

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

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE

EL-HARRACH/ ALGER

THESE

Présentée par F. Rouaki

En vue de l'obtention du titre de Docteur d'Etat ès-Sciences

En Agronomie option Sciences Alimentaires

**EFFETS DE L'INGESTION DE L'HUILE DE TOURNESOL OXYDEE ET DE LA
SUPPLEMENTATION EN ALPHA-TOCOPHEROL SUR CERTAINS PARAMETRES
STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DU TISSU CARDIAQUE CHEZ LE RAT EN
CROISSANCE**

soutenue publiquement le : 02/06/2016 devant la commission d'examen composée de :

Président :	Mr. L. MEKIMEN	Maitre de conférences « A »
Rapporteur :	Mr. A. AMMOUCHE	Professeur
Examineur :	Mr. C. CHELGHOU	Professeur
Examineur :	Mr. A. NOUANI	Maitre de conférences « A »

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

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE

EL-HARRACH/ ALGER

THESE

Présentée par F. Rouaki

En vue de l'obtention du titre de Docteur d'Etat ès-Sciences

En Agronomie option Sciences Alimentaires

**EFFETS DE L'INGESTION DE L'HUILE DE TOURNESOL OXYDEE ET DE LA
SUPPLEMENTATION EN ALPHA-TOCOPHEROL SUR CERTAINS PARAMETRES
STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DU TISSU CARDIAQUE CHEZ LE RAT EN
CROISSANCE**

**soutenu publiquement le : 02/06/2016 devant la commission d'examen
composée de :**

Président :	Mr. L. MEKIMEN	Maitre de conférences « A »
Rapporteur :	Mr. A. AMMOUCHE	Professeur
Examineur :	Mr. C. CHELGHOUM	Professeur
Examineur :	Mr. A. NOUANI	Maitre de conférences « A »

Je dédie ce travail

A ma chère mère, qu'elle retrouve ici tout mon amour

*A la mémoire de mon cher père, sans qui je ne serai pas ou j'en suis aujourd'hui,
qu'il aurait été heureux*

*A mon cher Lounes, pour sa patience et de m'avoir tenu la main jusqu'aux
dernières lignes de ce mémoire*

A la mémoire de mon cher frère Hamouda

A toi Nour, ma nièce préférée, toi ma belle qui a été ravie à la fleur de l'âge

A mes sœurs Houria et Nacera, qu'elles retrouvent ici toute mon affection

A mes frères Karim, Mohamed et Brahim

A mes deux adorables enfants Amine et Rania

A Amel et Rosa mes chères amies

A toute ma famille

Fayrouz

« ... ne te fie pas à tes yeux, tout ce qui te montrent ce sont des limites, les tiennes, regarde avec ton esprit, découvre ce dont d'ores et déjà tu as la conviction et tu trouveras la voie de l'envol ... »

R. Batch

Sommaire

AVANT PROPOS

RESUME

PUBLICATION

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ABREVIATIONS

INTRODUCTION	1
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I : LES LIPIDES	4
I. 1. Les lipides alimentaires et leur digestion	4
I. 1. 1. Structures moléculaires	4
I. 1.2. Digestion des lipides	7
I. 1. 3. Absorption intestinale des lipides	8
I. 2. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne : essentiels mais sensibles à l'oxydation.....	12
I. 2. 1. Sources et métabolisme des AGPI	12
CHAPITRE II: LE STRESS OXYDATIF	14
II. 1. Présentation des notions d'espèces réactives oxydantes et de radicaux libres:	14
II. 2. Définition du stress oxydant:.....	15
II. 2. 1. Conséquences du stress oxydant	16
II. 3. Les principales Espèces Réactives Oxydantes dans la cellule : formation et caractéristiques..	17
II. 3. 1. Espèces réactives oxydantes radicalaires	18
II. 3. 2. Espèces réactives d'oxygènes non radicalaires	20
II. 3. 3. Le cas des métaux de transition	21
II. 4. Les Dégâts oxydatifs cellulaires	21
II. 4. 1. Peroxydation lipidique.....	21
II. 4. 2. Oxydation des protéines.....	22

