

MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES DU FOIE DE RAT SOUMIS A UN RÉGIME CONTENANT UNE HUILE OXYDÉE ET SUPPLÉMENTÉ EN VITAMINE E

ROUAKI Fayrouz^{1*} et KANANE Amel¹

1. Université SAAD DAHLAB de Blida 1, Faculté des Sciences de la Vie et de la Nature, Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, B.P. 270, route de soumaa, Blida, Algérie.

Reçu le 18/05/2019, Révisé le 23/06/2019, Accepté le 26/06/2019

Résumé

Description du sujet : Cette étude montre le déséquilibre important de la balance oxydante/antioxydante lors de l'administration d'un régime contenant de l'huile oxydée et supplémenté en α -T à des rats de souche wistar en plein croissance.

Objectifs : Etudier l'incidence de l'ingestion de l'huile de tournesol oxydée incorporée à 5% dans un régime alipidique supplémenté ou non d'alpha-tocophérol, sur le système enzymatique antioxydant ainsi que l'étude histologique du tissu hépatique de rats de souche wistar en croissance.

Méthodes : Dosage colorimétrique de l'ensemble des enzymes antioxydantes (Glutathion peroxydase (GPx), superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT)) et l'évaluation de la lipoperoxydation par le dosage des lipoperoxydes (LPO) ainsi que le dosage de l'alpha-tocophérol (α -T) par HPLC. L'étude histologique par coloration classique H&E du tissu hépatique de rats de souche wistar en croissance.

Résultats : Les résultats obtenus montrent une diminution significative de la GPx et de la CAT accompagnée d'une augmentation significative des LPO, montrant l'altération de ces enzymes par les espèces radicalaires oxygénées (ERO) générée par l'huile oxydée. Concernant le lot supplémenté à 600 mg d' α -T, nous avons obtenu l'augmentation significative de la GPx et la CAT et une diminution significative de la teneur en LPO, ce qui montre l'effet protecteur de l' α -T vis-à-vis des ERO. Concernant le lot supplémenté à 1200 mg d' α -T une diminution significative de la GPx et de la CAT suivi de l'augmentation significative des LPO. Enfin, les coupes histologiques n'ont fait que confirmer l'ensemble de ces résultats.

Conclusion : Une sévérité de l'action de l'huile oxydée est clairement montrée, mais si elle est incorporée avec une dose modérée en α -T dans l'aliment elle perd de sa toxicité. Enfin une dose importante d' α -T augmente nettement l'effet toxique de cette huile, et donc cette vitamine ne joue plus le rôle d'antioxydant mais plutôt de prooxydant.

Mots clés : Huile oxydée, enzymes antioxydantes, α -tocophérol, rat, foie, antioxydant, prooxydant.

BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL CHANGES IN RAT LIVER CAUSED BY OXIDIZED OIL AND SUPPLEMENTATION OF VITAMIN E

Abstract

Description of the subject: This study shows the significant imbalance in the oxidant/antioxidant balance when administered a diet containing oxidized oil and supplemented with α -T to growing Wistar rats.

Objective: To study the incidence of ingestion of oxidized sunflower oil incorporated at 5% in an alipidic diet supplemented or not with α -T, on the antioxidant enzyme system as well as histological study of liver tissue of growing Wistar strain rats.

Methods: The results obtained show a significant decrease in GPx and CAT, accompanied by a significant increase in LPO, showing the alteration of these enzymes by oxygenated radical species (ERO) generated by oxidized oil. For the 600 mg of α -T group, we obtained a significant increase in GPx and CAT, and significant decrease in LPO content, which shows the protective effect of α -T, against ERO. For the 1200 mg of α -T supplemented group a significant decrease in GPx and CAT followed by a significant increase in LPO. Finally, the histological sections confirmed all these results.

Conclusion: a severity of action of oxidized oil is clearly shown, but if it is incorporated with a moderate dose of α -T in the food it loses its toxicity. Finally, a high level of α -T significantly increases the toxic effect of this oil, and result in a pro-oxidant effect.

Key words: oxidized oil, antioxidant enzymes, α -tocopherol, rat, liver, antioxidant, prooxydant.

* Auteur correspondant: ROUAKI Fayrouz, E-mail: fayrouzrouaki@yahoo.fr

INTRODUCTION

Avec une production mondiale oscillant autour de 27 millions de tonnes, et un rendement moyen de l'ordre de 12 q/ha, le tournesol est l'une des grandes espèces oléagineuses de la planète. Les atouts internationaux de l'espèce sont sa richesse en huile, sa résistance à la sécheresse et plus généralement son faible besoin en intrants. Le tournesol est d'abord cultivé pour ses graines, qui représentent l'une des plus importantes sources d'huiles alimentaires au monde. Plusieurs facteurs expliquent que l'huile de tournesol soit considérée comme une huile de première qualité : couleur pâle, forte teneur en acides gras non saturés, absence d'acide linoléique et d'acides gras trans, saveur neutre, forte résistance à l'oxydation et point de fumée élevé. Un atout de l'huile de tournesol est la grande diversité de composition en acides gras. Ceci conduit à des utilisations variées aussi bien en nutrition humaine que dans le domaine non alimentaire.

Les graisses et huiles végétales sont utilisées principalement comme huile de table, pour la préparation de margarine et comme huile de friture ; cette dernière est destinée à permettre la cuisson jusqu'à 200°C. L'huile qui était lors de la friture proprement dite un auxiliaire technologique, est alors incorporée en tant qu'ingrédient du produit final. Au cours de son utilisation en friture, il y a la formation des hydroperoxydes formés lors de l'attaque radicalaire des acides gras insaturés par l'oxygène, ainsi que l'altération de leur valeur nutritionnelle. Ces dérivés d'oxydation se forment facilement et aboutissent à un mélange complexe d'esters polaires et polymérisés d'où le risque d'une intoxication par ingestion chronique de ces huiles usagées [1].

Toutes les cellules vivantes sont exposées de façon chronique aux oxydants provenant de sources à la fois endogènes et exogènes qui génèrent à chaque instant dans l'organisme des molécules qu'on appelle espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (EROA). Ces derniers sont des intermédiaires indispensables à l'organisme où ils sont impliqués dans des processus physiologiques à de faibles quantités. Cependant, l'excès de la production des EROA peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule : les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

Au niveau moléculaire, les EROA peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes donnant lieu à un stress oxydatif qui sera impliqué dans le développement de diverses pathologies [2].

