysent sa formation (**Winterbourn et Kettle, 2000**)(réaction (8)). Hautement réactif HOCL peut traverser les membranes, s'ajouter aux AGI et oxyder des protéines. $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCL + OH^-$ (8)

I.1.2.3 Les espèces réactives de l'azote ERA

À l'instar des ERO qui dérivent de l'oxygène, les ERA dérivent du monoxyde d'azote NO^\bullet . Il en existe plusieurs (Tableau I), radicalaires ou non-radicalaires, toutes relativement très réactives. Tout comme le stress oxydatif, la notion de "*nitosative stress*" est très présente dans la littérature. Bien que les rôles du NO^\bullet et quelques uns de ses dérivés en physiologie sont importants, des effets délétères sur des biomolécules dus à leurs surproduction sont clairement établis en physiopathologie(**Calabrese et al., 2006**).

Tableau I : Espèces réactives de l'azote et leurs formations

ERA	Formation
Monoxyde d'azote NO^\bullet	Par l'enzyme NOS (<i>nitricoxidesynthase</i>)
Peroxynitrite $ONOO^-$	Réaction non-enzymatique entre $O_2^{\bullet -}$ et NO^\bullet
Dioxyde d'azote NO_2^\bullet	Décomposition du $ONOO^-$
Nitroxyde HNO	Réduction d'un électron du NO^\bullet
S-nitrosothiols	Addition covalente du NO^\bullet sur les groupements, Cysteine, thiol et sulfhydryle

(**Martínez et Andriantsitohaina, 2009**)

I.1.2.4 Impact des ERO sur les biomolécules

a) Les acides nucléiques

Certaines ERO, en particulier OH^\bullet peuvent agir directement sur les molécules d'ADN et ARN et les modifient considérablement(**von Sonntag, 2006**). OH^\bullet réagit avec les bases azotées soit en s'y ajoutant sur une double liaison ou en leur arrachant un atome d'hydrogène (**Chatgililoglu, 2011**) et la guanine est sa cible privilégiée (**Dizdaroglu et Jaruga, 2012**). Des aldéhydes comme le malonaldehyde (MDA) issus de la peroxydation lipidique forment des adduits lipidiques sur les bases de l'ADN.

Ces attaques et changements sur les acides nucléiques, s'ils ne sont pas réparés rapidement peuvent provoquer des mutations, des erreurs dans la traduction, des changements dans l'expression des gènes, des cassures simple et double brins, des pontages ADN-protéine et la formation de sites abasiques(Hegde *et al.*, 2012; Poulsen *et al.*, 2012)

b) La peroxydation lipidique

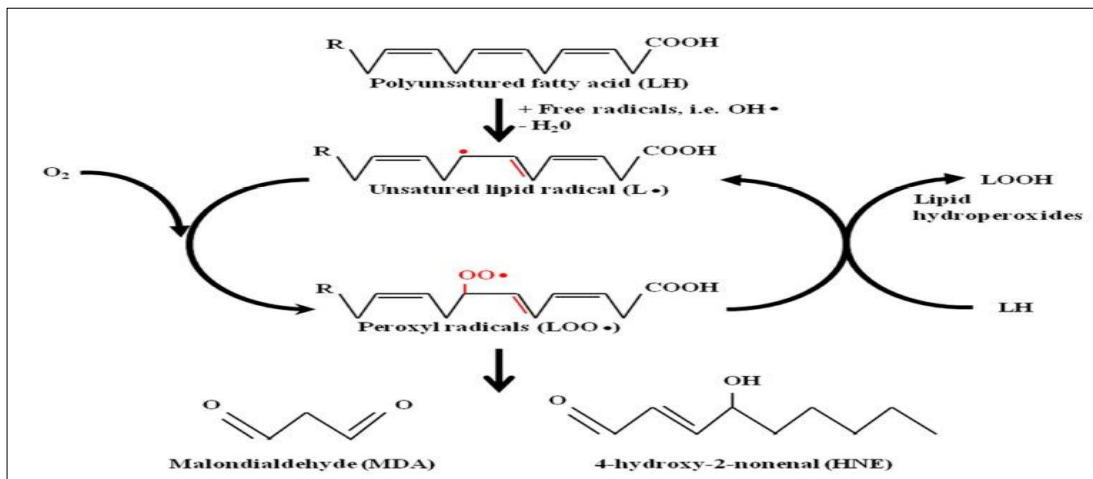
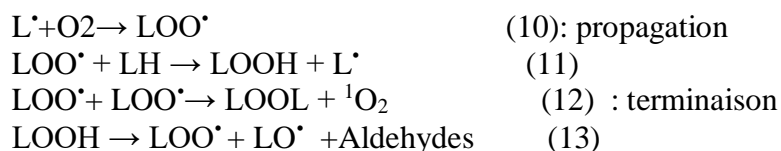


Figure 3. Réaction en chaîne de peroxydation lipidique et formation des dérivés des radicaux peroxydes . (Barrera *et al.*, 2018)

C'est une attaque des ERO sur les lipides particulièrement destructrice car elle correspond à des réactions en chaînes, incriminées dans divers pathologies.

Ce n'est pas tout les ERO qui peuvent provoquer ce processus, NO•et O₂•⁻ne sont pas assez réactifs. En revanche, OH• et le NO₂•peuvent initier la peroxydation soit par addition sur le lipide (L), soit en lui arrachant un atome d'hydrogène générant un radicale lipidique centré sur le carbone ou radical alcoyle (L*) (réaction (09)).Le phénomène se propage quand le radical néoformé réagit avec l'O₂ produisant un radical peroxyde lipidique très réactif (LOO•) (réaction 10), ce dernier arrache un atome d'hydrogène d'un autre lipide adjacent, poursuivant ainsi l'oxydation des lipides et se transforme en lipide hydroperoxyde (LOOH) (réaction(10)).La réaction en chaîne s'arrête si deux radicaux lipidiques se rencontrent pour former un dimère (LOOL) (réaction(12)) ou que les LOO• soient réduits par des antioxydants. Si ce n'est pas le cas les LOO• se décomposent en produits toxiques comme le MDA et le hydroxynonenal4 (4-HNE) (réaction(13)).





Il est à noter que la sensibilité des lipides à l'oxydation augmente avec leurs nombres de doubles liaisons.

La peroxydation lipidique provoque la diminution de la fluidité membranaire, la perte de son intégrité, endommage les protéines la constituant, inactive des récepteurs, des enzymes ainsi que des protéines de transport (**Spiteller, 2006; Catalá, 2012**)

c) Les protéines

Les ERO, qu'ils soit radicalaires ou non-radicalaires en plus des produits secondaires issus de la peroxydation lipidique (MDA, HNE), agissent sur les protéines en oxydant certains acides aminés (tableau I), en particulier sur les résidus de cystéine, méthionine et tryptophane qui seraient plus sensibles à l'oxydation (**Stadtman et Levine, 2003; MORGAN et al., 2008**).

Tableau II Produits issus par oxydation d'acides aminés

Acide amine	Produits après oxydations par les ROS, RNS
Cystéine	Radicale thyle, Acide sulfenique puis, Acide sulfinique et Acide sulfonique
Méthionine	Sulphoxyde de méthionine puis en sulfone
Histidine	2-oxo-histidine
Proline et Arginine	Glutamate semi aldéhyde
Tryptophane	<i>N</i> -formylkynurenine (305), Peroxyde et radicale peroxyde
Phénylalanine	Ortho-, para- et meta-tyrosine et Nitrophenylalaline

Les ERO oxydent aussi la chaîne polypeptidique en enlevant un atome d'hydrogène sur le carbone alpha d'une liaison peptidique créant un radical centré sur le carbone, puis, en présence d'O₂, devient un radical peroxyde (ROO[•]) (**Berelette et Stadtman, 1997**).

L'oxydation des protéines mène à leur inactivation, perte de leurs fonctions, crée des liaisons croisées protéine-protéine et induit leur dénaturation (**Butterfield et al., 1998**).

I.1.2.5 Rôles des ERO

Les ERO remplissent des fonctions primordiales contribuant au maintien de l'homéostasie dans l'organisme. En effet ces espèces ont des rôles importants à jouer que ce soit dans les processus physiologiques ou physiopathologiques. Dans la signalisation cellulaire, ils peuvent agir comme seconds messagers(Dröge, 2002; Poljsak et Milisav, 2012), contrôler l'expression des gènes indirectement ou directement en les inhibant ou en les activant . Ils interviennent dans la différenciation cellulaire, la vasodilatation capillaire, l'apoptose et la prolifération cellulaire. D'ailleurs leurs effets pro-prolifératifs facilitent la guérison des plaies cutanées (McDonald, 2014). Les ERO sont nécessaires au bon fonctionnement neuronal, à l'activité de certaines enzymes et sont primordiales pour l'action de l'insuline (Graes, 2012). Quand on fait de l'exercice de manière modérée, l'organisme produit des RL qui agissent comme antioxydant (Gomez-Cabrera, Domenech et Viña, 2008). Enfin les ERO interviennent dans la réponse immunitaire que ça soit en tant que second messagers en induisant l'expression des gènes de défense (notamment les protéines antioxydantes) ou en combattant directement les agents pathogènes, comme décrit la première fois en 1993 par Baldrige "*Oxidative burst*" ou explosion oxydative, dans les polynucléaires où se déroule une production importante d'ERO détruisant l'ensemble des composants des bactéries .

I.1.3 Physiopathologie du stress oxydatif:

Le stress oxydatif est impliqué dans une centaine de pathologies, il peut être la cause directe de leur apparition, comme il peut se manifester comme une conséquence de la maladie et contribuer à sa persistance et son aggravation.

Le cerveau a une faible capacité antioxydante, riche en AGPI et c'est l'organe qui consomme le plus d'oxygène, ce qui le rend très exposé au stress oxydatif. Ce dernier est associé à certaines maladies neurodégénératives dont Alzheimer et Parkinson (Aruoma et al, 2006).

L'attaque des RL sur les protéines modifie leurs structures peut conduire à l'apparition de maladies auto-immunes comme c'est le cas du lupus érythémateux systémique (Scofield et al,2005) et le diabète mellitus (Trigwell et al, 2001)

Un stress oxydatif persistant initie des mutations et altère la régulation d'expression de gènes et pourrait contribuer à l'apparition de cancers (Dahmane et Poljšak, 2011).

I.1.3.1 Stress oxydatif et maladies cardiovasculaire :

Bien que la production d'ERO contribue au maintien de l'homéostasie du système vasculaire, quand elle n'est pas régulée, elle induit des lésions et inflammations au niveau vasculaire (Thomas et al, 2008), provoque un dysfonctionnement endothélial, la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, (Kattoor et al, 2017), dérégulation de la mort cellulaire et le remodelage cardiaque. Les facteurs de risques des MCV comme le diabète, le tabagisme ou une prédisposition génétique provoquent un stress oxydatif qui participera à la pathogenèse de ces maladies (Xu et al, 2019). L'excès des ERO est trouvé dans toutes les MCV et leurs sources sont relativement les mêmes.

- **Les mitochondries:** abondantes dans les myocytes où une surproduction d'ERO causée par les CRM active les voies de signalisations de morts cellulaires dans le myocarde. Cette surproduction dans les mitochondries est observée dans les lésions d'ischémie reperfusion myocardique (Granger et Kvietys, 2015)

Les mono-amine oxydases (MAO) des mitochondries augmentent les niveaux du H₂O₂ dans la mitochondrie et le cytosol endommageant les organelles provoquant la nécrose des myocytes et l'insuffisance cardiaque (Santin et al, 2016)

- **La NADPH oxydases:** sa forte activité est corrélée avec les anomalies du système cardiovasculaire dont l'infarctus du myocarde (Heymes et al, 2003), l'oxydation des LDL (oxLDL), la formation de la plaque athérosclérotique (Ebrahimian et al, 2011). L'isoforme NOX2 dans les myocytes est activée par des récepteurs de l'angiotensine II et génère du O₂⁻ puis d'autres ERO apparaissent.

- **La NITRIC OXYDE SYNTHASE endothéliale (eNOS):** découplée (d'hétéro-dimère en homo-dimère). Cette modification structurale est médiée par l'activation des NOX ou causée par déficience du cofacteur de l'eNOS, le tetrahydrobioprotéine (BH₄). Cette déficience en BH₄ peut être due à son oxydation par le ONOO⁻ (Förstermann et Münzel, 2006). La eNOS découplée provoque la diminution de la biodisponibilité du NO[•], produit des ERO qui stimulent l'activation des métalloprotéases matricielle (MMP) du myocarde impliquées dans le remodelage du ventricule gauche (Hayashidani et al., 2003) .

- **Les Xanthines Oxydases (XO):** leur activité est élevée chez les sujets atteints de maladies coronariennes (Xu, 2019). Les ER produites par les XO endommagent les cellules du myocarde entraînant la nécrose durant les lésions d'ischémie/reperfusion (Pacher et al., 2006). La XO intervient dans l'athérosclérose en oxydant les LDL (Patetsios et al., 2003) et

en participant à la transformation des macrophages en cellules spumeuses (**Chistiakov et al, 2017.,Dai et al., 2017**) .

•**Les Myéloperoxydases (MPO):**L'activité excessive de l'enzyme est directement associée avec le dysfonctionnement endothéliale et peut conduire aux MCV (**Anatoliotakis et al., 2013**). Les ER issues des MPO activent les métalloprotéases et peuvent donc initier l'athérogénèse (**Fu et al., 2001**)

Tout ces producteurs d'ERO interagissent entre eux dans les conditions pathologiques aggravant la situation et provoquent un stress oxydatif sans fin (**Sahoo et al, 2016**).