II. 4. 3. Dommages oxydatifs de l'ADN	22
II. 4. 4. Les cibles glucidiques du stress oxydant	23
CHAPITRE III : LES PATHOLOGIES LIEES AU STRESS OXYDANT.....	24
III. 1. Cancer.....	24
III. 2. Allergies	24
III.3. Maladies neurodégénératives : la piste oxydative.....	25
III. 4. Le diabète et l'hyperglycémie	25
III. 5. Le vieillissement cellulaire.....	26
III. 5. 1. Théorie radicalaire.....	26
III. 5. 2. La restriction calorique	26
III. 5. 3. Stress oxydant et inflammation.....	27
III. 6. Les pathologies vasculaires et cardiaques.....	27
III. 6. 1. L'insuffisance cardiaque	27
III. 6. 2. Pathologies vasculaires.....	27
CHAPITRE IV : LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS.....	29
IV. 1. Systèmes antioxydants enzymatiques	29
IV. 1. 1. Les superoxydes dismutases	29
IV. 1. 2. Glutathion peroxydase	30
IV.1. 3. Catalase (CAT)	31
IV. 1. 4. Peroxyredoxines.....	31
IV. 2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	31
IV. 2. 1. Vitamine E	31
IV. 2. 2. Vitamine C	32
IV. 2. 3. Caroténoïdes	32
IV. 2. 4. Polyphénols et flavonoïdes	33
IV. 2. 5. Taurine	34
IV. 2. 6. Oligo-éléments	34
IV. 2.7. Minéraux	35

CHAPITRE V : LA VITAMINE E	35
V. 1. Historique	35
V. 2. Structure chimique	36
V. 3. Propriétés physico-chimiques	37
V. 4. Vitamine E et peroxydation lipidique	37
V. 4. 1. Mécanismes d'oxydation des lipides.....	37
IV. 4. 2. Action antioxydante de la vitamine E.....	38
IV. 4. 3. Les tocophérols piègent l'oxygène singulet	39
IV. 4. 4. Métabolisme de l'acide arachidonique.....	39
IV. 5. Sources	39
IV. 6. Toxicité des antioxydants	40
IV. 6. 1. Effet antivitamine K.....	40
VI. 6. 2. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques.....	40
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	42
I. MATERIEL.....	42
I.1. Animaux étudiés	42
I.2. Elevage.....	42
I.3. Préparation des régimes	43
I. 4. Réactifs et appareillage	44
I. 4. 1. Réactifs	44
I. 4. 2. Chromatographie en phase gazeuse	44
I. 4. 3. Chromatographie d'adsorption	45
I.4.4. Chromatographie Liquide Haute Performance	45
II. METHODES.....	46
II.1. Dégradation de l'huile	46
II.2. Etude de l'état d'altération de l'huile	46
II.2.1. Mesure de l'état d'altération globale.....	46
II.2.2. Dosage des produits polaires	47

II.3. Sacrifices et prélèvements	47
II. 4. Etude du tissu cardiaque	48
II. 4 .1. Préparation de l'homogénat cardiaque	48
II. 4. 2. Dosage des protéines	48
II. 4. 3. Peroxydation lipidique.....	48
II. 4. 4. Dosages enzymatiques	49
III. Analyse statistiques des résultats	53
PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION.....	54
I. Etude de l'huile de tournesol oxydée.....	54
I. 1. Choix de la méthode dégradative de l'huile.....	54
I. 2. Formation de mousse stable au cours de la dégradation	55
I. 3. Evolution de l'indice de peroxyde au cours de la dégradation	56
I. 4. Estimation de l'état d'altération de l'huile de tournesol	58
I. 5. Composition en acides gras de l'huile fraîche et oxydée	60
I. 6. Etude des produits secondaires d'autoxydation de l'huile oxydée : dérivés polaires	61
II. Administration de l'huile dégradée à l'animal.....	63
II. 1. Effets de l'huile oxydée associée ou non à une supplémentation en vitamine E sur la croissance	64
II. 2. Effets de l'huile oxydée associée ou non à une supplémentation en vitamine E sur la variation du poids du tissu cardiaque	66
III. Effets des différents régimes sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation au niveau du tissu cardiaque	68
III. 1. Effets d'un régime à 5% d'huile de tournesol oxydée sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation	68
III. 2. Effets de la supplémentation en alpha-tocophérol à un taux de 600 mg/kg d'aliment dans un régime contenant 5% d'huile oxydée sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation	74