Pour contourner les dommages causés par les EROA, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants, ces derniers présents à des faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, sont définis comme toute substance ayant la capacité de contrôler, retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible [3]. Il existe une multitude d'antioxydants proprement dits qui sont synthétisés par l'organisme ou le plus souvent apportés par l'alimentation. Entre autres, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes assurent la réparation des éventuels dommages oxydatifs au niveau des protéines et de l'ADN, en présence des antioxydants non enzymatiques (vitamine E, sélénium, cuivre,...) sont considérés comme des cofacteurs de divers enzymes à activité antioxydante [4].

Les antioxydants ont fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux, qu'ils soient ingérés dans l'alimentation ou sous forme de compléments. En l'état actuel des connaissances, l'apport d'antioxydants par l'alimentation peut être considéré comme favorable à la santé [5]. La vitamine E (α -tocophérol : α -T), qui est considéré comme le principal antioxydant membranaire, utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique. Durant la réaction antioxydante, l' α -tocophérol est converti en radical α -tocophéroxyl beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy) [6].

Cependant, l'effet pro-oxydant de l' α -T consiste à augmenter la peroxydation lipidique, ce processus est bien connue *in vitro* [7]. Des études sur des suspensions micellaires [8] et des LDL isolées [9], ont montrés que de fortes doses en vitamine E avaient un effet pro-oxydant. La cause de cette activité pro-oxydante et l'interaction du radical tocophéroxyl avec des radicaux peroxy ou avec des acides gras polyinsaturés dans les LDL. Cette réaction mène à l'accumulation des hydroperoxydes et des diènes conjugués [8].

Actuellement, il existe très peu d'études *in vivo* sur le potentiel prooxydatif de fortes doses de vitamine E et c'est dans ce contexte que s'insère cette étude, dont l'objectif est d'évaluer les marqueurs oxydants et antioxydants chez des rats wistar, nourris pendant 8 semaines avec une huile fraîche, ou d'une huile oxydée et/ou d'un supplément en α -T (600 mg et 1200 mg/kg d'aliment), nous souhaitons contribuer à une meilleure compréhension de l'effet de ces suppléments sur des rats en pleine croissance et sur l'histologie du tissu hépatique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Expérimentation animale

Nos expériences ont été réalisées sur des rats males de souche Wistar auxquels une huile de tournesol fortement oxydée par insufflation d'air à 98°C, leur a été administrée ; les rats nous ont été fournis par le centre d'élevage de l'Institut Pasteur de Kouba d'Alger. Après sevrage et une semaine d'adaptation, quatre (04) lots expérimentaux de huit (08) animaux chacun sont constitués.

Le premier lot : Huile Fraîche (HF) est nourrit d'un régime équilibré avec 5g/100g d'aliments d'huile fraîche, le second lot Huile oxydée (HO), reçoit un régime équilibré avec 5g/100g d'aliment de cette huile oxydée, le troisième lot : Huile Oxydée supplémenté en alpha-tocophérol ($\text{HO}\alpha\text{T}_{600}$), reçoit un supplément d'alpha tocophérol de 600mg avec 5g/100g d'aliment de cette huile oxydée, enfin, le quatrième lot : Huile oxydée supplémenté en alpha-tocophérol ($\text{HO}\alpha\text{T}_{1200}$), reçoit un supplément d'alpha tocophérol de 1200mg avec 5g/100g d'aliment de cette même huile oxydée.

Les aliments et l'eau sont donnés *ad libitum*, l'aliment est mis dans des boîtes de Pétri, il est sous forme d'une poudre huileuse et changé chaque jour. Chaque cage contient un rat maintenu sur une litière de sciure sans qu'il ne soit possible d'éviter la coprophagie, ce qui peut éventuellement limiter l'apparition d'une carence en AGE, car les selles contenant de l'acide linoléique [10].

Les animaux sont sacrifiés à l'âge adulte (90 jours), après un jeûne de 24 heures, en les anesthésiant au chloroforme, le foie est rapidement prélevé, rincé avec de l'eau physiologique à 9‰, pesé puis gardé à -20°C pour le dosage des protéines.

Les mesures du malondialdéhyde, de la teneur en α -T et des activités enzymatiques à savoir la Superoxyde Dimutase (SOD), la Catalase (CAT), la Glutathion Peroxydase (GPx), la Glutathion Réductase (GR) et la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDase) ont été réalisées sur du tissu hépatique gardé à -80°C.

Pour l'étude histologique, le foie est rapidement fixé dans le formol à 10%, pendant 6 heures. Cette étape est importante car le formol permet le maintien de la morphologie tissulaire proche de celle à l'état vivant.

2. Analyses biochimiques

Les produits chimiques et les solvants utilisés sont de qualité pour analyses. Les enzymes sont dosées avec des substances de références, d'origine commerciale : Boehringer Mannheim et Merck (Allemagne).

2.1. Préparation des homogénats

Pour l'homogénéisation des tissus, que ce soit pour le dosage des protéines, l'évaluation de la peroxydation lipidique ou pour la mesure des activités enzymatiques, des milieux faiblement tamponnés et adéquats ont été préparés, elle est réalisée avec un broyeur homogénéiser de Potter, maintenu dans un bain glacé.

2.2. Dosage des protéines

La teneur en protéine est déterminée selon la méthode de Lowry *et al.* [11]. Du sérum albumine Bovin est utilisé comme standard. L'absorbance est mesurée à 750 nm.

2.3. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est mesurée sur les homogénats de foie (100 mg/ml de tampon phosphate 0.2 M à pH 7.4) par la méthode de Draper [12], basée sur la formation d'un complexe absorbant à 532 nm entre une molécule d'acide thiobarbiturique produite lors de la peroxydation lipidique et deux molécules d'acide thiobarbituriques avec l'élimination de deux molécules d'eau.

2.4. Les antioxydants enzymatiques

Les activités enzymatiques sont exprimées en activités spécifiques en fonction de la quantité en protéines ; 4 essais sont réalisés pour chaque échantillon.