I.1.4 Le système de défense antioxydant

L'organisme fait face aux excès de production (endogène) ou d'introduction (exogène) des ERO, par des molécules protéiques ou d'une autre nature, synthétisées in vivo ou provenant de l'alimentation (Tableau III). Ces substances sont appelées antioxydantes. "Un antioxydant (AOX) peut être défini comme toute substance qui retarde, empêche ou élimine les dommages oxydatifs d'une molécule cible." (**Halliwell et Gutteridge, 2015**). Il est à noter que différents antioxydants réagissent avec différentes ERO en quantités variables, dans divers sites tissulaires et cellulaires, protégeant différentes cibles moléculaires.

Le mécanisme antioxydant peut se dérouler de différentes manières :par séquestration de métaux de transition qui sont des catalyseurs de la formation de RL, en piégeant les ERO directement; en mettant fin à la chaîne de propagation de RL et enfin en réparant les molécules endommagées par les ERO.

Tableau III Antioxydants endogènes et exogènes

Antioxydant endogènes		Antioxydant exogènes
Non enzymatique	enzymatique	

Le Glutathion (GSH)	Superoxydodismutase (SOD)	Vitamine C (Acide ascorbique)
L'acide urique	Glutathion peroxydase (GPx)	Vitamine E (Alpha tocophérol)
Mélatonine	Catalase (CAT)	Caroténoïdes
		Flavonoïdes

I.1.4.1 Les antioxydants enzymatiques endogènes

Les trois enzymes, CAT, GPx et SOD, sont considérées comme étant la première ligne de défense antioxydante dans l'organisme, où ils catalysent la conversion des ERO en des molécules plus stables (Ighodaro et Akinloye, 2018).

a) La superoxyde dismutase SOD

La SOD est considérée comme l'agent antioxydant le plus important de la cellule et est la première à entrer en jeu en catalysant la dismutation de deux $O_2^{\cdot-}$ pour produire le H_2O_2 et O_2 . C'est une métalloenzyme nécessitant un cofacteur métallique pour son activité. Il existe 3 isoformes de SOD chez les mammifères différenciées par leurs localisations et leurs cofacteurs. Le cuivre pour les Cu/Zn-SOD, le zinc contribue à sa stabilité, deux types de Cu/Zn-SOD existent, La SOD 1 cytoplasmique, un homo-dimère de 32 kDa et la SOD 3 extracellulaire, un homo-tétramère de 135kDa. Le manganèse est le cofacteur de la SOD 2 mitochondriale (Mn-SOD), un homo-tétramère de 96 kDa (Marklund, 1982).

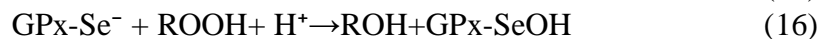
b) La catalase (CAT)

Protéine tétramérique de 240 kDa (4 sous-unités de 60 kDa), principalement située dans les peroxysomes des mammifères et absente des mitochondries, sauf chez les mitochondries de cœur de rats (Radi *et al.*, 1991). L'enzyme utilise le fer ou le manganèse comme cofacteur pour catalyser la dégradation ou la réduction par dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire (réaction (14)) (Chelikani, Fita et Loewen, 2004) empêchant ainsi la formation du OH^{\cdot} par la réaction de Fenton et de l'acide

hypochloreux via les MPO. L'enzyme est très efficace et peut dégrader près d'un million de H₂O₂ en une seconde (Ighodaro et Akinloye, 2018).
$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2(14)$$

c) La glutathion peroxydase(GPx)

Il existerait 8 isoformes de GPx dans l'organisme, GPx1-GPx8 (Morón et Castilla-Cortázar, 2012). Les mieux connues sont laGPx 1cytoplasmique et mitochondriale, la GPx 2cytoplasmique (abondante dans le tractus gastro-intestinal) et La GPx 3 extracellulaire. GPx (1, 2 et 3) sont tétramériques, contenant chacune leurs cofacteurs dans leurs sites actifs, le sélénium (Se) sous forme de sélénocysteine. La GPx4 diffère des autres de sa structure (monomère) et fonction, étant la seule GPx dégradant les hydroperoxydes phospholipidiques. L'enzyme catalyse la réduction du H₂O₂ en H₂O (réactions(15)) et la réduction d'autres peroxydes (réaction(16)) en alcool, le glutathion réduit (GSH) lui sert de donneur d'hydrogène en s'oxydant (GSSG) (Brigelius-Flohé et Maiorino, 2013) .



I.1.4.2 Les antioxydants non-enzymatiques endogènes

a) **L'Acide Urique (AU)** est l'antioxydant hydrophile le plus puissant chez l'homme, l'AU piège préférentiellement le ONOO⁻ avec l'aide de la vitamine C et thiols. Il agit aussi en piégeant OH[•], HOCl, ¹O₂ et le dioxyde NO₂ et se transformant en une molécule inoffensive.

b) **Le Glutathion réduit (GSH)** est une molécule hydrosoluble, protège les protéines des dommages oxydatifs pouvant être causée par les ERO en réduisant ces dernières. Le GSH régénère d'autres antioxydants comme les vitamines C et E et participe au fonctionnement d'enzymes antioxydantes comme la GPx .

c) **La mélatonine** agit indirectement contre la formation des RL en stimulant l'expression d'enzymes anti-oxydante, inhibe des enzymes productrices d'ERO comme la NOs. Les métabolites de la mélatonine agissent directement comme antioxydants en piégeant les OH[•], NO, ¹O₂, ONOO⁻

I.1.4.3 Le système de défense antioxydant exogènes

Ces antioxydants sont exclusivement apportés par l'alimentation sont tout aussi primordiales dans l'organisme que les AOX endogènes pour combattre les ERO. D'ailleurs, les interactions entre AOX endogènes et exogènes font parti de leurs modes d'actions respectifs.

a) **La Vitamine E** est une grande famille de molécules liposolubles pouvant mettre un terme à la peroxydation lipidique en piégeant les LOO^\bullet , elle augmente l'activité d'enzymes antioxydantes. Elle est utilisée pour prévenir les maladies cardiovasculaires.

b) **La Vitamine C** ou Acide ascorbique, est une molécule hydrosoluble, elle agit comme antioxydant en piégeant des RL et comme co-antioxydant en régénérant d'autres antioxydants comme la vitamine E.

c) **Les flavonoïdes** sont un groupe de molécules trouvées dans les fruits et légumes. Ce sont de puissants antioxydants, capables de piéger directement les RL ou empêcher leurs formations en séquestrant les métaux de transitions.

d) **Les caroténoïdes** sont une grande famille de molécules, la plus connue est le β -carotène . Ce sont de puissants antioxydants ayant le pouvoir de neutraliser $^1\text{O}_2$, et de rompre les réactions en chaînes radicalaires

I.2 La vitamine E

I.2.1 Généralités

Molécule liposoluble obtenue exclusivement par l'alimentation est considérée comme l'antioxydant le plus important inhibant la peroxydation lipidique (Niki, 2014). Découverte la première fois en 1922 comme étant un élément nutritif important pour une reproduction normale chez les rats, plusieurs expériences ont été effectuées après cette date, jusqu'à ce jour.

le tableau ci- dessous montre quelques unes des premières découvertes sur la vitamine E

Tableau IV: Importantes decouvertes sur la vitamine E (non exhaustive)

Année	Découverte
1922	L'existence de la vitamine E est reconnue par Bishop et Evans, comme facteur liposoluble qui empêche la mort fœtal chez les animaux. On l'appela facteur X
1924	Le facteur X devient vitamine E
1925	Evans propose le nom "Tocophérol" du grec "tos" pour naissance, "phero" pour "porter" et "ol" pour le groupement alcool de la molécule.
1930	Caractérisation de symptômes dus aux déficits en vitamine E chez différents animaux
1938	Fernholz élucide la structure de la vitamine E. Kerrer synthétise la vitamine E
1967	Etude de Bunyan et al sur l'impact antioxydant de la vitamine E sur les acides gras polyinsaturés

(Weber *et al.*, 2002)

I.2.2 Structure de la vitamine E:

La vitamine E regroupe deux grandes familles de molécules, Tocophérol et Tocotriénol, chaque famille est divisée en 4 petites familles (vitamères) qui sont alpha, beta, gamma et delta. Toutes ces molécules ont en commun:

- Une chaîne latérale à 16 atomes de carbones responsable de la lipophilicité de la molécule. Les tocophérols ont une chaîne saturée tandis que celle des tocotriénols est insaturée.
- Un noyau 6-chromanol (ou 6-hydroxy-chromane) où la chaîne latérale est liée avec le carbone C2 du noyau. La nature du vitamère est définie par la substitution méthyle en C5, C7 et C8

Huit stéréo-isomères sont possibles théoriquement pour chaque vitamère de chacune des deux familles, ces configurations sont déterminées par les carbones asymétriques (C2, C4, C8),

donnant ainsi 32 stéréo-isomères pour chaque familles. La configuration de la forme naturelle est en R dans chaque carbone asymétrique .L'alpha-tocophérol est l'isoforme la plus trouvée chez l'homme.

La (figure 04) (**Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2007**) illustre la structure de la forme naturelle RRR- α -tocophérol et les points de distinctions entre familles et entre vitamines.

La vitamine E de synthèse "industrielle", peut se trouvée sous deux forme:

- RRR- α -tocopherol, naturelle, produit par méthylation du gamma-tocophérol isolé des huiles végétales
- all-rac- α -tocophérol, produit de synthèse de triméthylhydroquinone avec de l'isophytol .

Dans les deux cas, on les traite par estérification pour éviter leur oxydation.

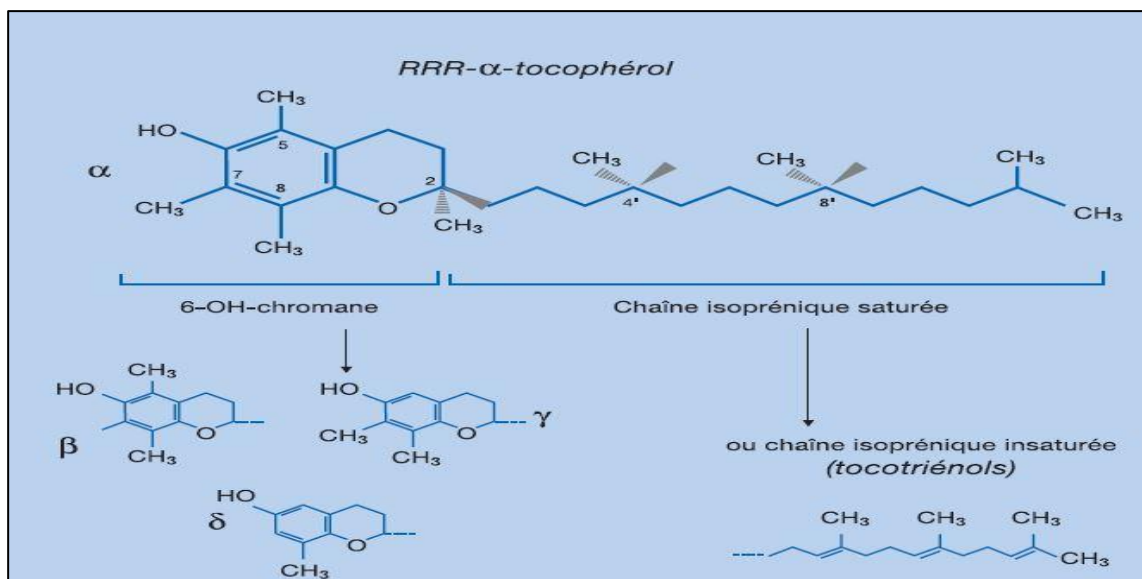


Figure 4. Structure du RRR-alpha-Tocophérol et des différents vitamerès (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2007)

I.2.3 Sources naturelles de vitamine E:

Les sources naturelles de la vitamine E sont d'origine végétale et animale. On peut la trouver dans les huiles végétales comme l'huile de germe de blé, de tournesol, d'olive et de colza, dans les cacahuètes, amandes, avocats, mangues, mures, kiwi et bien d'autres végétaux. Chez les animaux, on la trouve dans la viande d'oie et chez plusieurs animaux marins dont le saumon et le homard (Cuvelier, Dotreppe et Istasse, 2003).

I.2.4 Propriétés physicochimiques

Les Propriétés physicochimiques de la vitamine E sont mentionnées dans le tableau (V)

Tableau V: Propriétés physicochimiques de de la vitamine E l'alpha tocophérol

Nom UICPA	(2R)-2,5,7,8-Tétraméthyl-2-[(4R,8R)4,8,12 triméthyltridécyl]-3,4-dihydrochromen 6 ol
Formule moléculaire	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
Poids moléculaire	430,7 g mol ⁻¹
Description physique	Légèrement jaune à ambre, presque

	inodore, une huile claire et visqueuse
Point de fusion	3 °C
Point d'ébullition	235 °C
Solubilité	Insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol
Stabilité	Instable à la lumière UV, à l'alcalinité et à l'oxydation
Absorption UV maximale	292 nm dans de l'éthanol
Excitation de fluorescence	290-295 nm

(Niki, 2014)

I.2.5 Métabolisme de la vitamine E

Le métabolisme de la vitamine E sous toutes ses formes est un processus complexe dont les événements clé sont l'absorption intestinale de la vitamine E, son transport, et enfin, des tris sélectifs entre isoformes de vitamine E et/ou leurs dégradations en métabolites qui se déroulent dans le foie.