III. 3. Effets de la supplémentation en alpha-tocophérol à un taux de 1200 mg/kg d'aliment dans un régime contenant 5% d'huile oxydée sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation	81
III. 4. Effets de la supplémentation en vitamine E aux taux de 600 et 1200 mg/kg d'aliment à un régime contenant 5% d'huile oxydée au niveau des cellules cardiaques	88
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	95
ANNEXES.....	110

PUBLICATIONS

1. Effect of Ingestion of Thermally Oxidized Sunflower Oil on the Fatty Acid Composition and Antioxidant Enzymes of Rat Liver and Brain in Development

Ammouche.A., Rouaki. F., Bitam. A., Bellal. M. M.

Annals of Nutrition and Metabolism Vol. 46, 268–275. 2002.

**2. Cardiotoxicity Induced by Dietary Oxidized Sunflower Oil in Rats:
Pro- and Antioxidant Effects of α -Tocopherol**

Rouaki F., Mazari A., Kanane A., Errahmani M. B., Ammouche A:

International Journal for Vitamin and Nutrition Research Vol. 83, N°6, 367 – 376. 2013.

RESUME

Ce travail a pour objectif d'étudier l'incidence de l'ingestion de l'huile de tournesol oxydée, obtenue par chauffage à 98°C avec insufflation d'air pendant 46 heures et incorporée à 5% dans un régime alipidique supplémenté ou non d'alpha-tocophérol, sur le système enzymatique antioxydant (Glutathion peroxydase, superoxyde dismutase et catalase) et d'évaluer la lipoperoxydation par le dosage du malondialdéhyde (MDA) ainsi que l'étude histologique du tissu cardiaque de rats de souche wistar en croissance.

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

L'huile oxydée renferme 232 mmol/kg d'hydroperoxydes, 2.8 de produits secondaires (dicétones éthyléniques), il y a eu baisse de 40% d'acide linoléique par rapport à l'huile fraîche, elle contient 71.7% de glycérides polaires et 43.3% d'esters polaires, ces résultats montrent un état d'altération important de cette huile.

Malgré une dégradation oxydative importante de l'huile, elle reste relativement tolérée par l'animal. Elle provoque une réduction presque du quart de la croissance pondérale.

Au niveau du tissu cardiaque, nous notons une diminution significative de la Glutathion peroxydase (GPx) et de la Catalase (CAT) accompagnée d'une augmentation significative du MDA, montrant l'altération de ces enzymes par les espèces radicalaires oxygénées (ERO). Concernant le lot supplémenté à 600 mg d'alpha-tocophérol, nous avons obtenu l'augmentation significative de deux de enzymes à savoir la GPx et la CAT et une diminution de la teneur en MDA, ce qui montre l'effet protecteur de l'alpha-tocopherol vis-à-vis des ERO. Par contre nous avons noté pour le lot supplémenté à 1200 mg d'alpha-tocophérol une diminution significative de la GPx et de la CAT suivi de l'augmentation significative du MDA, dans ce cas précis l'alpha-tocophérol n'a pas agit en tant qu'antioxydant mais a eu plutôt tendance à agir en tant que prooxydant. Enfin, les coupes histologiques n'ont fait font que confirmer l'ensemble de ces résultats.

Mots clés : Huile oxydée, enzymes antioxydantes, vitamine E, rat, cœur, antioxydant, prooxydant.

الملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة تأثير تناول زيت عباد الشمس المؤكسد، والذي تم الحصول عليه عن طريق التسخين إلى 98 درجة مئوية مع نفخ الهواء لمدة 46 ساعة، ودمج 5 بالمئة منه في نظام دسم بإضافة أو عدم إضافة ألفا توكوفيرول (Alpha-tocophérol) في نظام إنزيمي مضاد للأكسدة (الجلوتاثيون، الفائق والكتالاز، وتقييم أكسدة السمنون غير المسبوع، وبيس (Malondialdéhyde MDA) وكذلك الفحص النسيجي لأنسجة قلوب فئران من سلالة ويستار في مرحلة نمو.