La SOD Cu-Zn, est évaluée selon la méthode de Marklund et Marklund [13], dont le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ par la SOD, lancer la cinétique à 420 nm pendant 1 mn.

L'activité de la catalase est mesurée selon la méthode Aebi [14], en suivant la décomposition du peroxyde d'hydrogène, qui absorbe à 240 nm. Les résultats sont exprimés en nmol de H_2O_2 réduit/ mn /mg de protéines.

L'activité de la GPx est évaluée en présence de Glutathion comme réducteur, selon la méthode de Paglia et Valentine [15], cette réaction est couplée à la réduction par GR du GSSG formé en présence du NADPH. On suit la disparition du NADPH, qui absorbe à 340 nm. L'activité est exprimée en nmol de NADPH consommé / mn / mg de protéines.

L'activité de la Glutathion réductase est évaluée selon la méthode de Goldberg et Spooner [16], en mesurant la disparition du NADPH à 339 nm, elle est exprimée en nmol de NADPH oxydé / mn / mg de protéines.

L'activité de la Glucose-6-phosphate Déshydrogénase (G6PDase) a été mesurée en suivant l'apparition du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) à 339 nm qui est exprimée en nmol / mn / mg de protéines ; selon la technique de Bergmeyer [17].

2.5. Antioxydant non enzymatique (Teneur en alpha-tocopherol (α -T))

La concentration en α -T du tissu hépatique a été déterminée par la technique de Desai [18], 0,5 ml de l'homogénat du tissu hépatique, 0,5 ml d'éthanol et 0,25 ml de 25% d'acide ascorbique sont incubés à 70°C pendant 5 min, on rajouter 0.3 ml d'une solution saturée en hydroxyde de potassium et on incube à 70°C pendant 30 min. Les tubes sont immédiatement refroidis dans un bain de glace. On rajoute 4 ml d'hexane. Les tubes contenant l'échantillon sont

mélangés au vortex pendant 1 min et centrifugés à 1500 trs/min pendant 5 à 10 min. séparés les phases, celle contenant l'hexane sera utilisée pour estimer la concentration de la teneur en vitamine par spectrophotomètre, les longueurs d'ondes d'émission sont de 286 et 330 nm, respectivement. La concentration en α -T est obtenue directement par la courbe étalon.

2.6. Etude histologique

Les coupes histologiques du tissu hépatique ont été réalisées selon la technique proposée par Martoja et Martoja [19], à l'hématoxyline/ éosine. Pour l'observation en Microscope optique et la prise de photos micrographique, les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

3. Analyses statistiques

La normalité de la distribution des données et l'homogénéité de la variance ont été testées en utilisant respectivement les tests Kolmogorov Smirnov et Levene. Les principaux paramètres des différents groupes ont été comparés entre eux ou au groupe témoin en utilisant le test de Student.

Par ailleurs, lorsque l'hypothèse de normalité ou l'homogénéité des variances ne sont pas respectées, le test de Mann-Whitney-U a été réalisé. Les résultats sont exprimés comme la moyenne plus ou moins l'écart type et sont considérés significatifs à 0,05. L'analyse statistique a été établie en utilisant Statistica 7.0, Statsoft Inc. (Tulsa, USA).

RÉSULTATS

1. Analyses biochimiques

La teneur en α -T a diminué de manière hautement significative chez les rats du lot HO par rapport au témoin (HF) ($p=0,0001$, Fig. 1), par ailleurs nous avons noté une augmentation hautement significative de la teneur en α -T du lot HO α T₆₀₀ par rapport au lot HO ($p=0,0003$), enfin une diminution très significatif de ce même paramètre a été obtenu en comparant le lot HO α T₁₂₀₀ au lot HO α T₆₀₀ ($p=0,002$).

La Figure 2, porte les résultats du dosage des LPO pour l'ensemble des lots. Le lot HO, montre une valeur en LPO significativement plus élevée que celle du témoin ($p=0,014$), contrairement à celle obtenue lors de la comparaison du lot HO α T₆₀₀ par rapport au lot HO qui elle, baisse d'une manière significative

($p=0,013$) d'où l'effet protecteur d'une telle dose en α -T vis-à-vis des LPO. Enfin, concernant les deux lots supplémentés en α -T, à savoir le lot HO α T₁₂₀₀ comparé au lot HO α T₆₀₀ l'augmentation des LPO est significative ($p=0,031$) ceci explique l'effet prooxydant de l' α -T au lieu de l'effet antioxydant attendu.

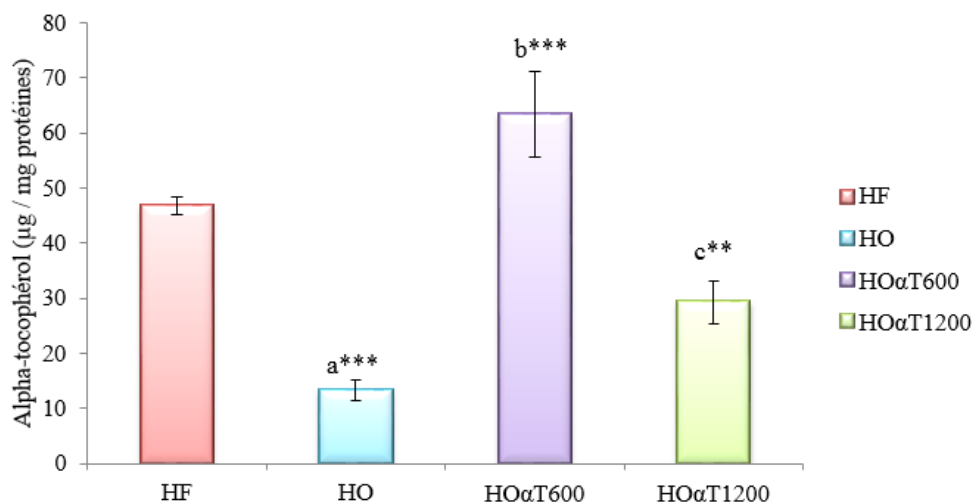


Figure 1 : Effets d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée et supplémenté en vitamine E (600 et 1200 mg d' α -T) sur la teneur en α -T du foie de rats en croissance.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ SE (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ entre témoin et groupe traités (a: comparaison avec le lot HF, b: comparaison avec le lot HO, c: comparaison avec le lot HO α T₆₀₀).