Après une première digestion pancréatique, la vitamine E est empaquetée avec les autres lipides pour former des micelles mixtes dans la lumière intestinale où elle est par la suite prise en charge par des protéines transmembranaire NPC1L1 "*Niemann Pick C1-Like Protein 1*" SR-B1 "*Scavengersreceptors-class B type 1*" et CD36 "*Cluster of differentiation 36*" pour franchir la barrière des cellules de l'épithélium intestinal dont les entérocytes. Ces dernières secrètent la vitamine E via des chylomicrons dans la lymphe intestinale ou avec les lipoprotéines dans la circulation sanguine, ces sécrétions impliquent une autre protéine ABCA1 "*ATP-Binding Cassette A1*" (Schmölz, 2016).

Dans le foie, les différentes isoformes de vitamine E sont soumises à un tri sélectif, les dirigeant soit

- vers leurs dégradations en différents métabolites, par des cycles de ω -hydroxylation et de β -oxydation des chaînes latérales dans le réticulum endoplasmique, le peroxysome et la mitochondrie.
- soit vers leur protection, l' α -TTP "*alpha tocopherol transfert protein*" est une protéine très exprimée dans le foie et privilégie l'isoforme α -Tocophérol de toutes les autres avec une affinité de 100%, sa fonction est de contrôler la concentration de l' α -T dans le plasma et les tissus extra-hépatiques.

I.2.6 Rôles de la vitamine E

Outre son action antioxydante, la vitamine E et certains de ses métabolites sont impliqués dans la signalisation cellulaire, dans la régulation de l'expression de gènes et l'activité de certaines **enzymes (RICCIARELLI, ZINGG et AZZI, 2001)**. Les découvertes sur ces processus ne cessent de croître ces dernières années et stipulent que la vitamine E et ses métabolites participent à l'induction de l'apoptose (**Weber *et al.*, 2002**), la survie cellulaire, régulent la réponse immunitaire (**Hedayati *et al.*, 2018**) et améliorent la fonction endothéliale en inhibant indirectement l'agrégation plaquettaire (**Freedman et Keaney, 2001**).

I.2.6.1 Action anti-oxydante de l'alpha tocophérol

L'alpha tocophérol (α -TOH) protège les membranes phospholipidiques en mettant un terme à la peroxydation lipidique. L' α -TOH cède un atome d'hydrogène à un radical peroxyde lipidique (LOO^\bullet) (réaction(17)), rendant ce dernier plus stable et brisant ainsi la chaîne de peroxydation des lipides. $\alpha\text{-TOH} + \text{LOO}^\bullet \rightarrow \alpha\text{-TO}^\bullet + \text{LOOH}$ (17)

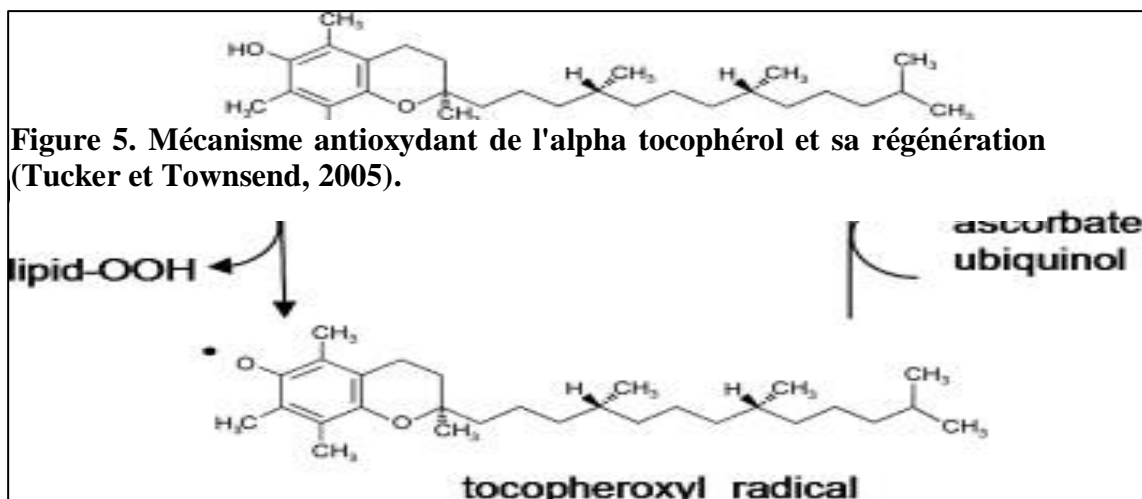
(Upston, Terentis et Stocker, 1999)

Le radical tocophéroxyl $\alpha\text{-TO}^\bullet$ résultant peut à son tour réagir avec un peroxyde lipidique pour former un produit stable (réaction (18)). $\text{LOO}^\bullet + \alpha\text{-TO}^\bullet \rightarrow \alpha\text{-TO-OOL}$ (18)

(Weber *et al.*, 2002).

L'alpha tocophérol peut être régénéré de sa forme oxydée, le radical α -tocophéroxyl via un co-antioxydant, la vitamine C, en combinaison avec le GSH. Même si $\alpha\text{-TO}^\bullet$ est liposoluble et que la vitamine C (AscH) est hydrosoluble, la régénération peut se produire grâce au positionnement du noyau chromanoxyle de $\alpha\text{-TO}^\bullet$ qui flotte à l'interface des membranes, ce qui permet à l'(AscH) de réduire le radical $\alpha\text{-TO}^\bullet$ en $\alpha\text{-TOH}$, (réaction(19)) (Figure 5) (**Tucker et Townsend, 2005**).

$\alpha\text{-TO}^\bullet + \text{AscH}^- \rightarrow \alpha\text{-TOH} + \text{Asc}^{\bullet-}$ (19)(Weber *et al.*, 2002).



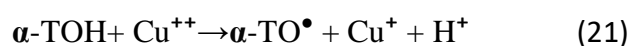
I.2.6.2 Action pro-oxydante de l'alpha tocophérol:

L' α -TOH s'oxyde en α -TO \bullet pour rompre la peroxydation lipidique dans les membranes phospholipidiques et les LDL, cependant si l' α -TOH n'est pas assez rapidement régénérée par les co-antioxydants, ou que l' α -TO \bullet ne rencontre pas d'autre radicaux pour se stabiliser, l' α -TO \bullet peut arracher un atome d'hydrogène aux AGPI (réaction(20)) (Niki, 2014), on parle de peroxydation médiée par les tocophérols (TMP) (figure 06) (Rietjens *et al.*, 2002), toutefois cette réaction est nettement plus lente que celle initiée par un peroxyde lipidique



Ces effets pro-oxydants ont été observés *in vitro* et *in vivo*, dans les LDL (Kontush *et al.*, 1996), l'acide linoléique (Bakir *et al.*, 2013), où ils dépendent de la concentration en vitamine C et des métaux de transitions comme le cuivre (Cu).

L'alpha tocophérol agit comme co-pro-oxydant en réduisant les ions métalliques (réaction (21) (Burkitt et Milne, 1996), contribuant ainsi à la promotion de la réaction de Fenton et la génération du OH \bullet .



En 2013, (Wannamethee *et al.*, 2013) Suggèrent que ce mécanisme pro-oxydant pourrait être la cause de l'atteinte du myocarde expliquant l'association d'un apport élevé en vitamine E et le risque d'insuffisance cardiaque chez des personnes âgées.

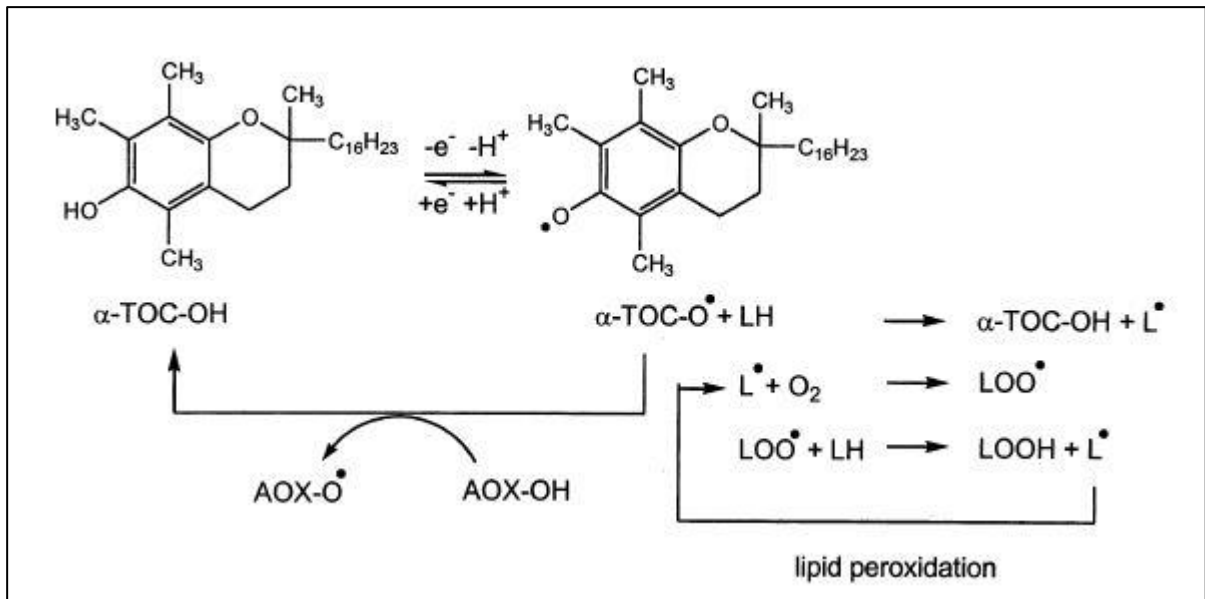


Figure 6. Action pro-oxydante de l'alpha tocophérol (Rietjens *et al.*, 2002)

Chapitre II

MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériel

II.1.1 Lieu de stage

Notre étude s'est étalée du mois de Mars jusqu'au mois de Septembre . Elle consiste en une réalisation d'une expérimentation animale au niveau de l'animalerie du Centre de recherche et de développement (Saidal/El-Harrach), afin de mettre en évidence les effets de la supplémentation de l' α -T à différentes doses sur le poids corporel et le tissu cardiaque

II.1.2 Animaux étudiés

Trente-trois (33) rats mâles de souche Wistar avec des poids variant de 70 à 115 g nous ont été fournis de la part du centre d'élevage de l'institut Pasteur de KOUBA.

L'élevage s'est déroulé dans l'animalerie du Centre de recherche et de développement (Saidal/El-Harrach) sur une période de 12 semaines. Les rats sont mis dans des cages en polyéthylène, tapissées d'une litière en copeaux de bois, cette dernière est changée tous les trois jours, la température de l'enceinte est de 25 ± 2 °C, l'hygrométrie ajustée à 35° et le cycle lumière/obscurité est de 12h/12heures. (Figure 6)

Les rats ont été soumis à une phase d'adaptation d'une semaine avant la supplémentation du régime standard (RS) en α -T. Leur pesée s'effectuait tout les 4 jours.



Figure 7. Les rats mis en cage (photo originale)

II.1.3 Expérimentation

11 lots de 3 rats chacun ont été repartis en fonction de la dose en vitamine E qui leur a été administrée (Tableau VI) et ceci pendant les 12 semaines d'expérimentation.

Tableau VI : Répartition des lots et régimes alimentaires

Lot	Supplémentation du RS en α -T (mg/Kg d'aliment)
Régime standard	0
RSE ₅₀₀	500
RSE ₆₀₀	600
RSE ₆₅₀	650
RSE ₇₀₀	700
RSE ₇₅₀	750
RSE ₈₀₀	800
RSE ₈₅₀	850
RSE ₉₀₀	900
RSE ₉₅₀	950
RSE ₁₀₀₀	1000

II.1.4 Supplémentation de l'aliment

La nourriture nous a été fournie par l'Office National des Aliments de Bétail (ONAB). Elle est administrée aux animaux sous forme de poudre dans des boîtes de Pétri (Figure 7) à raison de 30g/jour/rat selon les quantités recommandées par Jadot (**Jadot, 1981**), cette préparation est changée chaque jour.

Les aliments sont préparés tous les 2 à 3 jours par fraction de 200 à 300g d'aliment et sont gardés à 4°C dans des boîtes hermétiques.

La vitamine E de la marque NUTRIVITA® (France) est sous forme de poudre d'acétate dl- α -tocophérol à 22,5% de principe actif (Figure 8)

La teneur des différents aliments constituant le régime à l'exception de l' α -T est semblable pour tous les lots (**Annexe 01**).



Figure 8. Aliments fournis aux rats (Photo originale)



Figure 9. La vitamine E utilisée sous forme de poudre (Photo originale)

Matériel non-biologique (Annexe 02)

II.2 Méthodes

II.2.1 Sacrifice et prélèvements

Suite aux 12 semaines d'expérimentation. Chaque rat est pris à part et subit :

- une anesthésie via du chloroforme;
- une dissection: on met le rat sur sa face dorsale sur une planche ou on y fixe ses membres avec des épingles. Avec une pince à disséquer, on soulève la peau de l'orifice prénuptial pour inciser à ce niveau avec des ciseaux fins et continuer sur l'axe de symétrie jusqu'à la base de la cage thoracique. On fait une incision de l'abdomen pour ouvrir la cavité abdominale et découper la cage thoracique pour prélever le cœur.

Les cœurs sont prélevés et lavés abondamment avec de l'eau physiologique (9% de NaCl) pour éliminer le surplus de sang du tissu cardiaque qui est très vascularisé, l'organe est ensuite fragmenté à l'aide d'un scalpel en petits morceaux.