بعد هذه الفترة التجريبية، النتائج الأساسية المحصل عليها تبين أن:

الزيت المؤكسد يحتوي على 232 مليمول/كغ من (Hydroperoxydes) ، 2.8 من المنتجات الثانوية صرجا، نحوي على سبه 1.1٪ من جلسريدات القطبية و43.3٪ من استرات القطبية، وتشير هذه النتائج إلى تغيير كبير في هذا الزيت.

وعلى الرغم من الانخفاض التأكسدي الكبير للزيت، فإنه لا يزال مسموحا به نسبيا الحيوان. فإنه يؤدي إلى خفض ما يقرب من ربع الزيادة في الوزن.

على مستوى أنسجة القلب، نلاحظ انخفاضا ملحوظاً في الجلوتاثيون البيروكسيداز (GPx) والكتالاز، مصحوباً بزيادة معتبرة للـ (MDA) ، مبيئة التغيير في هذه الإنزيمات بواسطة الامنصره الاحسيجيه (ERO) فيما يتعلق بإضافة 500 مع من ألفا-توكوفيرول، حصلنا على زيادة معتبرة في الإنزيمين GPx و CAT

ونقص في محتوى (MDA) مما يبين التأثير الوقائي للـ ألفا-توكوفيرول في مقابل (ERO) في المقابل، سجلنا مع دسم 1200 مغ من (Alpha-tocophérol) ، انخفاض معتبر في CAT و GPx ، متبوعة بزيادة معتبرة في (MDA) في هذه الحالة الخاصة مع توكوفيرول لا يعمل كمصاد للاكسده ونحن حان به ميل لدافع للأكسدة. وأخيرا، كانت المقاطع النسيجية فقط للتأكد من كل هذه النتائج.

كلمات البحث: الزيت المؤكسد، إنزيمات مضادة للأكسدة، فيتامين E ، فآر، قلب، مضاد للأكسدة، دافع للأكسدة.

Abstract

This work aims to study the impact of the ingestion of oxidized sunflower oil, obtained by heating at 98 ° C with blowing air for 46 hours and embedded in a 5% alipidique diet supplemented or not alpha-tocopherol in different doses (600 and 1200 mg) on antioxidant enzyme system (Glutathione peroxidase, Superoxide dismutase and Catalase) and evaluate lipoperoxidation by the determination of malondialdehyde (MDA) as well as histological examination of heart tissue of wistar rats growing.

After this trial period, the main results show that:

The oxidized oil contains 232 mmol / kg hydroperoxide, 2.8-products (ethylene diketones), there was decrease of 40% linoleic acid compared to the fresh oil, it contains 71.7% of polar glycerides and 43.3 % of polar esters, these results show a significant alteration condition of this oil

Despite significant oxidative degradation of the oil, it remains relatively tolerated by the animal. It causes a reduction of almost a quarter of the weight gain.

At the heart tissue, we note a significant decrease in glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) accompanied by a significant increase in MDA, showing the alteration of these enzymes by reactive oxygen species (ROS). Concerning the batch supplemented with 600 mg of alpha-tocopherol, we obtained a significant increase of two enzymes namely GPx and CAT and a decrease in the content of MDA, which shows the protective effect of the alpha-tocopherol vis-a-vis of ROS. By cons we noted for the batch supplemented with 1200 mg of alpha-tocopherol in a significant decrease of GPx and CAT monitoring the significant increase in MDA, in this case the alpha-tocopherol does not act as an antioxidant but had a tendency to act as a pro-oxidant. Finally, histological sections have been only confirm all of these results.

Keywords: oxidized oil, antioxidant enzymes, vitamin E, rat, heart, antioxidant, prooxidant.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique de quelques acides gras (Genot et Michalski, 2010).

Figure 2. Structure chimique des triglycérides et des phospholipides. Ainsi, dans l'étude de la biodisponibilité et des effets métaboliques de différents types d'acides gras, il convient également de tenir compte du rôle possible de leur molécule vectrice, PL ou TG.