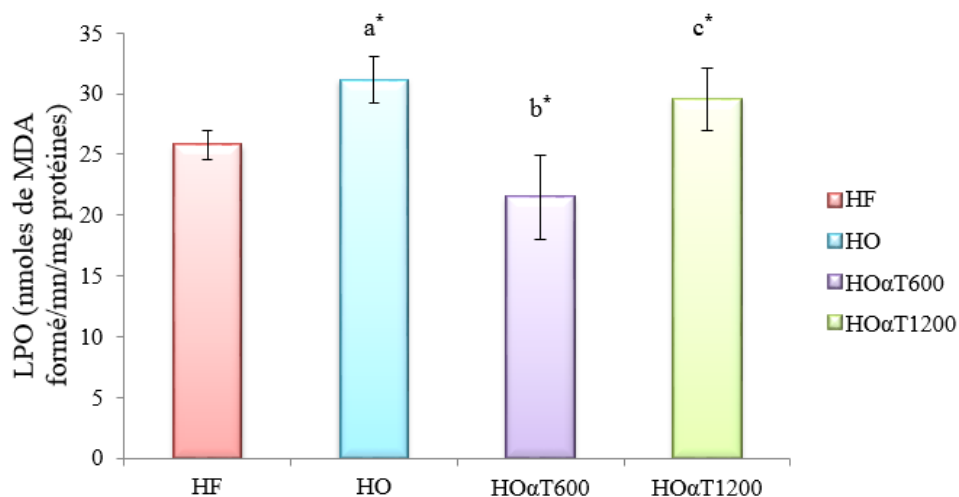


Figure 2 : Effets d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée et supplémenté en vitamine E (600 et 1200 mg d' α -T) sur la teneur en LPO du foie de rats en croissance.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ SE (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ entre témoin et groupe traités ;(a: comparaison avec le lot HF, b: comparaison avec le lot HO, c: comparaison avec le lot HO α T₆₀₀).

L'étude de l'évolution de l'activité de l'ensemble des enzymes antioxydantes, à savoir, GPx, CAT, SOD, GRD and G6PDH du tissu hépatique est portée Figure 3.

Les résultats du traitement des rats avec 5% d'huile oxydée (lot HO) comparés à ceux du témoin (lot HF), nous ont permis d'obtenir une diminution significative des activités de la GPx ($p=0,014$) (Fig. 3a),

et de la CAT ($p=0,020$) (Fig. 3b), tandis que l'activité de la SOD diminue mais d'une manière non significative (Fig. 3c). La GR subit la même variation que celle subie par la GPx mais d'une manière non

significative (Fig. 3d), du fait de son implication dans un système métabolique commun, également la G6PDH diminue d'une manière non significative (Fig. 3e).

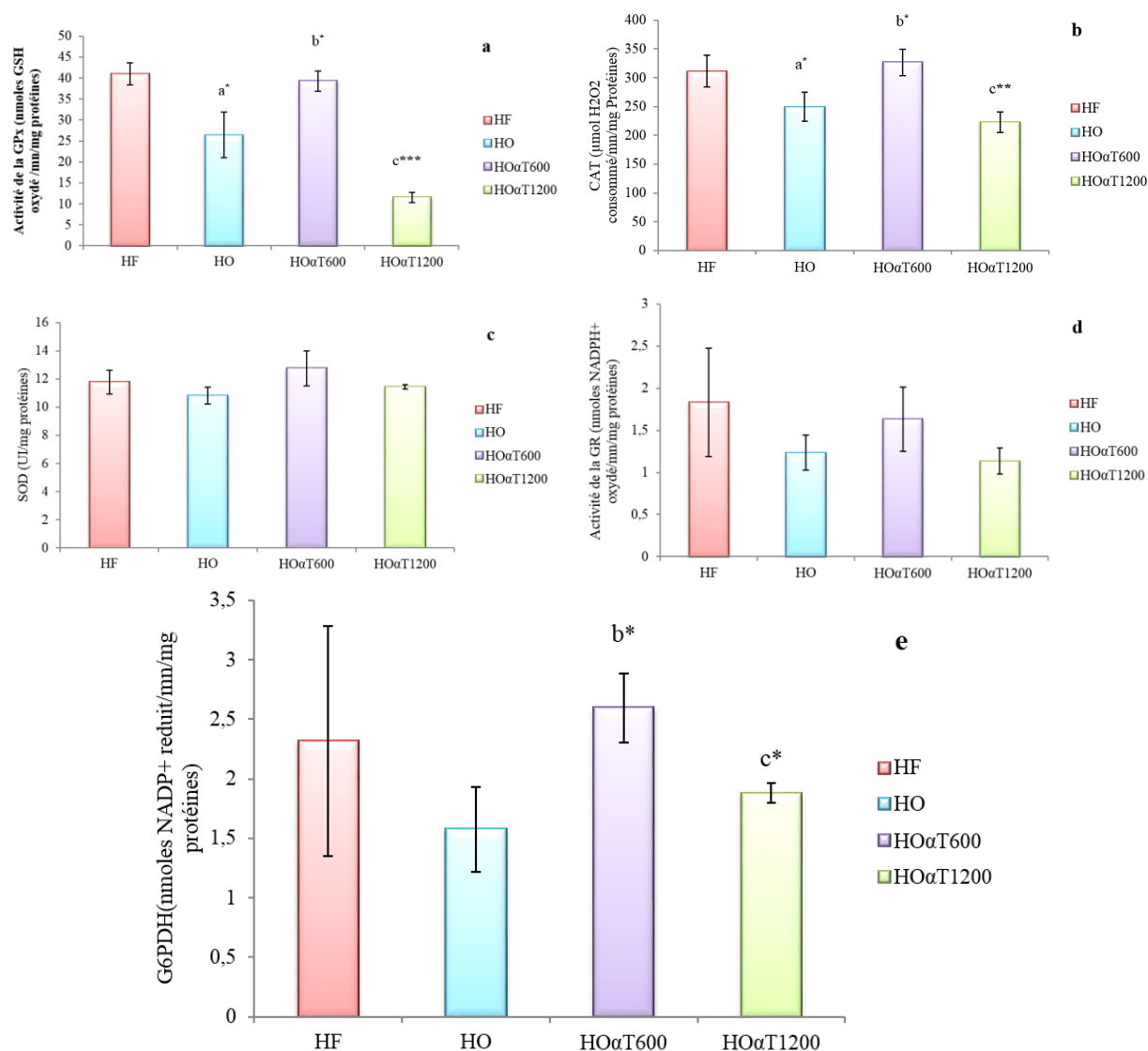


Figure 3 : Effets d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée et supplémenté en vitamine E (600 et 1200 mg d'α-T) sur l'activité du système enzymatique antioxydant (GPx, CAT, SOD, GR et G6PDHase) du foie de rats en croissance.