Les fragments destinés aux dosages (CAT, SOD, GPx) sont mis dans des ependorfet congelés à -20°C. Les fragments destinés à l'histologie ont été fixés dans une solution de formol dilué à 10% dans des tubes conservés à l'abris de la lumière pour la bonne conservation des tissus.

II.2.2 Traitement des prélèvements et confection des coupes histologiques

La préparation des lames histologiques s'est effectuée au laboratoire d'anatomopathologie du centre hospitalo-universitaire Mustapha-Bacha d'Alger. Ou on s'est entraîné à mener à bien la technique, de la fixation jusqu'à l'observation au microscope photonique.

- **La fixation:** On a fixé les fragments de cœur juste après les avoir prélevé dans du formol dilué à 10%, le volume des fragments ne dépassant pas le centimètre cube (1cm³), on les met dans un tube avec 5ml du fixateur, c'est-à-dire 5 fois leurs volumes. Ce fixateur permet la conservation des tissus et le durcissement des pièces.

- **Déshydratation et clarification:** Consiste à faire sortir l'eau du tissu pour pouvoir l'inclure en paraffine car cette dernière est hydrophobe. Cette étape s'est faite par l'automate de traitement de tissus (Leika) (États-Unis). La déshydratation se fait par immersion des tissus dans des bains successifs d'alcool (éthanol) de degrés croissants (70%, 80%, 90% et 100%). La paraffine n'est pas miscible dans l'alcool, donc on le remplace par le xylène (clarification) qui est miscible à la paraffine.
- **Inclusion en paraffine et mise en bloc:** Avec une station d'enrobage ou appareil à inclusion. Le tissu est dans un moule ou il est imprégné et enrobé de paraffine fondue à 55°C, on le laisse refroidir sur une plaque réfrigérée pour obtenir un bloc.
- **Confection des coupes :** *via* un microtome (Leika) (États-Unis), le bloc de paraffine est coupé à une épaisseur de 3µm, nous donnant de fins rubans de paraffine qu'on met par la suite dans un bain marie à 40°C. On étale ces rubans sur des lames puis on les fait sécher dans une étuve pendant une heure à 37°C.
- **Déparaffinage :** immersion des lames dans deux bains de xylène (2 minutes pour chaque bain)
- **Réhydratation :** les lames passent par des bains d'alcool de degrés décroissants (100- 90- 80- 70) puis par un bain dans de l'eau distillée
- **Coloration:** la coloration Hématoxyline-éosine permet d'accentuer les contrastes et colore les noyaux en violet (hématoxyline) et les cytoplasmes en rose (éosine). Les lames passent par un bain d'hématoxyline pendant 2 minutes, un rinçage à l'eau puis un bain de 30 secondes dans l'éosine.
- **Déshydratation :** dans des bains d'alcool de degrés décroissants (100, 90, 80, 70) puis dans 2 bains de xylène.
- **Montage :** on met une goutte de résine de montage (Eukit) sur la lame, puis on étale cette résine sur toute la coupe en utilisant une lamelle pour recouvrir tout le tissu de résine. On fait sortir les bulles d'air à l'aide d'une pince.
- **Lecture des lames:** s'effectue au microscope photonique sous grossissement (Gr) (×10 puis×40) puis des photos micrographiques sont prises.

Nous tenons à noter que le dosage des paramètres du stress oxydatif (l'activité de la catalase, le taux en MDA) chez les rats de souche n'ont malheureusement pas pu être réalisé à cause de la pandémie du COVID19.

II.2.3 Dosages des protéines

A) Principe

Le dosage des protéines totales est déterminé par la méthode de Lowry et al, (1951).

C'est une mesure colorimétrique où l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu à une solution protéique donne une coloration bleue foncée.

Cette coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de

L'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. On réalise

Une gamme étalon de solution 25 d'albumine à 1mg/ml (Annexe 04), l'absorbance est

Mesurée à 750 nm après le développement de la couleur pendant 45 min à l'abri de la lumière

(Lowry et *al.*, 1951).

B) Mode opératoire

a) Extraction des protéines

- 9ml d'une solution de triton X-100 (0.5%) sont mis dans un tube Potter en présence De 100 mg de l'échantillon du cerveau,
- l'échantillon est broyé par un broyeur homogénéisateur de Potter Thomas pendant 1min.
- 1ml de TCA à 1% est mis dans un tube en verre contenant 100 µl de l'homogénat, Centrifugation à 4000 tr/min pendant 15min,
- le surnageant est éliminé, et le culot est repris dans 1ml de TCA à 1% et centrifugé à 4000 tr/min pendant 15min,
- le surnageant est éliminé une deuxième fois, les bords supérieurs des tubes sont Séchés par la suite avec du papier filtre,

le culot est repris dans un mélange;alcool/éther (v/v) et centrifugé à 4000 tr/min

Pendant 5min.

- le surnageant est jeté, les bords supérieurs des tubes sont séchés par la suite avec du Papier filtre,
- lavage avec 1ml d'éther éthylique, et centrifugation à 4000 tr/min pendant 5min,

Le culot parfaitement séché à l'air chaud, est repris dans 1 ml de NaOH (1M).

b) Préparation des solutions de dosage (Annexe 03)

Solution A

Solution B

c) Dosage des protéines

- 1ml de la solution A est ajouté à 200 µl d'homogénat, l'ensemble est agité au vortex,
- l'échantillon est incubé 10 minutes à température ambiante,
- le mélange est alors mis en présence de 100 µl de réactif de la solution B,
- après 45 minutes, la densité optique à 750 nm est mesurée au spectrophotomètre contre l'eau bi-distillée (blanc).

d) Préparation de la courbe étalon

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

Dosage du Malondialdéhyde

A. Principe

Le dosage du Malondialdéhyde est utilisé pour mettre en évidence la peroxydation lipidique. Après traitement acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit chromogène de couleur rose consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à 532 nm (Draper, 1993).

B. Mode opératoire

- broyer 100 mg de l'échantillon de reins dans 9ml de tampon phosphate (0.2M à pH=7.4).

- 1ml de TCA à 10% sont mis dans un tube à essai, contenant 200µl d'homogénat.
- le mélange est mis à ébullition dans un bain marie à 100°C pendant 30min.
- après refroidissement, le mélange est versé dans des tubes secs et centrifugé à 4000 tour/min pendant 10min.
- un volume de surnageant est récupéré, auquel est ajouté un même volume d'une solution aqueuse de TBA saturée.
- ce mélange est mis à ébullition dans un bain marie à 100°C pendant 30min.
- après refroidissement, la densité optique est mesurée à 532nm

c) Expression des résultats La concentration du MDA est calculée selon l'équation suivante:

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

[MDA] : Concentration en MDA en n moles/mg de protéines.

DO : Densité optique lue à 532 nm.

[Protéines] : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

Dosage de la catalase

A. Principe

En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H₂O₂ en fonction du temps (Aebi, 1984)

B. Mode opératoire

- broyer 100mg de l'échantillon de reins dans 9ml de triton X-100 à 1% à l'aide d'un homogénéisateur de potter Thomas pendant 30-45 seconde sous glace
- préparer le tampon phosphate (50mM a pH=7) (Annexe 05)
- préparer la solution de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (30 mM) (tableau IV) (Annexe05)
- lire l'absorbance à 240nm pendant un temps de 3 min (point chaque 30 seconde)

C. Expression des résultats :

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

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

Tableau VII: Les différentes étapes de dosage de la CAT.

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

- V : volume de l'échantillon
- v : volume totale
- Temps de décomposition de H₂O₂
- A₁ : absorbance a t₀
- A₂ : absorbance a t (3min)
- X : quantité de protéines mg/ml

II.2.4 Etude statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée par le test de t-student en utilisant le logiciel XLSTAT, ce test a permis de comparer les moyennes des différents lots expérimentaux. Les résultats sont exprimés comme :

Moyenne plus au moins l'écart-type et sont considérés comme :

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

Avec (P) : seuil de signification.

Nous avons réalisé une analyse comparative du taux d'évolution entre les lots expérimentaux et le lot témoin.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Symptomatologie

Durant l'expérimentation animale, les rats nourris avec un régime standard supplémenté en doses croissantes d' α -T et allant de 500 à 1000 mg/kg d'aliment, n'ont présenté aucune anomalie particulière (diarrhées, perte de poils, hémorragies, ...), cette absence d'anomalies montre que la vitamine E n'a pas eu d'effets toxiques apparents sur l'animal; nos observations concernant le lot RES₅₀₀ corroborent avec ceux notés lors de l'étude réalisée par Abdou *et al.*, (1986), ces auteurs ont nourris des rats FICHER 344 d'un régime supplémenté en différentes doses d' α -T (125, 500, 2000 mg/kg d'aliment) sur une période de 13 semaines, ils ont observé des effets toxiques uniquement chez le troisième groupe, caractérisés par des diarrhées, une tachypnée, des saignements du nez, des selles foncées et une croûte rouge autour des yeux. Ils ont également notés la mort de 7 des 10 rats traités, et ceci après une durée de 11 semaines.

L'étude réalisée par Wheldon *et al.*, 1983 est une étude très intéressante car elle a montré chez les rats qui ont reçu des doses de 500, 1000 ou 2000 mg d' α -T /kg pc/jour pour une période entre 15 et 18 semaines, un développement des hémorragies dans l'intestin, les voies urinaires, les méninges, l'orbite et aux sites de blessures mineures. Cela a conduit à leur mortalité.

III.2 Effets de la supplémentation de l'alpha tocophérol en différentes doses sur le poids corporel

Les rats nous ont été procurés avec des poids hétérogènes, il est difficile de conclure sur l'effet de la supplémentation en α -T seulement en se basant sur les moyennes des poids. Nous avons donc calculé le taux de gain en masse corporelle (taux d'évolution) en pourcentage (%) de chaque lot du début à la fin de l'expérimentation (11 semaines).

Nous remarquons que le lot qui a le plus évolué est le lot RS avec une augmentation de 115 %, suivi des lots (de RSE₅₀₀ à RSE₇₀₀) avec des progressions entre 100 et 110 % . Le taux d'évolution en masse corporelle des lots (de RSE₇₅₀ à RSE₁₀₀₀) est en dessous de la barre des 90 % (Tableau VIII)

Tableau VIII Taux d'évolution du poids corporel

Lot	Evolution du poids corporel
RS	115 %
RSE ₅₀₀	100 %
RSE ₆₀₀	101 %
RSE ₆₅₀	110 %
RSE ₇₀₀	102 %
RSE ₇₅₀	89 %
RSE ₈₀₀	73 %
RSE ₈₅₀	70 %
RSE ₉₀₀	77 %
RSE ₉₅₀	72 %
RSE ₁₀₀₀	79 %

Après analyse statistique comparative entre le taux d'évolution de chaque lot supplémenté en α -T avec le lot témoin. Nous avons constaté que les diminutions sont non significatives ($p > 0,05$) pour les lots (de RSE₅₀₀ à RSE₇₀₀), significatives ($p < 0,05$) pour les lots (RSE₇₅₀ à RSE₉₀₀) et hautement significatives ($p < 0,001$) pour les lots RSE₉₅₀ et RSE₁₀₀₀.

De ces résultats nous pouvons conclure que le taux d'évolution du poids corporel des rats diminue significativement en fonction de l'augmentation des doses d' α -T administrées pendant 11 semaines. Nous illustrons ces résultats avec des courbes représentant l'évolution du poids corporel du lot témoin (RS) avec celle des lots (de RSE₅₀₀ à RSE₆₅₀) (Figure 10 ,A), (RSE₇₅₀ à RSE₉₀₀) (Figure 10 ,B) et (RSE₉₅₀ et RSE₁₀₀₀) (Figure 10. C) .