Figure 3. Voies de ré-estérification des lipides au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Les abréviations utilisés : MGAT : monacyglycérol acyltransférase ; GPAT : glycérol 3-phosphate acyltransférase ; LPAAT : aide lysophosphatidique acyltransférase ; PAP : acide phosphatidique phosphatase (Stremmel et *al.*, 1985).

Figure 4. Absorption intestinale des lipides. Dans la lumière intestinale, les AGH (acides gras protonés) sont captés par l'entérocyte par diffusion passive ou par l'intermédiaire des transporteurs membranaires. Dans l'entérocyte, ils sont ré-estérifiés au niveau du RE en TG sous le contrôle de la MTP et l'Apo B-48 pour former des pré-chylomicrons. Ces derniers subissent la maturation dans l'appareil de Golgi pour donner des chylomicrons. Les chylomicrons sont ensuite transportés vers la lymphe (Petit et *al.*, 2007).

Figure 5. Rôles physiologiques des espèces réactives.

Figure 6. Cascade de production des principales espèces réactives oxydantes (Favier, 1997).

Figure 7. Oxydation d'un phospholipide membranaire conduisant soit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique soit à un réarrangement moléculaire. AG : acide gras ; MDA : malondialdéhyde. (Powers et Jackson, (2008) et Sachdev et Davies (2008)).

Figure 8. Elimination du H₂O₂ par les réactions enzymatiques combinées de la GPX et de la GRD.

Figure 9. Structure de la taurine.

Figure 11. Structure des tocotriénols

Figure 12. Evolution de l'indice de peroxyde pendant la dégradation oxydative d'une huile de tournesol.

Figure 12. Effets de la supplémentation de l' α -T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le poids corporel chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre témoin et groupe traités).

Figure 13. Effets de la supplémentation de l' α T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée au niveau du cœur (B) chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, p<0.001 entre témoin et groupe traités).

Figure 14. (A à B). Effets d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le taux en LPO et la teneur en α T dans le cœur de rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre témoin et OSO).

Figure 15. (A à E). Effets d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le système enzymatique antioxydant (SOD, CAT, GPx, GR et G6PDH) du cœur chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre témoin et OSO).

Figure 16. (A à B). Effets de la supplémentation de l' α T (600 mg·kg⁻¹) dans un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur la teneur en α T et du taux en LPO dans le cœur de rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre OSO et O).

Figure 17. (A à E). Effets de la supplémentation de l' α T (600 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le système enzymatique antioxydant (SOD, Cat, GPx, GR et G6PDH) du cœur chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre OSO et OSOE₆₀₀).

Figure 18. (A et B). Effets de la supplémentation de l' α T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur la teneur en α T et du taux en LPO dans le cœur de rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre OSOE₆₀₀ et OSOE₁₂₀₀).

Figure 19. (A à E). Effets de la supplémentation de l' α T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le système enzymatique antioxydant (SOD, Cat, GPx, GR et G6PDH) du cœur chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre OSOE₆₀₀ et OSOE₁₂₀₀).

Figure 20 (a et b). Micrographie du cœur de rat (10 \times , *H&E*) montrant: (a) architecture normal chez le lot "huile fraîche" : SO, (b) œdème myocardique chez le lot "huile oxydée" : OSO. N: noyau, M: muscle cardiaque, Nc: cellules nécrotiques, Oe: œdèmes.

Figure 21 c. Micrographie du cœur de rat (10 \times , *H&E*) du lot "huile oxydée E600" : OSOE₆₀₀, montrant l'absence d'œdème myocardique. N: noyau, Nc: cellules nécrotiques.

Figure 22 d. Micrographie du cœur de rat (10 \times , *H&E*) du lot "huile oxydée E1200" : OSOE₁₂₀₀, montrant la présence d'œdème myocardique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification et nomenclature des acides gras les plus courants.

Tableau II : Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI pour un adulte consommateur de 2000 Kcal (AFSSA, 2010).

Tableau III : Principales espèces réactives oxydantes organiques.

Tableau IV : Structure des principaux caroténoïdes (Le Moel et *al.*, 1998)

Tableau V : Les différentes formes de tocophérols.

Tableau VI: Constitution des régimes alimentaires.