Chaque barre représente la moyenne $\pm$ SE (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ entre témoin et groupe traités (a: comparaison avec le lot HF, b: comparaison avec le lot HO, c: comparaison avec le lot HOαT₆₀₀)).

Concernant les résultats obtenus lors de la supplémentation du régime contenant 5% d'huile oxydée avec 600 mg d' α -T/ kg de régime et comparés avec ceux du lot HO, et ceci afin d'observer l'effet d'une telle supplémentation sur les paramètres antioxydants. Les résultats que nous avons obtenus ont montré, une augmentation significative des activités de la GPx ($p=0,02$) et de la CAT ($p=0,017$) tandis que l'activité de la SOD augmente mais d'une manière non significative, la GR subie la même variation que celle subit par la GPx mais d'une manière non significative, par contre la G6PDH augmente d'une manière significative ($p=0,019$).

Le groupe de rats soumis à un régime alimentaire contenant 5 % d'huile oxydée et supplémenté avec 1200 mg d' α T/kg d'aliment (HO α T₁₂₀₀), une diminution très significative de la CAT ($p=0,003$) et hautement significative de la GPx ($p=0,0001$) ainsi qu'une diminution non significative du reste des enzymes antioxydantes à sa savoir la SOD, la GR

par contre et la G6PDH diminue elle de manière significative ($p=0,015$) par rapport au lot HO α T₆₀₀. Ces résultats suggèrent un effet prooxydatif de l' α T à 1200 mg/kg d'aliment. De nombreuses études réalisées *in vitro* ont montré qu'une supplémentation élevée en α -T a une activité prooxydative, mais très peu d'études ont examiné cet effet *in vivo* d'où l'intérêt de la présente étude qui a été entreprise pour examiner le potentiel prooxydant d'une dose élevée de vitamine E au niveau du tissu hépatique chez le rat en croissance.

2. Changements histopathologiques

L'étude des coupes histologiques du tissu hépatique du lot FH, montrent une architecture normale des cellules hépatiques (Fig. 4a), par contre le lot HO révèle deux foyers inflammatoires importants ainsi qu'une dégénérescence des cellules hépatiques (Fig. 4b) correspondant à des zones nécrosées, suggérant l'effet toxique de l'huile de tournesol oxydée causant ainsi des dommages importants au niveau du foie.

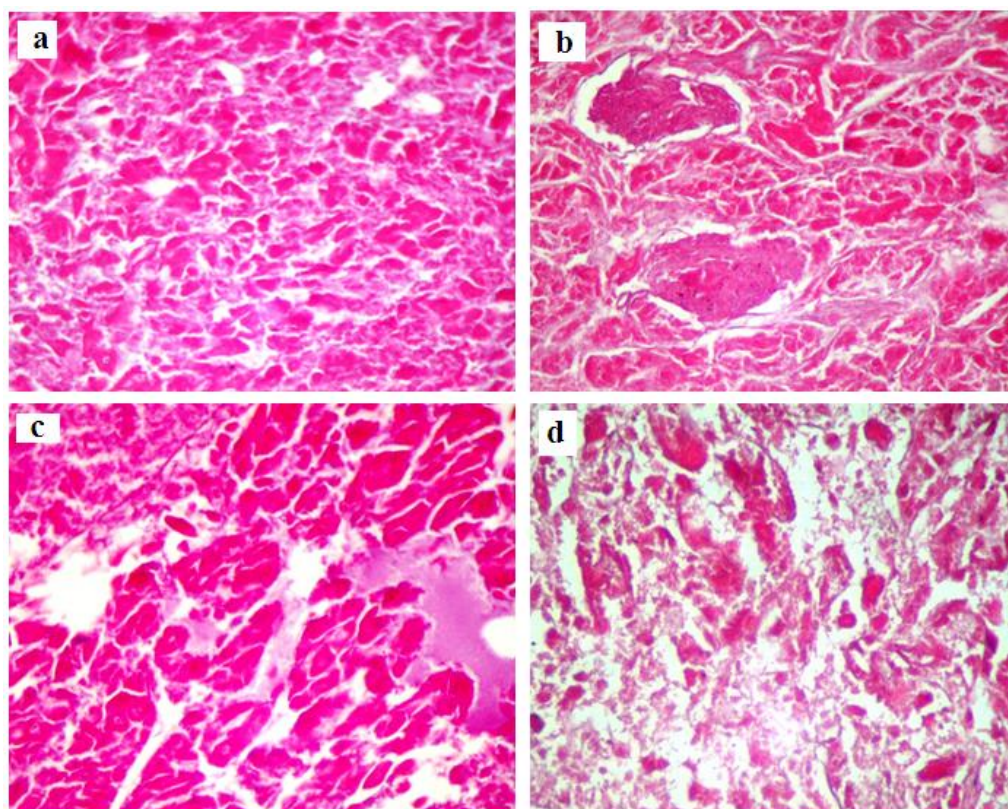


Figure 4 : Microphotographie du foie de rat (10x, H&E)

(a) architecture normal chez le lot HF, (b) foyers inflammatoires chez le lot HO, (c) le lot HO α -T₆₀₀, montrant l'absence de foyer inflammatoires, (d) lot HO α -T₁₂₀₀ montrant une altération cellulaire importante.