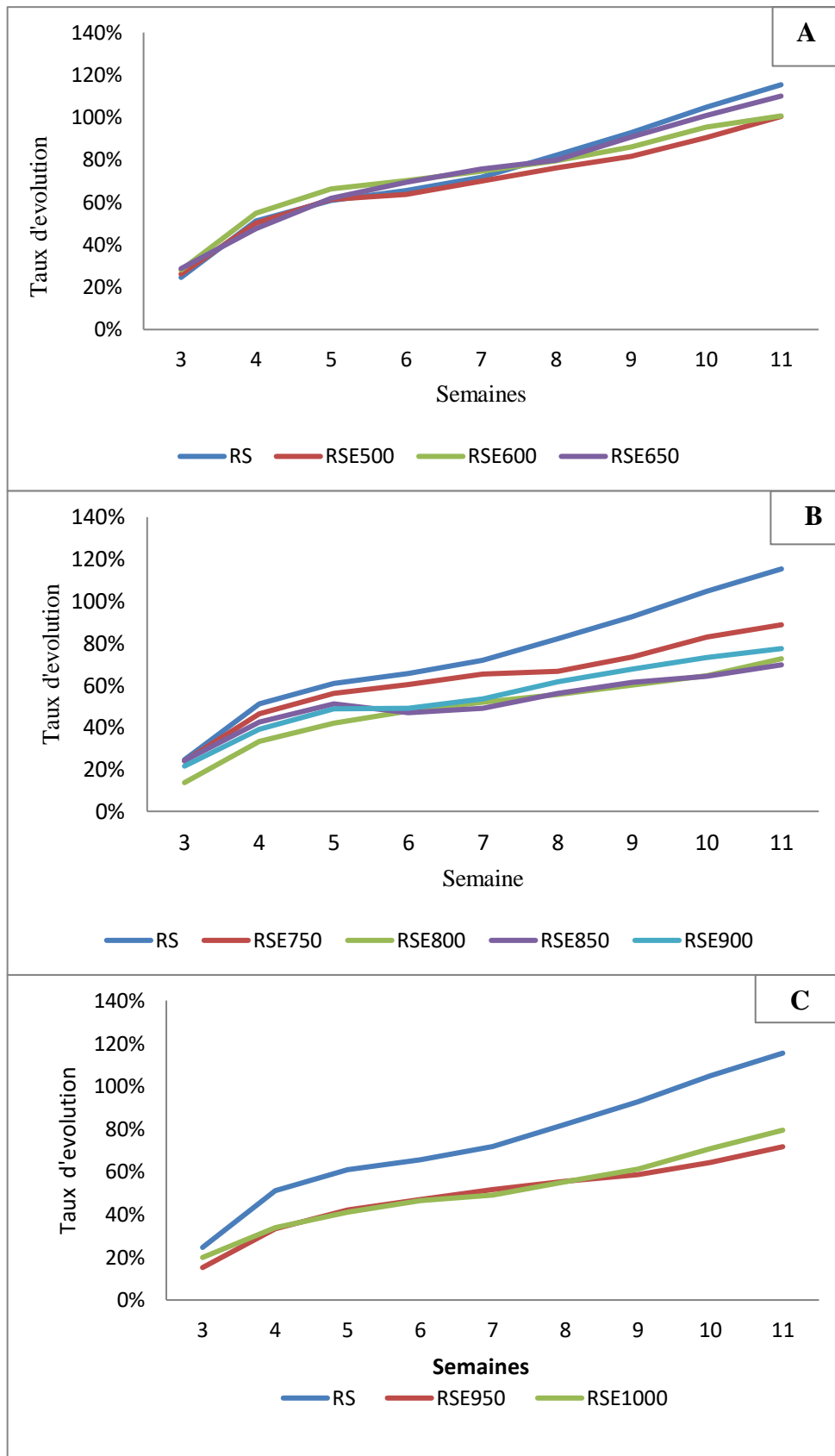


Figure 10. Taux d'évolutions du poids corporel du lot RS et des lots RSE

Nous remarquons que l'administration de doses élevées d' α -T pendant 11 semaines affecte le métabolisme et ralentie la prise de masse. Nielsen et *al.* (1985) démontrent que les lipides oxydés font baisser la croissance en réagissant avec les acides aminés diminuant l'utilisation digestives des protéines et des graisses . En 2004 Zingg et Azzi stipulent que la vitamine E n'a pas d'effet antioxydant dans le métabolisme . Nous supposons que les fortes doses de vitamine E administrées aux rats des lots (de RSE₇₅₀ à RSE₁₀₀₀) ont provoqué une oxydation des lipides par l'action pro-oxydante du radical tocopheroxyle (α -T \cdot) entraînant une lipolyse et une destruction des cellules adipeuses. Cet effet peut s'expliquer par l'absence de régénération de l' α -T par la vitamine C et d'autres co-antioxydants d'une part, et par la saturation des transporteurs de l' α -T, les α -TTP de l'autre. On suppose que la saturation des α -TTP engendre des accumulations excessives de molécules d' α -T dans les LDL et dans les membranes phospholipidiques provoquant leurs oxydations . Jackman et *al.*, (2008), expliquent que la toxicité d'un nutriment conduit à la perte de l'appétit .

Nos observations corroborent avec celles de Nascimento et *al.* en 2010 qui ont constaté que l'évolution de la masse corporelle de rats males Wistar diminue de manière significative avec la supplémentation de 250mg d' α -T/kg de rat pendant 6 semaines, en comparaison avec le témoin .

En 2014 Dahdouh et *al.* ont constaté une diminution significative du poids corporel chez des souris suisses albinos adultes traitée avec 2,7g de Nickel et supplémentées avec 1g d' α -T/kg d'aliment

Nos résultats ne corroborent pas avec El-Hak et *al.*, (2019) qui ont obtenu une augmentation non significative des poids corporels de groupes de rats males Albinos adultes supplémentés quotidiennement pendant 30 jours avec (500, 1000 et 2000) mg d' α -T/kg de rat par rapport au groupe témoin. La même année Górnicka et *al.*, démontrent que l' α -T accélère le gain en masse corporelle chez les rats males Wistar traités avec 2 mg α -T/jour pendant 14 jours . Cependant, nous émettons des réserves quant aux résultats de cette étude, en raison de la courte durée de l'expérimentation et à la dose assez faible d' α -t utilisée .

III.3 Effets de la supplémentation de l'alpha tocophérol sur le poids du cœur

Aucune différence significative n'a été observée entre les poids de cœurs des lots supplémentés en α -T et le lot témoin. Les augmentations et diminutions observées dans les lots RSE₆₅₀ RSE₅₀₀ respectivement par rapport au lot témoin s'expliquent par rapport à la fluctuation des poids corporel.

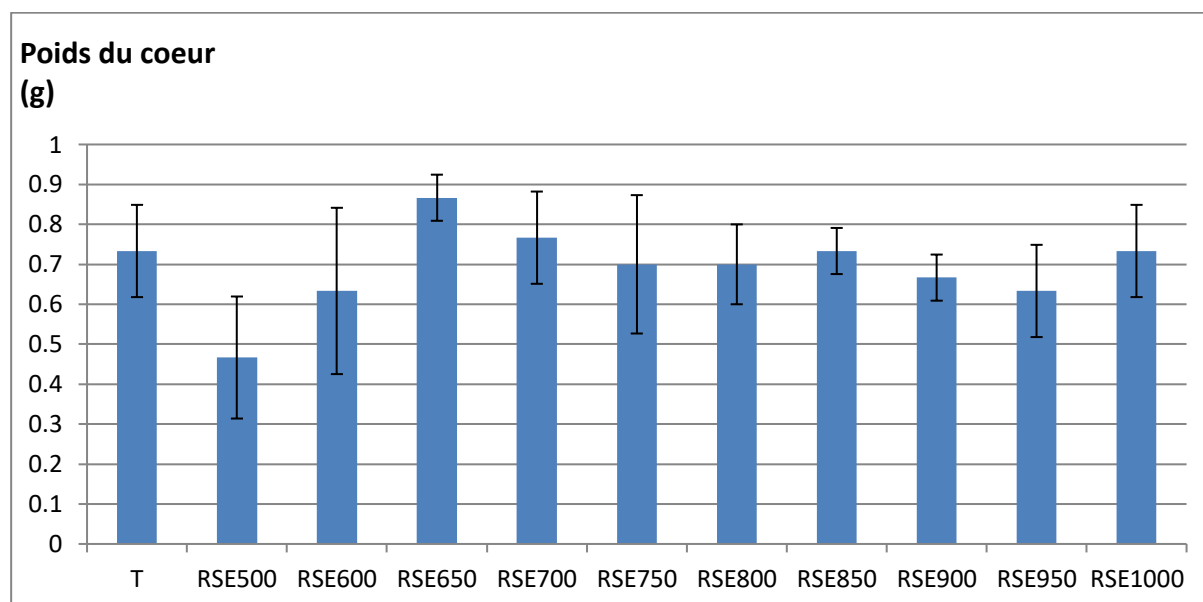


Figure 11. Effets de la supplémentation d'un RS en différentes doses d α -T sur le poids du tissu cardiaque des rats . Chaque barre représente la moyenne \pm l'écart type .

Nos résultats corroborent avec ceux de Nascimento et *al.* En 2010 qui ont eu une diminution significative des poids de cœurs chez les rats supplémentés avec 250mg d' α -T/kg de rat par rapport au lot témoin. Mais ils ont conclu que les poids étaient similaires pour les deux lots quand ils ont ajusté les poids cardiaques avec les poids corporels.

Par contre nos résultats ne corroborent pas avec ceux de Yang et Desai, en 1977, qui ont trouvé une augmentation dans le poids cardiaque des rats Wistar après suppléments de 8 mois avec (10,000 UI 25,000 UI) de vitamine E/kg d'aliment.

III.4 Effets de la supplémentation en différentes doses d'alpha tocophérol sur le tissu cardiaque

L'étude histologique sera traitée sous deux volets, d'abord les coupes histologiques des lots 500 et 600 mg d' α -T/kg d'aliment vu qu'il y'a absence de stress puis les lots 650 à 1000 mg d' α -T/kg d'aliment qui montrent la présence d'un stress.

- **Effets de supplémentation en p α -tocophérol pour les doses 500 et 600 mg d' α -T/kg d'aliment**

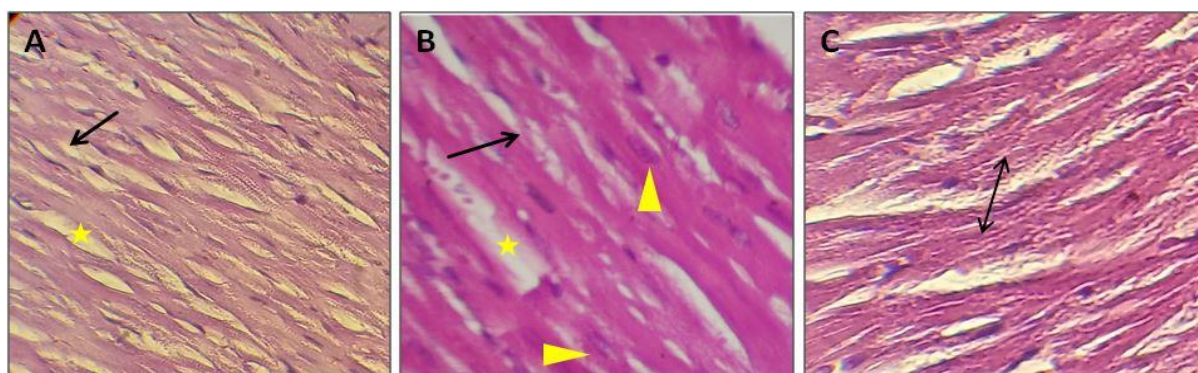


Figure 12. (A, B et C). Micrographies (x40, H&E) des tissus cardiaques des lots témoin (A), RSE₅₀₀ (B) et RSE₆₀₀ (C) avec : (flèche à deux têtes: striation, flèche: ramification, triangle: noyau, étoile: tissu fibreux).

Nous remarquons que les tissus cardiaques de rats supplémentés avec 500 et 600 mg d' α -T/kg d'aliment sont similaires aux tissus des rats du lot témoin.

L'architecture globale est identique, la disposition des noyaux de myocytes est la même, les striations des myofibrilles sont identiques et bien visibles. Nous déduisons que l' α -T administrée à 500 et 600 mg/kg d'aliment n'induit aucun stress pendant les trois mois de traitement et a exercé un effet antioxydant au niveau des membranes des cellules cardiaques.

Nos résultats corroborent avec ceux de Rouaki et *al.*, (2013) qui ont montré l'effet antioxydant de l' α -T administrée à 600 mg/kg de régime contenant 5% d'huile oxydée, en diminuant le taux de LPO .

L'action antioxydante de l' α -T est de mettre un terme aux réactions en chaîne de formations d'ER (Sies et Stahl, 1995), en arrêtant la peroxydation lipidique (LPO) dans les membranes phospholipidiques (Ferry et al., 2012).

Roberts et al.,(2007) ont trouvé que l'administration de 200 mg/jour pendant un an diminue la peroxydation lipidique chez l'homme.

- **Effets de la supplémentation en α -tocophérol aux doses allant de 650 à 1000 mg d' α -T**

Des changements histopathologiques, de modéré à sévère ont été notés respectivement chez les lots RSE₆₅₀ et RSE₇₀₀ (Figure 13a et 13b) et RSE₇₅₀ et RSE₁₀₀₀.

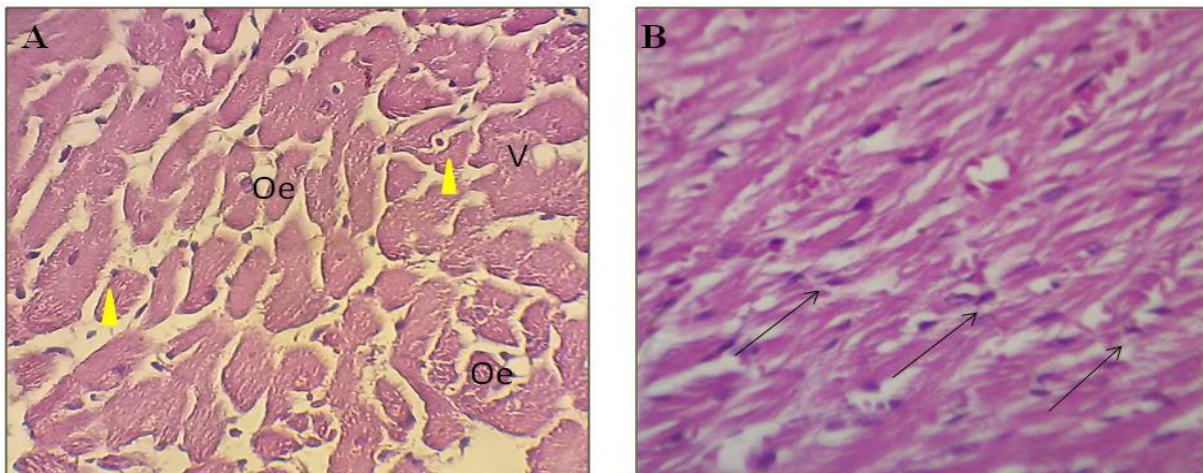


Figure 13. Micrographies de tissus cardiaques de rats supplémentés avec 650 mg (A) et 700mg (B) d' α tocophérol avec (Oe: œdème, V: vacuolisation, flèche: globule blanc