Tableau VII: Caractéristiques chimiques de l'huile de tournesol fraîche et oxydée.

Tableau VIII : Composition en acides gras des huiles fraîche et oxydée exprimée en pourcentage d'acides gras totaux.

Tableau IX: teneurs en composés polaires et polymérisés de l'huile oxydée.

Abréviations

ADN acide désoxyribonucléique

AG acide gras

AG n-3 acide gras polyinsaturés oméga 3

AG n-6 acide gras polyinsaturés oméga 6

AGI acide gras insaturé

AGL acide gras libre

AGMI acide gras monoinsaturés

AGNE acide gras non estérifiés

AGPI acide gras polyinsaturés

AGPI n-3 acide gras polyinsaturés oméga 3

AGPI n-6 acide gras polyinsaturés oméga 6

AGS acide gras saturé

CAT catalase

Cu cuivre

ETA acide gras eicosatriénoïque

Gpx glutathion peroxydase

GR glutathion réductase ou globule rouge

GSH glutathion réduit

GSSG glutathion oxydé

H₂O₂ peroxyde d'hydrogène

HDL high density lipoprotein

HNE hydroxy-nonenal (4-HNE 4-hydroxy 2-(E)-nonenal)

HO₂• radical hydroperoxyde

HOCl acide hypochloreux

HPLC chromatographie liquide de haute performance

HSPs heat shock proteins

LA acide gras linoléique

LDH lactate déshydrogénase

LDL low-density lipoprotein

LO• radicaux alkoxydes d'AG

LOO• radical peroxyde d'AG

LOOH hydroperoxyde d'AG ou hydroperoxyde lipidique
LOX lipo-oxygénase
MDA malondialdéhyde mmole.l-1 milimole par litre
Mn manganèse
n-3 acide gras polyinsaturé oméga 3
NADH nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
N-HPETE acides 5-, 8-, 9-, 11-, 12-, ou 15 hydroperoxyeicosatétraénoïque
NO ou •NO monoxyde d'azote/ oxyde nitrique
NO2 ou •NO2 dioxyde d'azote
NOX NADPH oxydases
O2 oxygène
O3 ozone
OGG1 oxoguanine DNA glycosylase
ONE oxo-nonenal
ONOO- peroxydinitrite
ORAC oxygen radical absorbance capacity
•O2- radical (ion, anion) superoxyde
•OH radical hydroxyle
1O2 singulet oxygène
8-OHdG 8-hydroxydeoxyguanosine (ADN)
8OHG 8-hydroxyguanosine (ARN)
RL radicaux libres
RONS reactive oxygen and nitrogen species
ROO• radicaux peroxydes
ROS reactive oxygen species
RS• radical thiyl
Se sélénium
SOD superoxyde dismutase
TBARS thiobarbituric reactive substance

INTRODUCTION

Les lipides sont d'importants constituants de l'alimentation : apport énergétique et source d'acides gras essentiels mais également de vitamines liposolubles. Les AGE sont les précurseurs des eicosanoïdes. Avec leurs dérivés supérieurs polyinsaturés, ils sont incorporés dans les membranes dont ils influencent les propriétés physico-chimiques et biologiques telles que la stabilité, la perméabilité aux drogues ou les activités enzymatiques associées.

Le principal inconvénient des lipides insaturés est de s'oxyder facilement. Il s'agit d'une des causes majeures d'altération des denrées alimentaires. La réaction d'oxydation des lipides est initiée entre des lipides le plus souvent polyinsaturés et l'oxygène : la lipoperoxydation, qui est un processus permanent et ubiquitaire se développant simultanément sous forme d'un enchainement de réactions radicalaires. Indispensable à l'organisme, la lipoperoxydation enzymatique conduit à la formation d'eicosanoïdes très divers biologiquement très actifs et d'espèces radicalaires oxygénées (ERO) exerçant leur pouvoir bactéricide dans les foyers infectieux. A l'inverse, la lipoperoxydation spontanée s'avère toujours néfaste. Dans les conditions physiologiques normales, elle reflète la toxicité de l'oxygène. Elle est en effet fonction de l'activité métabolique et par la même de la consommation de gaz à partir duquel sont inexorablement produites des formes très réactives (états singulet, anion superoxyde, radical hydroxyl) fortement impliquées dans l'initiation de ce processus délétère qui, lors de défaillance et/ou de débordements des systèmes de défense, est un élément majeur de la désorganisation cellulaire. Pouvant être aussi induite par des espèces chimiques de type radicalaire ou des intermédiaires radicalaires issus du métabolisme de certains xénobiotiques.