Concernant les coupes histologiques obtenues du foie de rats nourris avec 5% d'huile oxydée et supplémentée avec 600 mg d' α -T / kg d'aliment : HO α T600 montrent des noyaux disposés au milieu de la cellule traduisant la fonctionnalité de celle-ci, une légère congestion est présente (Fig. 4c) ceci suggère les propriétés non-toxiques d'huile oxydée si une dose modérée d' α -T est incorporée dans le régime. En revanche, la supplémentation avec 1200 mg d' α T / kg d'aliment contenant 5% d'huile oxydée : lot HO α T1200 induit un changement morphologique plus sévère que l'huile oxydée seul lot HO, nous observons une altération étendue des cellules, le nombre de cellules viables est faible et la présence de larges zones nécrosées (Fig. 4d).

DISCUSSION

Les résultats obtenus lors de la présente étude montrent que l'huile oxydée a réellement un effet toxique confirmé par l'augmentation du taux en lipoperoxydes (LPO) dans le tissu hépatique accompagné par la baisse du système de protection antioxydant. L'augmentation significative du LPO accompagnée de la diminution significative des enzymes intervenants dans la détoxification des LPO notamment la GPx et la CAT, a été décrite par Roubal et Tappel [20], qui ont indiqué que les effets nocifs des LPO sur les protéines consistaient en des dénaturations plus ou moins marquées se traduisant par des baisses de solubilité. Les radicaux alkoxyl et alkylperoxyl soustraient des H $^\bullet$ aux protéines préférentiellement au niveau du -OH des tyrosines, du -SH des cystéines et des méthionines, du -NH $_3^+$ des lysines, du -NH des histidines, des tryptophanes et des arginines. Selon Pre [21], les thioenzymes sont très sensibles à l'inactivation radicalaire par formation d'un radical thiyl (RS $^\bullet$) puis d'un pont disulfure (R-S-S-R), il en déduit que la lipoperoxydation peut inactiver de nombreuses enzymes cellulaires. De même Dickens *et al.* [22], indiquent que les radicaux et les aldéhydes issus de la lipoperoxydation endommagent toutes les membranes - et par la même, les organites subcellulaires - ainsi que les protéines (enzymes notamment) et le génome, leur action sur la membrane des lysosomes est lourde de conséquences, car elle peut conduire à leur rupture qui s'accompagne

de la libération d'enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines, des acides nucléiques et des polysaccharides cellulaires (dépolymérisation de l'acide hyaluronique au niveau de la matrice extracellulaire). D'ailleurs Deisseroth et Dounce [23] et De Groot *et al.* [24], expliquent que le mécanisme par lequel l'augmentation des ROS peut diminuer l'activité de la SOD et de la GPx est le clivage de ces enzymes par les ROS, ces derniers peuvent causer des clivages des liaisons Cu-SOD et Zn-SOD suivie de la fragmentation du Cu médiateur de la réaction de Fenton. La diminution hautement significative de l' α -T vient confirmée la présence d'une teneur élevée en ROS, du fait est que l' α -T participation activement dans la capture des ROS formés lors de l'oxydation de l'huile.

Les coupes histologiques du HO, viennent confirmés les résultats biochimiques obtenus. Il est vrai que l'huile oxydée a générée des radicaux libres qui endommagent toutes les membranes - et par la même, les organites subcellulaires - ainsi que les protéines (enzymes notamment) et le génome, leur action sur la membrane des lysosomes est lourde de conséquences, car elle peut conduire à leur rupture qui s'accompagne de la libération d'enzymes catalysant l'hydrolyse des protéines, des acides nucléiques et des polysaccharides cellulaires (dépolymérisation de l'acide hyaluronique) [21].

Concernant les rats nourris avec un régime contenant 5% d'huile oxydée et supplémentation de 600 mg/kg de régime (HO α T $_{600}$), les résultats obtenus ont montrés une augmentation hautement significative de l' α -T parallèlement à une diminution significative du taux en LPO ce qui laisse penser que la vitamine E ait joué un rôle crucial dans la neutralisation des hydroperoxydes de l'huile oxydée. La teneur en α -T est de 600 mg/kg d'aliments pour le lot HO α T $_{600}$, cette valeur est excédentaire par rapport au minimum conseillé qui est de 50 à 60 mg/ kg d'aliments pour le rat [25]. Selon Bowry et Stocker [26], la vitamine E doit son effet biologique à sa fonction comme antioxydant liposoluble, prenant en charge la majorité des radicaux libres. L' α -T est biologiquement et chimiquement la forme la plus active de la vitamine E.

Par ailleurs Sharma *et al.* [27], ont eux aussi obtenus une élévation des radicaux libres et ont expliqué ce fait par la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx); enzymes protégeant les tissus de la peroxydation lipidique; mais qu'en présence de la vitamine E et en une concentration adéquate, celle-ci permettait la prévention de la production de radicaux libres et donc protégeait ces enzymes antioxydantes.

Il a été clairement montré de par l'étude histologique que 600 mg d' α -T incorporés dans 1 kg de régime a protégé les rats contre les effets délétères de l'huile oxydée. En effet, selon Sridevi *et al.* [28], la fonction principale de l' α -T est de prévenir la peroxydation des phospholipides membranaires et des dommages membranaires via l'activité antioxydante. Ainsi, l'activité antioxydante de la vitamine E a la capacité d'éviter l'apparition de maladies chroniques, particulièrement celles causées par un composant du stress oxydatif: comme les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose et le cancer [29, 30].

Lors du mécanisme de protection contre la peroxydation lipidique, l' α -T est oxydé sous une forme régénérable, la forme radicalaire chromane-6-oxyle α -TO*, par les espèces moléculaires oxydées préalablement formées, par exemple les radicaux acylperoxydes. Ce qui fait l'une des particularités importantes de la vitamine E, c'est la nature physiologiquement régénérable de α -TO*. Celui-ci entre en effet dans une chaîne de réactions dont l'organisme est équipé qui fait elle-même intervenir une autre vitamine, la vitamine C (ascorbate), qui, une fois oxydée par suite de la régénération de α -TO*, est elle-même régénérée par le GSH et/ou l'acide dihydrolipoïque comme intermédiaire d'oxydo-réduction, et la glucose-6-phosphate-deshydrogénase comme pourvoyeur terminal d'éléments réducteurs (NADPH) [31]. La vitamine E joue un rôle important dans la détoxification des LPO, l' α -T protège les acides gras polyéthyléniques membranaires, son action s'effectue en phase lipidique. Cette vitamine E, après avoir piégé les radicaux libres, doit être régénérée.