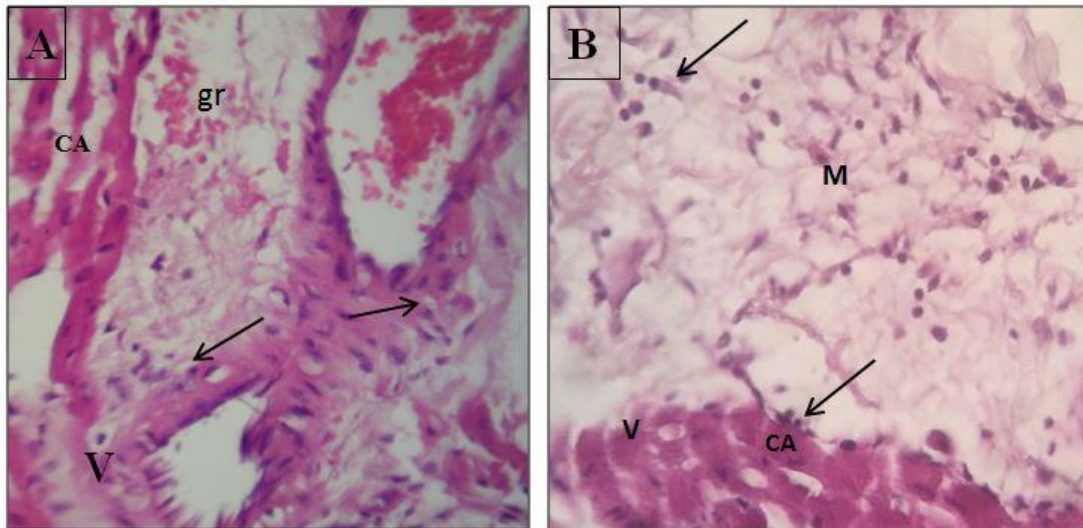


Figure 14. Micrographies (H&E X40) du tissu cardiaque de rats supplémentés avec 750 mg d' α -tocophérol avec : (gr :globule rouge, flèche: globule blanc, M :macrophage, CA :Cellule altérée, V :vacuolisation)

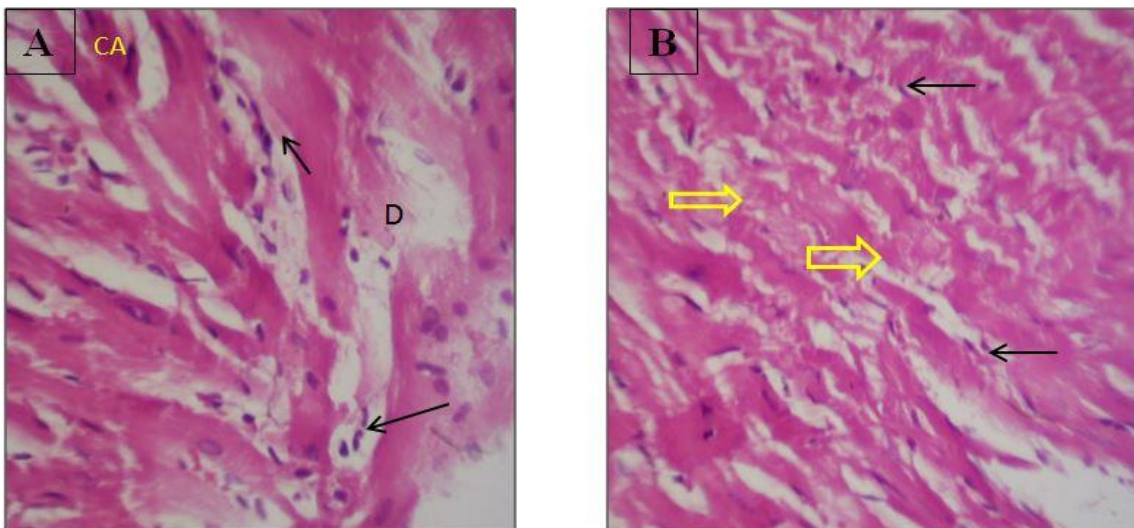


Figure 15. Micrographies (H&E x40) du tissu cardiaque de rats du lot RSE₈₀₀ avec: (CA: cellule altérée, D : déchirure du myocyte, flèche noire: infiltrat lymphocytaire, flèche transparente : désorganisation de myofibrilles)

Nous observons dans tout les tissus la présence d'œdème intracellulaire et des clarifications et/ou vacuolisations des sarcoplasmes. Ce sont des caractéristiques types de lésions dégénératives (hydropiques). Nous observons dans un péricarde de rat du lot RSE₇₅₀ un macrophage et une infiltration lymphocytaire. Les lymphocyte empiètent les myocytes lésés (nécrosés) (Figure 14.B).

On différencie les myocytes nécrosés des autres, par leurs sarcoplasmes éosinophiles très colorés (l'éosine se lie aux protéines cytoplasmiques dénaturées) et par leurs noyaux condensés (pycnose) ou dissous (caryolyse).

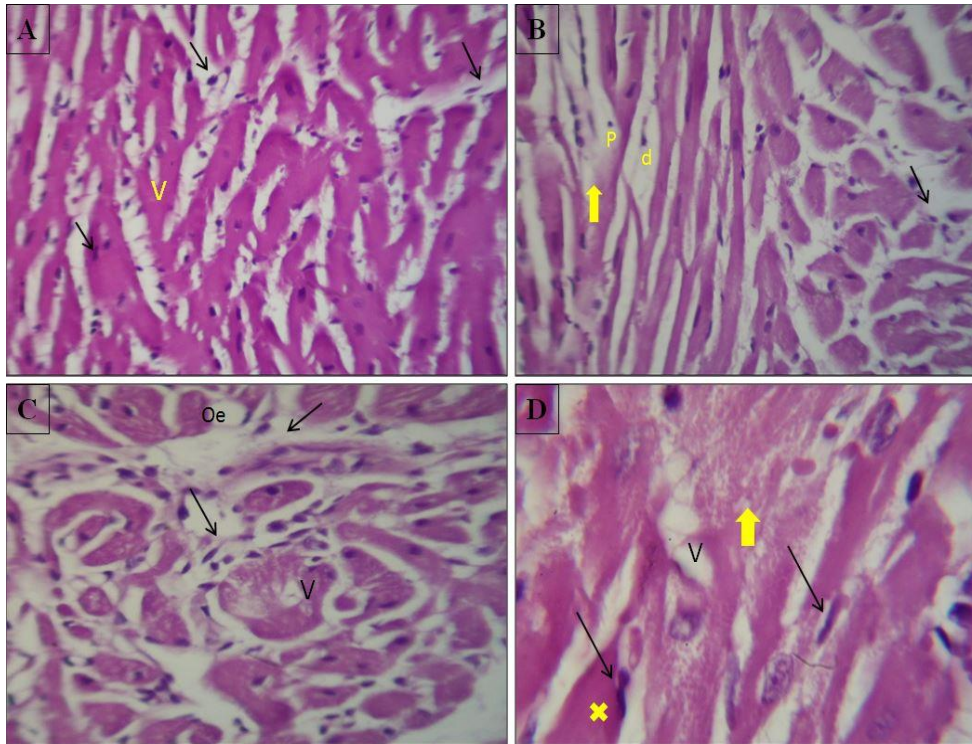


Figure 16. Micrographies (H&E) de tissu cardiaque de rat du lot RSE850 avec : (V: vacuolisation, flèche: globule blanc, flèche jaune: désorganisation de myofibrilles, P: pycnose, d: débris cellulaire et nucléaire, crois: cellule nécrosée avec un noyau ultra condensé). Gr x40 pour (A, B et C) , Gr x 100 pour (D) .

Chez le lot RSE₈₀₀, on observe plusieurs désorganisations de myofibrilles dans l'ensemble du tissu (Figure 15.B) et leurs déchirures (Figure15.A), affectant l'architecture du tissu myocardique.

Chez le lot RSE₈₅₀, on remarque que l'infiltration lymphocytaire est plus manifeste que pour les deux précédentes doses, nous observons des espacements importants entre myocytes, ces espaces peuvent être constitués de composants de la matrice extracellulaire ou de débris nucléaires et sarcoplasmiques, suite à l'apoptose du myocyte qui se trouvait dans cet espace . La désorganisation des myofibrilles est peut être due à la dénaturation des filaments d'actine et de myosine par des ER originaires des produits de la peroxydation médiée par les tocophérols .

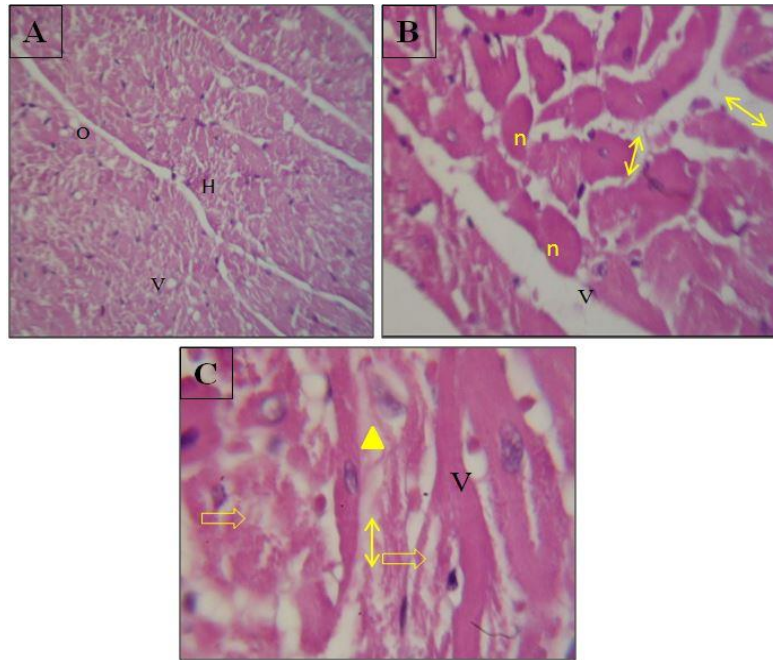


Figure 17. Micrographies (H&E) du tissu cardiaque de rat du lot RSE900 avec : (H: hémorragie, Oe :œdème, n: cellule dépourvue de noyau, V: vacuolisation, flèche avec deux têtes : débris cellulaire, triangle : dissolution du noyau. flèche transparente: clarification du sarcoplasme) . Gr x40 pour (A et B), Gr x100 (C) .

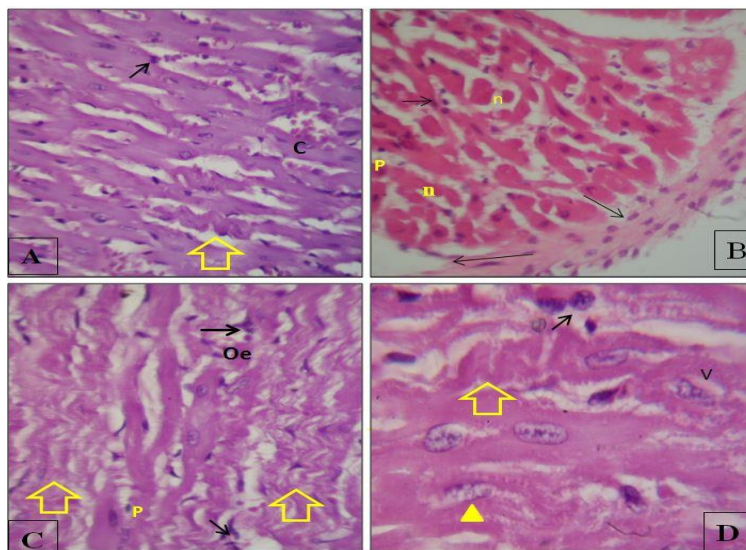


Figure 18. Micrographies (H&E) de tissu cardiaque des lots RSE950 (A et B) et RSE1000 (C et D) avec : (n: myocyte sans noyau, flèche transparente: désorganisation de myofibrilles, flèche noire: polynucléaire neutrophile, triangle: dissolution nucléaire .) Gr x40(A, B et C),Gr x100 (D) .

Nos résultats corroborent avec l'une des seules études traitant ce thème. En 2010, Nascimento et *al.*, ont observé dans les tissus cardiaques de rats mâles wistar des désordres dans les myofibrilles, des nécroses, œdèmes et des vacuolisations et ont en conclu que l' α -T induisait une cardiotoxicité après l'administration de 250 mg d' α T/kg de rat durant 7 semaines.

Nos observations concordent également avec ceux de Rouaki et *al.*, en 2013, dans leur étude investiguant l'effet de l'administration de 1200 mg d' α -T/kg de régime contenant 5% d'huile oxydée sur le tissu cardiaque de rat Wistar en plein croissance relevant des changement morphologique dans le tissu cardiaque plus sévères (nécroses et œdèmes) que ceux causées par l'administration de l'huile oxydée seule .

Contrairement au cœur, les autres organes, en particulier le foie et les reins ont fait l'objet de nombreuses études quant à l'effet de l' α -T sur eux (organes). El-Hak et *al.*, en 2019, avaient conclu que l' α -T administrée à des doses élevées (500, 1000 et 2000) mg d' α -T/kg de rat induisait une toxicité sur ces organes qui se manifeste par des infiltrations lymphocytaires sévères sur les tissus de rats males albinos pendant 30 jours d'expérimentation. Mais un effet bénéfique de l' α -T a été constaté dans cette même sur les testicules, en effet, l'examen histologique des testicules de rats n'ont montré aucune anomalie quelque soient les doses administrées, soulignant ainsi le rôle bénéfique voir même la nécessité de l' α -T dans la spermatogenèse.