Lorsque des ERO commencent à s'accumuler dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules de défense antioxydantes présentes dans la cellule comme le glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque, et des enzymes comme la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX), les peroxyrédoxines... (Morel et Barouki, 1999; Beckman et Ames, 1999; Delattre et *al.*, 2005).

Dans le cas du mécanisme de protection de la vitamine E (α T), celle-ci est oxydée sous une forme régénérable, la forme radicalaire chromane-6-oxyle α -TO*, par les espèces moléculaires oxydées préalablement formées, par exemple les radicaux acylperoxy. 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, qui, une fois oxydée par suite de la régénération de α -TO*, est elle-même régénérée par le glutathion réduit et/ou l'acide dihydrolipoïque comme intermédiaire d'oxydo-réduction, et la glucose-6-phosphate-deshydrogénase comme pourvoyeur terminal d'éléments réducteurs (NADPH) (Chan et *al.*, 1999; Stoyanovsky et *al.*, 1995).

La vitamine E protège *in vivo* les structures sensibles à l'oxydation : les lipides, essentiellement sous forme condensée (dans les membranes et les lipoprotéines) (Léger, 1992), les bases nucléotidiques des brins d'acide désoxyribonucléique (ADN) (Duthie et *al.*, 1996) et des protéines (Poulin et *al.*, 1996). Elle est utilisée dans différentes situations : pathologiques (thérapies curatives), environnementales (protection des structures de la peau). Son rôle dans la prévention du cancer (c'est-à-dire dans la carcinoprotection envisagée d'une façon générale) n'est pas établi, bien que son action bénéfique puisse être évoquée dans le cancer de la prostate (Gey, 1998). Son rôle préventif, le plus souvent comme adjuvant, dans des maladies neurodégénératives est sous investigation (il faudra suivre notamment les résultats des études sur la maladie d'Alzheimer). Le rôle antioxydant majeur particulièrement au niveau des Low density lipoprotein (LDL) de la vitamine E et le rôle crucial des LDL oxydées dans l'athérosclérose ont suggéré très tôt qu'il pouvait exister une corrélation négative entre le taux plasmatique de vitamine E et le risque de maladies cardiovasculaires (MCV) (Gey et *al.*, 1991).

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

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 plein croissance et sur l'histologie du tissu cardiaque, vue que les troubles cardiovasculaires et les maladies cardiovasculaires sont les maladies majeure associées au cœur, il est connu que les espèces d'oxygène réactives (ROS), produites pendant le stress oxydatif, sont responsables de la physiopathologie des troubles cardiovasculaires divers incluant l'athérosclérose, l'hypertrophie cardiaque, la cardiomyopathie, l'insuffisance cardiaque, l'ischémie/reperfusion et l'infarctus du myocarde; et c'est dans le domaine de la prévention cardio-vasculaire que la vitamine E suscite le plus d'intérêt.

Nous émettons l'hypothèse que l' α T pris à une dose de 600 mg/kg d'aliment est susceptible d'améliorer les paramètres oxydants et antioxydants, mais qu'il produit un effet prooxydant sur ces indicateurs à une dose de 1200 mg/kg d'aliment.