En effet, étant donné que les autres systèmes de protection contre les radicaux libres se situent dans divers compartiments cellulaires, notamment le cytosol, les interactions entre les phases lipidiques et liquides sont probablement plus élaborées, sont principalement impliquée la vitamine C, le glutathion ainsi que la GPx, la CAT, les SOD et d'autres enzymes [32].

Les résultats obtenus pour le lot HO α T₁₂₀₀ et qui ont montrés une augmentation très significative des LPO, une baisse très significative de l' α -T et une baisse de l'ensemble des enzymes antioxydantes dont certaines de manière significative (CAT, GPx et G6PDase) prouvent que l' α -T à une telle dose (1200 mg/kg de régime) n'a fait qu'accroître l'effet oxydant de l'huile au lieu de l'atténuer. Nos résultats corroborent avec ceux Hajiani *et al.* [33], qui ont observé que la vitamine E a un effet antioxydant quand elle est administrée à de faibles doses et sur des périodes courtes et permet l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. Par contre à fortes doses et sur des périodes assez longues, la teneur en LPO augmente et est accompagnée d'une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes. Ils émettent l'hypothèse que la vitamine E régule les enzymes antioxydantes par un effet chimique direct.

Tout comme dans notre cas d'autres auteurs comme Kiron *et al.* [34], ont montré que la forte dose en α -T (1000 mg/kg d'aliment) n'a pas servi en tant qu'antioxydant, mais comme prooxydant lors d'un stress oxydatif modéré; et en 2007, Fu *et al.* [35], qui ont étudié l'effet de la vitamine E sur les activités enzymatiques antioxydantes (CAT, SOD et GPx) de l'ormeau *Haliotis discus hannai*, et ont déduit que la vitamine E (5,000 mg/kg) n'a pas servi comme antioxydant, mais apparaît plutôt comme un prooxydant.

Il est vrai que lors d'un stress oxydatif important, la concentration en radicaux libres est très élevée. Dans ce cas, l' α -T va jouer son rôle d'antioxydant et générer ainsi le radical tocophéroxyl. Ce dernier, va se combiner avec un autre radical libre formant ainsi ce qu'on appelle un « produit non radicalaire »,

d'où l'interruption de la réaction en chaîne de la lipoperoxydation, donc l'acide ascorbique est un co-antioxydant mais ne joue pas un rôle très important dans ces conditions, c'est-à-dire lors d'un stress oxydatif important, certes il contribue à la diminution de radicaux libres mais à lui seul, sa présence n'est pas suffisante. Dans le cas d'un stress oxydatif modéré, la concentration de radicaux libres n'est pas importante au point où l'ensemble des radicaux tocophéroxyl produits lors du processus d'antioxydant puissent se combiner entre eux, c'est pour cela, que la présence et la concentration de l'acide ascorbique est importante car c'est ce co-antioxydant qui va régénérer l' α -T, si la concentration de l'acide ascorbique est faible, il y'a apparition de l'effet prooxydant de l' α -T, car l'alpha-tocophéroxyl, va extraire un électrons aux acides gras des phospholipides des membranes et donc propager la réaction en chaîne de la lipoperoxydation. Si au contraire la concentration de l'acide ascorbique est adéquate par rapport à la concentration de l' α -T supplémentée, dans ce cas-là, nous aurons un effet antioxydant, car l'ensemble des radicaux tocophéroxyl générés lors de l'effet antioxydant de l' α -T, ont pu être régénérés par l'acide ascorbique. D'ailleurs Kontush *et al.* [36], précisent qu'*in vivo*, et en présence de fortes concentrations de co-antioxydants et dans des conditions oxydatives modérées, l' α -T devrait normalement se comporter comme un antioxydant. Mais il peut se développer un effet prooxydant, quand les co-antioxydants sont épuisés dans les conditions d'oxydation modérées.

L'histologie du tissu hépatique des rats nourris du lot HO α -T₁₂₀₀, a montré une altération importante du tissu, donc à cette concentration l' α -T a joué un rôle prooxydant et non antioxydant. Selon Stocker [37], quand le système antioxydant est équilibré, cette action prooxydante de l' α -tocophéroxyl est inhibée par les co-antioxydants. Cependant, les concentrations élevées d' α -T surproduisent des radicaux α -tocophéroxyl, qui ne peuvent plus être efficacement désintoxiqués par les co-antioxydants. C'est ce mécanisme cité par Stocker qui a été observé dans la présente étude, d'où une toxicité plus importante

chez le groupe HO α -T₁₂₀₀ que chez le groupe HO.

Dans notre cas, nous avons obtenu un effet prooxydant de l' α -T, démontré par la baisse de l'activité de l'ensemble des enzymes antioxydantes et de la teneur en α -T et surtout par l'élévation du taux en LPO. Le stress induit par les 5% d'huile oxydée chez les rats en croissance était un stress modéré. Nous étions donc dans des conditions d'oxydation modérées, il y avait certes une concentration élevée d' α -T, qui a joué le rôle d'antioxydant d'où la baisse de la teneur en α -T, générant ainsi le radical tocophéroxyl. Dans notre cas, ce dernier a propagé la peroxydation lipidique se traduisant par l'augmentation de la teneur en LPO, vu qu'il n'y avait pas une concentration adéquate d'acide ascorbique pour régénérer l' α -T et de même rompre la chaîne de propagation de la lipoperoxydation.

CONCLUSION

L'ingestion de l'huile oxydée a induit l'augmentation des LPO et la diminution des activités spécifiques des enzymes antioxydantes dans les cellules hépatiques de rats en plein croissance, indiquant un déséquilibre de la balance prooxydant/antioxydant, ce qui a induit un état de stress oxydatif, ce dernier a pu être rétabli par la supplémentation de 600 mg d' α -T/ kg de régime montrant ainsi l'effet antioxydant de l' α -T. Mais contrairement à nos attentes la dose de 1200 mg/kg d' α -T a fait basculer l'effet antioxydant en un effet prooxydant de cette vitamine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Graille J. (2003). *Lipides et corps gras alimentaires*. Paris: Lavoisier Tec et Doc, 469 p.
- [2]. Li J., Li W., Jiang Z.G. and Ghanbari H.A. (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12): 24438-24475.
- [3]. Tang S. Y. and Halliwell B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(1): 1-5.
- [4]. Defraigne J.O. and Pincemail J. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liège*, 63: 10-19.