Nous supposons que les dommages histologiques que nous avons observé sont la résultante de fortes doses d' α -T qui devient α -T• provoquant une peroxydations lipidique (Upson et *al.*, 1999). Les produits toxiques qui y résultent attaqueraient les myofilaments d'actine et de myosine provoquant la perte de la structure des myocytes, mais aussi, par leurs fortes toxicités, ils induiraient des dommages à l'ADN, quant aux membranes cellulaire, la peroxydation mediée par les tocopherol (TMP) serait la cause directe de la perte de leurs intégrités. Mécanisme (TMP) que Wannamethee et *al.*, en (2013) suggèrent comme étant la cause de l'atteinte du myocarde expliquant l'association d'un apport élevé en vitamine E et le risque d'insuffisance cardiaque chez des personnes âgées .

Plusieurs facteurs influencent les effets que pourraient engendrer la vitamine E dont la concentration, en α -T, en co-antioxydants et la présence ou non d'un stress . Nous n'avons pas induit de stress dans notre expérimentation et la quantité de co-antioxydant (vitamine C) contenu dans 100 g de régime standard (RS) était de 800mg ce qui expliquerait l'accumulation du radical α -T• en fonction de la dose d' α -T administrée .

Ceci concorde avec les conclusions de (Meagher *et al.*, 2001) qui suggèrent que pour éviter les effets indésirables (pro-oxydants) et lutter de manière efficace contre le stress oxydatif, il est impératif, d'administrer la bonne dose, dans un timing adéquat pendant une durée bien établie .

Effets de la supplémentation d'un régime standard en doses croissantes d' α -tocophérol sur la teneur en LPO et l'activité de la catalase

Notre étude comprenait une partie qui visait à déterminer l'effet de la supplémentation d'un régime standard en doses croissantes d' α -T sur deux paramètres du stress oxydatif, à savoir le taux en MDA et l'activité de la CAT ;mais en raison de circonstances indépendantes de notre volonté les dosages n'ont pu être réalisés. Néanmoins, afin de pouvoir discuter cette partie, nous nous sommes basés sur les résultats de l'étude histologique ainsi qu'une synthèse d'articles qui traitent les effets de ces paramètres sur le stress oxydatif.

Les résultats histologiques nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la vitamine E possède un effet dualiste selon sa concentration, ainsi les rats traités avec 500 jusqu'à 600 mg d' α -T/kg d'aliment auraient montré aucune variation importante des paramètres étudiés par rapport au témoin, les rats n'ont pas été affectés par ces doses, au contraire ces dernières ont eu un effet protecteur et antioxydant ; tandis ce que les rats traité avec 650 jusqu'à 1000 mg d' α -T/kg d'aliment auraient montré une baisse de l'activité de la CAT et une augmentation du taux en MDA, ainsi ces doses d' α -T ont eu un effet contraire c'est-à-dire pro-oxydant.

A. Etude des lots RSE500 au RSE600

Le muscle cardiaque présente une capacité antioxydante endogène très faible par rapport un taux élevé du métabolisme aérobie des mitochondries (qui augmenterait le taux de production de l'anion superoxyde),ce qui peut conduire plus facilement à un stress oxydatif, d'où l'importance d'une supplémentation optimale antioxydante en α -T(Rojas *et al.*, 1996).

Nous supposons que pour les lots RSE500 au RSE600, nous n'aurions pas obtenu de variation importante de l'activité de la CAT et surtout aucune augmentation du taux en MDA par rapport au témoin, cette non variation est due probablement à l'effet antioxydant et protecteur de l' α -T.

Plusieurs études appuient l'hypothèse que nous avons formulée.

En 1973, Babior et *al.*, ont signalé que la capacité antioxydante de la vitamine E a diminuée après la 5^{ème} semaine chez des souris C57/B6 nourris avec une dose de 480 mg d' α -T /kg de régime, ils ont conclu que l'activité antioxydante de l' α -T est dépendante du processus de recyclage du radical α -T^{*} par les co-antioxydants tel que l'acide ascorbique ou l'ubiquinol-10.

Olanlokun en 2008, a obtenu une diminution du taux en MDA, une augmentation des activités de la SOD et de la CAT après la supplémentation avec une dose de 400 UI à 60 rats males de souche albinos atteint de diabète mellitus, de ces résultats, cet auteur a conclu que la vitamine E a joué un rôle antioxydant en abaissant la teneur en LPO et en augmentant l'activité d'enzymes antioxydantes.

De plus , les résultats obtenu par Rouaki et *al.*, (2013), montrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de la CAT avec une diminution du taux en MDA au niveau du tissu cardiaque de rats males Wistar traité avec 600 mg d' α -T/kg d'aliment pendant 12 semaines , cette étude a été suivie par une deuxième dans les mêmes conditions mais sur le tissu rénal (Kanane et *al.*, 2018), ces auteurs suggèrent que l'administration d'une dose modérée d' α -T permet de rétablir l'équilibre antioxydant.

En 2013, Kongkham et *al.*, ont administré à deux groupes de rats males de souche Sprague Dawley différentes doses d' α -T(250 et 500mg d' α -T/kg d'aliment) pendant une durée de 5 jours avant l'induction d'une néphropathie à contraste induite (CIN) ; ils observent chez le deuxième groupe une diminution du taux en MDA et une augmentation du taux des antioxydant enzymatique (CAT, SOD ,GPx),ils conclurent qu'il existe une relation dose dépendante par rapport à la capacité antioxydant de la vitamine E et que la propriété antioxydante de cette dernière n'est pas seulement d'éliminer ROS, mais aussi de réguler les enzymes antioxydantes par la régulation de l'expression génique ou de l'activité d'enzymes antioxydantes (SOD et CAT).

Plusieurs auteurs soutiennent que la vitamine E peut induire les enzymes antioxydantes, on en citera quelques uns :

En 2008, Hajiani *et al.*, ont réalisé une étude qui a porté sur l'administration de 100, 300 et 600 mg de vitamine E/kg de régime à des rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley, pendant 2, 3 et 6 semaines, les résultats que ces auteurs ont obtenus ont montré que la phase antioxydante se caractérise par une diminution du taux de MDA avec une augmentation de l'activité de certaines enzymes antioxydantes (CAT, GPX, SOD) et ceci en supposons que l'activité de ces enzymes peut augmenter suite à un piégeage des ROS par la vitamine E.

Nakamura et Omaye ont signalés en 2009, (Nakamura et Omaye, 2009) l'implication de la vitamine E dans la modulation de l'ensemble du système de défense antioxydant, l'expression génique de la SOD Cu/Zn et la CAT peut être régulée par l'activation des PPARc, (**peroxisome proliferator-activated receptors**) car les PPRE sont situés dans les régions promotrices de la superoxyde-dismutase Cu/Zn (SOD1) humaine et de la catalase du rat, et puisque la vitamine E présente une similarité structurelle avec un activateur PPARc, la troglitazone donc l' α -tocophérol, régule à la hausse l'expression de la SOD Cu/Zn et la catalase *via* l'activation des PPARc.

B. Etude des lots RSE 650 au RSE 1000 :

Les antioxydants peuvent devenir prooxydants à la fois *in vitro et in vivo* en raison de leurs propriétés physiques et les caractéristiques micro-environnementales, ainsi que de la dose et de la durée dans le cas d'une supplémentation (Pingitore *et al.*, 2015). C'est pour cela que nous concevons l'obtention d'un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant au niveau du tissu cardiaque, concernant les lots RSE650 au RSE1000, ce déséquilibre sera traduit par une diminution de l'activité enzymatique de la CAT, et une augmentation du taux en MDA.

Néanmoins, nous avons remarqué une divergence dans les résultats des articles que nous avons consultés par rapport au statut pro-oxidant de la vitamine E ainsi que la dose qui a mené vers ce statut.

Nos résultats rejoignent ceux d'Eder *et al.* (2002) qui ont étudié l'effet de la supplémentation de l' α T chez des rats (100, 1000, 10000 d' α T/ Kg d'aliment) dans deux

régimes, l'un contenant comme source lipidique (huile de saumon et l'autre l'huile de saindoux) pendant 8 semaines. Ils ont obtenu à une dose de 1000 mg d' α T/ kg d'aliment, une baisse significative des activités de la GPx, de la CAT et de la G6PDH dans le globule rouge. Ils concluent qu'à fortes doses la vitamine E peut affecter les enzymes antioxydantes du globule rouge.

En 2003 Ivan LU a décrit un effet cardiotoxique suite à une supplémentation à 900mg d' α -T /kg de régime à des souris MDA-MB 23, il a montré que la vitamine E a abaissée l'ensemble des activités enzymatique antioxydantes.

L'effet pro-oxydant del' α -T a été obtenu par Rouaki et *al.*, (2013), Kanane et *al.*, (2018) et Rouaki et Kanane, (2019), qui ont signalé que le groupe de rats males Wistar soumis à un régime alimentaire contenant 5 % d'huile oxydée et supplémenté avec 1200 mg d' α T/kg d'aliment , a montré une diminution très significative de la CAT, accompagnée d'une augmentation significative du taux de MDA au niveau cardiaque, rénal et hépatique.

En finalité, nous citerons deux études très intéressantes réalisées sur un autre modèle animal :

Kironet *al.* (2004), ont étudié la truite arc en ciel « *Oncorhynchusmykiss* » traité par 1000 mg α -T /kg d'aliment, pendant 9 semaines, ces auteurs ont conclus que l' α -T n'a pas servi en tant qu'antioxydant, mais comme pro oxydant.

En 2016,Agata et al., ont étudié l'effet de la supplémentation d'une dose de 900 mg/Kg de régime sur une période de 150 jours sur 20 bovins femelles de souche Limousine , l'augmentation du taux du MDA ainsi qu'une diminution de l'activité de la CAT fut un résultat inattendu, il a été supposé de ces résultats que la vitamine E a eu un effet négatif sur les enzymes antioxydantes.

CHAPITRE IV
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Dans la présente étude, nous avons évalué les effets de la supplémentation d'un régime équilibré en différents doses d' α -T (500,600,650,700,750,800,850,900,950,1000 mg d' α -T/kg d'aliment) sur les paramètres pondéraux (poids corporel et poids cardiaque), l'histologie du tissu cardiaque et le dosage de quelques paramètres du stress oxydatif (l'activité de la CAT, le taux en MDA) chez des rats de souche Wistar et ceci durant 12 semaines ; malheureusement nous étions dans l'incapacité de réaliser le dosage des paramètres du stress oxydatif suite à la pandémie du COVID19.

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

Sur le plan de la croissance corporelle : les doses administré ont affecté distinctement le taux de gain en masse corporelle des différents lots ; pour les lots traités avec 500, 600, 650 et 700 mg d' α -T/kg d'aliment, nous avons constaté une diminution non significative du taux d'évolution du poids corporel, ceci prouve qu'à ces doses l' α -T n'a pas affecté la croissance du rat au contraire elle a joué le rôle de protecteur contre la peroxydation lipidique. Cependant l'administration de 750 à 900 mg d' α -T/kg et avec 950 et 1000 mg d' α -T/kg a entraîné respectivement une diminution significative à hautement significative ceci peut être expliqué par le fait que ces doses ont eu un effet négatif sur la croissance des rats.

Sur le plan du poids cardiaque : aucune variation significative n'a été observée pour l'ensemble des lots supplémentés, nous déduisons que les doses d' α -T administrés n'ont pas affectées le poids cardiaque

Sur le plan histologique : l'observation des coupes histologiques du lot RS jusqu'au lot RSE₆₀₀ a montré une architecture des cellules musculaires cardiaques allongées et de formes cylindriques organisées en réseau irrégulier, un noyau central, des ramifications aux extrémités et des striations scalariformes apparentes ; de cela on peut déduire qu'à ces doses la vitamine E exerce un rôle protecteur compte tenu de la forte activité métabolique au niveau du tissu cardiaque. Cependant, à partir des lots RSE₆₅₀ nous avons remarqué une infiltration lymphocytaire, des congestions, des œdèmes caractérisant un début d'inflammation qui a progressé vers la perte de l'architecture des cardiomyocytes et leurs nécroses, ces observations indiquent clairement qu'à partir de cette doses l' α -T a eu des effets néfastes (effet pro-oxydant).

Sur le plan métabolique : nous présumons que pour les lots RSE₅₀₀ au RSE₆₀₀, nous n'aurions pas obtenu de variations importantes de l'activité de la catalase et aucune augmentation du taux en MDA par rapport au témoin, cette non variation est probablement due à l'effet antioxydant et protecteur de la vitamine E. Par contre, pour la supplémentation avec des doses de 650 à 1000 mg d' α -T/kg d'aliment, nous aurions obtenu probablement une diminution de la l'activité enzymatique de la catalase suivie d'une augmentation du taux en MDA, ce qui suggère l'induction d'un stress oxydatif par l' α -T. Rappelons que ces présomptions sont fondées de ce qu'on a obtenu de l'étude histologique.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons fixer la dose de 650 mg d' α -T/kg d'aliment comme étant celle pour laquelle l' α -T a basculé d'un effet antioxydant à un effet pro-oxydant.

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

doser l' α -T au niveau cardiaque par chromatographie en phase liquide à haut performance

doser les marqueurs d'oxydation (MDA, radicale hydroxyle...)

doser les enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GPX)

étudier l'effet pro-oxydant de l' α -T au niveau d'autres organes (la rate, testicule, poumons...)

effectuer une (qRT-PCR) afin de déterminer l'expression de l'ARNm p53, PGC1- α , angiotensine 2, ICAM-1, VCAM-1 et NOS3.