- [5]. **Tanguy M. and Begué-Simon A.M. (2009).** Antioxydants: Deuxième partie: données cliniques d'efficacité. *Médecine*, 5(7): 303-307.
- [6]. **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M.M. and Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40.
- [7]. **Bowry V.M., Igold S. and Stocker R. (1992).** Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a prooxidant. *Biochem. J.*, 288: 341 – 344.
- [8]. **Mukai K. (1993).** Synthesis and kinetic study of antioxidant and prooxidant actions of vitamin E derivatives. Vitamin E in health and disease. *Marcel Dekker, New York*. 97-119.
- [9]. **Thomas S. R., Neužil J. and Stocker R. (1996).** Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of α -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16(5): 687-696.
- [10]. **Holman T. (1970).** *Essential fatty acid deficiency*. In progress in the chemistry of fats and other lipids. Vol IX Polyunsaturated fatty acid part 2 New York, Pergamon Press, 275-348.
- [11]. **Lowry O.M., Rosenbrough R.P. and Williams A. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- [12]. **Draper H.H., Squirese J., Mahmoudi H., Wu J., Agarwal S. and Hadley M. (1993).** A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine*, 15: 353-363.
- [13]. **Marklund S.L. and Marklund G. (1974).** Involvement of the superoxide anion in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47: 469-474.
- [14]. **Aebi H. (1984).** Catalase in vitro. *Methods in Enzymol.*, 105: 121 – 126.
- [15]. **Paglia D.E. and Valentine W.N. (1967).** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Med.* 70:158-69.
- [16]. **Goldberg D. M., and Spooner R. J. (1983).** In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., Ed.), 3rd ed., Vol. 3, pp. 258- 265, Verlag Chemie, Deerfield Beach, FL.
- [17]. **Bergmeyer H.U. (1963).** *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 744 – 751 and 875 – 879, Academic Press, New York.
- [18]. **Desai J.D. (1984)** Vitamin E analysis method for animal tissues. *Methods in Enzymol.*, 105 : 138 – 147.
- [19]. **Martoja R. et Martoja-Piereson M. (1967).** *Initiation aux Techniques de l'Histologie animale*. Paris: Masson 345 p.
- [20]. **Roubal W.T. and Tappel A.L. (1966).** Damage to proteins, enzymes and amino acids by peroxidizing lipids. *Archs Biochim. Biophys.*, 111: 5-8.
- [21]. **Pre J. (1991).** La lipoperoxydation. *Path. Biol.*, 39 (7): 716-787
- [22]. **Dickens B., Mak I. and Weiglicki W. (1988).** Lysosomal lipolytic enzymes, lipid peroxidation and injury. *Mol. Cell. Biochem.*, 82: 119-123.
- [23]. **Deisseroth A. and Dounce A. (1970).** Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.*, 50: 319-375.
- [24]. **De Groot H., Noll T. and Tolle T. (1985).** Loss of latent activity of liver microsomal membrane enzymes evoked by lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 815: 91-96.
- [25]. **Oarada M., Ito E., Terao K., Miyazawa T., Fujimoto K. and Kaneda T. (1988).** The effect of dietary lipid hydroperoxide on lymphoid tissues in mice. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 960 (2): 229-235.
- [26]. **Bowry V.W. and Stocker R. (1993).** Tocopherol-Mediated Peroxidation. The Prooxidant Effect of Vitamin E on the Radical-Initiated Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 6029-6044.
- [27]. **Sharma N., Desigan B., Ghosh S., Ganguly N.K. and Majumdar S. (1999).** Effect of antioxidant vitamin E protective factor in experimental atherosclerosis in rhesus monkeys. *Annals of Nutrition and Metabolism.*, 43: 181-190.
- [28]. **Sridevi N., Venkataraman P., Senthilkumar K., Krishnamoorthy G. and Arunakaran J. (2007).** Oxidative stress modulates membrane bound ATPases in brain regions of PCB (Aroclor 1254) exposed rats: Protective role of α -tocopherol. *Biomed. Pharmacother.*, 61: 435 – 440.
- [29]. **Stampfer M., Hennekens C., Manson J., Colditz G., Rosner B. and Willett W. (1993).** Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N. Engl. J. Med.*, 328: 1444 – 1449.
- [30]. **Nwanguma B.C., Achebe A.C., Ezeanyika L.U. and Eze L.C. (1998).** Toxicity of oxidized fats II: tissue levels of lipid peroxides in rats fed a thermally oxidized corn oil diet. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 413 – 416.

- [31]. Stoyanovsky D. A., Goldman R., Darrow R.M., Organisciak D.T. and Kagana V.E. (1995). Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipoic acid. *Current Eye Research*, 14 (3):181-189.
- [32]. Bourre J.M. (1996). Developpement du cerveau et acides gras polyinsaturés. *OCL*, 3 : 173-178.
- [33]. Hajiani M., Golestani A., Shariftabrizi A., Rastegar R., Payabvash S., Salmasi A.H., Dehpour A.R. and Pasalar P. (2008). Dose-dependent modulation of systemic lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes by vitamin E in the rat. *Redox Rep.*, 13: 60 – 66.
- [34]. Kiron V., Puangkaew J., Ishizaka K., Satoh S. and Watanabe T. (2004). Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with, three lipid sources. *Aquaculture*, 234: 361 – 379.
- [35]. Fu J., Zhang Hang W., Mai K., Feng X., Xu W., Liu fu Z., Ma M. and Ai A. (2007). Effects of vitamin E on antioxidant enzyme activities and fatty acid compositions in juvenile Abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Shellfish Research*, 26 (3) : 809–814.
- [36]. Kontush A., Finckh B., Karten B., Kohlschu A. and Beisiegel U. (1996). Antioxidant and prooxidant activity of α-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, 37: 1436 – 1448.
- [37]. Stocker R. (1999). The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *TIBS*, 24: 219.