étudier l'effet des stéréo-isomère (Gamma tocophérol)

augmenter la durée du traitement.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 121–126
- Abdo, K. M., Rao, G., Montgomery, C. A., Dinowitz, M., Kanagalingam, K. (1986). Thirteen-week toxicity study of d- α -tocopheryl acetate (vitamin E) in Fischer 344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10-11), 1043–1050
- Al-Kayiem, A. H. H. et Ibrahim, M. A. (2015) « The influence of the equivalent hydraulic diameter on the pressure drop prediction of annular test section », *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 100(1), p. 595-603. doi: 10.1088/1757-899X/100/1/012049.
- Agata, M. D. *et al.* (2016) « Oxidation and antioxidant status : effects on shelf-life of meat from Limousine cattle fed with supplements of α tocopherol Oxidation and antioxidant status : effects on shelf-life of meat from Limousine cattle fed with supplements of α -tocopherol ». doi: 10.4081/ijas.2009.405.
- Azzi, A. et Stocker, A. (2000) « Vitamin E: Non-antioxidant roles », *Progress in Lipid Research*. *Prog Lipid Res*, p. 231-255. doi: 10.1016/S0163-7827(00)00006-0.
- Babior, B. M., Kipnes, R. S. et Curnutte, J. T. (1973) « Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. », *The Journal of clinical investigation*, 52(3), p. 741-744. doi: 10.1172/JCI107236.
- Bhattacharyya, A. *et al.* (2014) « Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases », *Physiological Reviews*, 94(2), p. 329-354. doi: 10.1152/physrev.00040.2012.
- Bonnefont-Rousselot, D. *et al.* (2007) « Les Vitamines », p. 363.
- Bouayed, J. et Bohn, T. (2010) « Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses », *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. *Oxid Med Cell Longev*, p. 228-237. doi: 10.4161/oxim.3.4.12858.
- Bowry, V. W. et Stocker, R. (1993) « Tocopherol-Mediated Peroxidation. The Prooxidant Effect of Vitamin E on the Radical-Initiated Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein », *Journal of the American Chemical Society*, 115(14), p. 6029-6044. doi: 10.1021/ja00067a019.
- Burkitt, M. J. et Milne, L. (1996) « Hydroxyl radical formation from Cu(II)-Trolox mixtures:

Insights into the pro-oxidant properties of α -tocopherol », *FEBS Letters*, 379(1), p. 51-54. doi: 10.1016/0014-5793(95)01481-0.

Butterfield, D. A. *et al.* (1998) « Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl- α -phenylnitron and vitamin E », in *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, p. 448-462. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09924.x.

Calabrese, V. *et al.* (2006) « Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease », *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(11-12), p. 1975-1986. doi: 10.1089/ars.2006.8.1975.

Catalá, A. (2012) « Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “fluid Mosaic Model” to the “lipid Whisker Model” », *Biochimie*. Elsevier B.V., p. 101-109. doi: 10.1016/j.biochi.2011.09.025.

Chelikani, P., Fita, I. et Loewen, P. C. (2004) « Diversity of structures and properties among catalases », *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, p. 192-208. doi: 10.1007/s00018-003-3206-5.

Collin, F. (2019) « Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases », *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms20102407.

Cuvelier, C., Dotreppe, O. et Istasse, L. (2003) « Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E », *Annales de Medecine Veterinaire*, 147(5), p. 315-324.

Dahdouh, F., Djabar, M.R., Kechrid, Z. (2014). Vitamins C and E Combination Potentially Prevented Oxidative Stress Mediated Liver Injury in Nickel Intoxicated Mice. *Global Veterinaria*, 13 (6),938-946

Dizdaroglu, M. et Jaruga, P. (2012) « Mechanisms of free radical-induced damage to DNA », *Free Radical Research*. Free Radic Res, p. 382-419. doi: 10.3109/10715762.2011.653969.

Dröge, W. (2002) « Free radicals in the physiological control of cell function », *Physiological Reviews*. American Physiological Society, p. 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

Eder, K., Flader, D., Hirche, F., & Brandsch, C. (2002). Excess Dietary Vitamin E Lowers the Activities of Antioxidative Enzymes in Erythrocytes of Rats Fed Salmon Oil. *The journal of*

Nutrition, 132(11), 3400-3404

Favier, A. (2003). Le stress oxidant. L'actualité chimique, 108.

Folkes, L. K., Candeias, L. P. et Wardman, P. (1995) « Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(1), p. 120-126. doi: 10.1006/abbi.1995.0017.

Freedman, J. E. et Keaney, J. F. (2001) « Symposium: Molecular mechanisms of protective effects of vitamin E in atherosclerosis: Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity », *Journal of Nutrition*, 131(2), p. 374-377. doi: 10.1093/jn/131.2.374S.

Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E. et Viña, J. (2008) « Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training », *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), p. 126-131. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001.

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

Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine*, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.

Hedayati, M. *et al.* (2018) « Vitamin E improved redox homeostasis in heart and aorta of hypothyroid rats », *Endocrine Regulations*, 51(4), p. 205-212. doi: 10.1515/enr-2017-0021.

Hegde, M. L. *et al.* (2012) « Oxidative genome damage and its repair: Implications in aging and neurodegenerative diseases », *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(4), p. 157-168. doi: 10.1016/j.mad.2012.01.005.

Hojo, Y. *et al.* (2000) « In vivo singlet-oxygen generation in blood of chromium(VI)-treated mice: An electron spin resonance spin-trapping study », *Biological Trace Element Research*, 76(1), p. 85-93. doi: 10.1385/BTER:76:1:85.

Ighodaro, O. M. et Akinloye, O. A. (2018) « First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid », *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), p. 287-293.

doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.

Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S., & Watanabe, T. (2004). Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture*, 234(1-4), 361–379.

Kongkham, S., Sriwong, S. et Tasanarong, A. (2013) « Protective effect of alpha tocopherol on contrast-induced nephropathy in rats », *Nefrologia*, 33(1), p. 116-123. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2012.Nov.11736.

Marklund, S. L. (1982) « Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(24 I), p. 7634-7638. doi: 10.1073/pnas.79.24.7634.

Martínez, M. C. et Andriantsitohaina, R. (2009) « Reactive nitrogen species: Molecular mechanisms and potential significance in health and disease », *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc., p. 669-702. doi: 10.1089/ars.2007.1993.

MORGAN, P. *et al.* (2008) « Separation, detection, and quantification of hydroperoxides formed at side-chain and backbone sites on amino acids, peptides, and proteins », *Free Radical Biology and Medicine*, 45(9), p. 1279-1289. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.004.

Nakamura, Y. K. et Omaye, S. T. (2009) « Vitamin E-modulated gene expression associated with ROS generation », *Journal of Functional Foods*, 1(3), p. 241-252. doi: 10.1016/j.jff.2009.02.002.

Niki, E. (2014) « Role of vitamin e as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: In vitro and in vivo evidence », *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., p. 3-12. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022.

Olanlokun, J. O. (2008) « Protective influence of vitamin E on the antioxidant defence system in the whole blood and liver of normal and alloxan-induced diabetic rats », *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23(1), p. 62-66. doi: 10.1007/s12291-008-0015-5.

Pastor, N. *et al.* (2000) « A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in mechanism of sequence-specific binding », *Journal of Molecular Biology*, 304(1), p. 55-68. doi: 10.1006/jmbi.2000.4173.

- Pedroso, N. *et al.* (2009) « Modulation of plasma membrane lipid profile and microdomains by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* », *Free Radical Biology and Medicine*, 46(2), p. 289-298. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.039.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. et Periyasamy, L. (2015) « Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases », *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. Springer India, p. 11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- Pingitore, A. *et al.* (2015) « Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports », *Nutrition*, 31(7-8), p. 916-922. doi: 10.1016/j.nut.2015.02.005.
- Poljsak, B. et Milisav, I. (2012) « The neglected significance of “antioxidative stress” », *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2012/480895.
- Poulsen, H. E. *et al.* (2012) « RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? », *Free Radical Biology and Medicine*. Free Radic Biol Med, p. 1353-1361. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.009.
- Radišq, R. *et al.* (1991) *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria*.
- RICCIARELLI, R., ZINGG, J.-M. et AZZI, A. (2001) « Vitamin E: protective role of a Janus molecule », *The FASEB Journal*, 15(13), p. 2314-2325. doi: 10.1096/fj.01-0258rev.
- Rietjens, I. M. C. M. *et al.* (2002) « The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids », *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(3-4), p. 321-333. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00003-0.
- Del Río, L. A. (2015) « ROS and RNS in plant physiology: an overview ». doi: 10.1093/jxb/erv099.
- Rojas, C. *et al.* (1996) « Increase in heart glutathione redox ratio and total antioxidant capacity and decrease in lipid peroxidation after vitamin E dietary supplementation in guinea pigs », *Free Radical Biology and Medicine*, 21(7), p. 907-915. doi: 10.1016/S0891-5849(96)00223-7.
- Schmölz, L. (2016) « Complexity of vitamin E metabolism », *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), p. 14. doi: 10.4331/wjbc.v7.i1.14.

Schneider, C. (2005) « Chemistry and biology of vitamin E », *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(1), p. 7-30. doi: 10.1002/mnfr.200400049.

Sies, H. (1991) « Oxidative stress: From basic research to clinical application », *American Journal of Medicine*, 91(3 C), p. S31-S38.

Sies, H. (2014) « Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress », *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., p. 8735-8741. doi: 10.1074/jbc.R113.544635.

von Sonntag, C. (2006) *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*, *Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair*. doi: 10.1007/3-540-30592-0.

Spiteller, G. (2006) « Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products », *Free Radical Biology and Medicine*. *Free Radic Biol Med*, p. 362-387. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.013.

Stadtman, E. R. et Levine, R. L. (2003) « Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins », *Amino Acids*, 25(3-4), p. 207-218. doi: 10.1007/s00726-003-0011-2.

Upston, J. M., Terentis, A. C. et Stocker, R. (1999) « Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement », *The FASEB Journal*, 13(9), p. 977-994. doi: 10.1096/fasebj.13.9.977.

Valko, M. *et al.* (2007) « Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease », *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. *Int J Biochem Cell Biol*, p. 44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

Wannamethee, S. G. *et al.* (2013) « Plasma vitamin C, but not vitamin E, is associated with reduced risk of heart failure in older men », *Circulation: Heart Failure*, 6(4), p. 647-654. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000281.

Weber, P. *et al.* (2002) *Vitamin E in Human Health*.

Winterbourn, C. C. et Kettle, A. J. (2000) « Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid », *Free Radical Biology and Medicine*, 29(5), p. 403-409. doi:

10.1016/S0891-5849(00)00204-5.

Yang, N.Y. J., Desai, I.D. (1977). Effect of High Levels of Dietary Vitamin E on Hematological Indices and Biochemical Parameters in Rats. *The Journal of Nutrition*, 107(8), 1410–1417

ANNEXES

Annexe 01

Constitution du régime alimentaire (g /100g):

Ingrédients	Mais	Son	Soja	Calcaire	Phosphate	C.M.V (Complément Méniralo- Vitaminique)	α -T
RS	50.8	10.8	32.1	1.50	00.80	02.00	/

- **Mélange minéral contenu dans 100 g d'aliment:** KH₂PO₄ 20,0 mg; CaCO₃ 34,6 mg; CaHPO₄ 26,55 mg; 13,70 mg de NaCl; 3,42 mg MgSO₄·7H₂O; CuSO₄·5H₂O 0,042 mg; MnSO₄·H₂O 0,27 mg; 7H₂O 1,02 mg FeSO₄; ZnSO₄·H₂O 0,15 mg; CaCO₃ 0,0008 mg; KI 0,0016 mg.
- **Mélange vitaminique contenu dans 100g d'aliment:** vitamine A 19.800 UI; D3 2.500 mg; B1 20 mg; B2 15 mg; B3 70 mg; B6 10 mg; B7 150 mg; B12 0,05 mg; C 800 mg; E (dl- α -tocophérol acétate) 170 mg; K3 40 mg; PP 100 mg; chlorure de choline 1.360 mg; acide folique 5 mg; AcPAB 50 mg; 0,3 mg de biotine

Annexe 02

I.1 Verrerie et autres

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

I.2. Réactifs chimiques

- Vitamine E.
- Ether Ethylique.
- Triton X-100.
- Acide trichloracétique
- Alcool.
- Hydroxyde de sodium NaOH.
- Tartrate de Na⁺ K⁺.
- Sulfate de cuivre CuSo4.
- Sulfate de carbonate de sodium Na2Co3.
- Folinciocalteu.
- Phosphate de potassium monobasique KH2Po4.
- Butyl-Hydroxtoluène (BHT).

- Phosphate disodique $\text{Na}_2 \text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$.
- Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .
- Eau distillée.

I.3. Appareillages : Appareillages nécessaire pour le dosage des paramètres du stress oxydatif:

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

Annexe 03 : Préparation des solutions de dosages des protéines

Solution A : Préparée par mélange des trois solutions suivantes :

→ 0.5ml de la solution de tartrate à 2% (p/v)

→ 0.5ml de la solution de sulfate de cuivre CuSO_4 a 1%

→ 50ml de la solution de sulfate de carbonate de sodium Na_2CO_3 dans du NaOH (0.1M)

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

Annexe 04 : Préparation des solutions de dosage de la catalase

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

- Dissoudre 6,81g de KH_2PO_4 dans de l'eau distillée est complété à 1000ml (a)

- Dissoudre 8,82g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau distillée est compléter a 100ml

(b) - Mélanger 1ml de la solution (a) avec 1,5ml de la solution (b) - Ajuster le pH=7

Solution II : peroxyde d'hydrogène (30 mM)

- Diluer 0.34ml de H_2O_2 a 30% avec la solution I jusqu'à 100ml