Pour mieux expliquer tous les travaux qui sont faits durant cette thèse, ce manuscrit s'articule autour de quatre parties :

- **Une première partie**, étude bibliographique, introduit (i) les lipides, puis (ii) le stress oxydatif, (iii) les pathologies liées au stress oxydatif (iv) les systèmes anti-oxydants (v) la vitamine E.
- **Une deuxième partie** décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental.
- **Une troisième partie** expose les résultats et les discussions. Elle comporte un premier chapitre portant sur (i) l'impact de la consommation d'huile thermooxydée incorporée au taux de 5% sur le stress oxydant chez les rats, (ii) son influence sur le système enzymatique antioxydant et (iii) et le tissu cardiaque. Un deuxième chapitre porte sur l'impact de la consommation d'une dose de 600 mg d' α T sur les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions. Enfin, un dernier chapitre montrant l'effet pro-oxydatif de la supplémentation de 1200 mg d' α T toujours sur les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions.
- **Une quatrième et dernière partie** donne une conclusion à l'ensemble de ces travaux et ouvrant sur plusieurs perspectives.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES LIPIDES

I. 1. Les lipides alimentaires et leur digestion

Les lipides font une partie intégrante de notre alimentation quotidienne. Selon les recommandations nutritionnelles récentes, les lipides alimentaires devraient représenter 35 à 40 % de l'apport énergétique total quotidien (AFSSA, 2010), soit environ 20 % en masse de l'ensemble des macronutriments (protéines + glucides + lipides). Les quantités recommandées ont pour but d'apporter suffisamment de lipides pour que ceux-ci puissent exercer leurs effets bénéfiques sur le fonctionnement de l'organisme et dans le même temps de limiter leur apport au raisonnable car comme pour tout nutriment, l'excès de lipides serait néfaste pour la santé.

Le terme «lipides» regroupe les acides gras, leurs dérivés et les substances qui leur sont apparentées d'un point de vue de leur biosynthèse ou de leur fonctionnalité. Ce sont les constituants essentiels des membranes biologiques de toute cellule vivante. Consommer des lipides permet d'apporter de l'énergie, des vitamines liposolubles et des acides gras essentiels. Plus de 90% des lipides que nous ingérons quotidiennement sont sous forme de triacylglycérols (TG).

I. 1. 1. Structures moléculaires

I. 1. 1. 1. Structure moléculaire des acides gras

Les acides gras (AG) sont formés d'une chaîne hydrocarbonée avec un groupement méthyle (CH₃) à une extrémité et un groupement acide (COOH) à l'autre. Ils sont classés selon:

- La longueur de la chaîne carbonée qui possède dans la majorité des cas un nombre pair de carbone (C). Les AG de 16 à 22 C sont les plus représentés parmi les lipides alimentaires.
- Le nombre de doubles liaisons allant de 0 à 6 doubles liaisons : les AG saturés ne possèdent aucune double liaison. Les AG mono-insaturés possèdent une seule double liaison et les AG polyinsaturés présentent plusieurs doubles liaisons séparées par une unité méthylène. Chaque double liaison est représentée par le symbole (n) suivi d'un

chiffre indiquant sa position par rapport à l'extrémité du groupement méthyl de la chaîne (Tableau I).

Tableau I : Classification et nomenclature des acides gras les plus courants

Catégorie	Formule	Nom commun
Saturés	16 : 0	Acide palmitique
	18 : 0	Acide stéarique
	20 : 0	Acide arachidique
Mono-insaturés	16 :1 n-7	Acide 9-cis-hexadécénoïque
	16 :1 n-9	Acide palmitoléique
	18 :1 n-7	Acide 11-cis-octadécénoïque
	18 :1 n-9	Acide oléique
Polyinsaturés	18 :2 n-6	Acide linoléique
	18 :3 n-3	Acide α -linoléique
	20 :4 n-6	Acide arachidonique (AA)
	20 :5 n-3	Acide eicosapentaénoïque (EPA)
	22 :6 n-3	Acide docosahexaénoïque (EHA)

- Le positionnement des atomes d'hydrogène autour des doubles liaisons : il existe la forme naturelle majeur «cis» où les deux atomes d'hydrogène adjacents sont du même côté, et la forme «trans» où les atomes d'hydrogène sont du côté opposé de la double liaison. Cette dernière forme peut être produite par hydrogénation catalytique et présente une rigidité plus élevée du fait que la chaîne d'AG soit rectiligne.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) les plus importants sont l'acide linoléique et l'acide α - linoléique (Figure 1). Ces deux AG sont considérées comme AG essentiels. En effet, l'homme est incapable de les synthétiser du fait de l'absence des $\Delta 12$ désaturase et $\Delta 15$ désaturase dans sa machinerie enzymatique. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation.

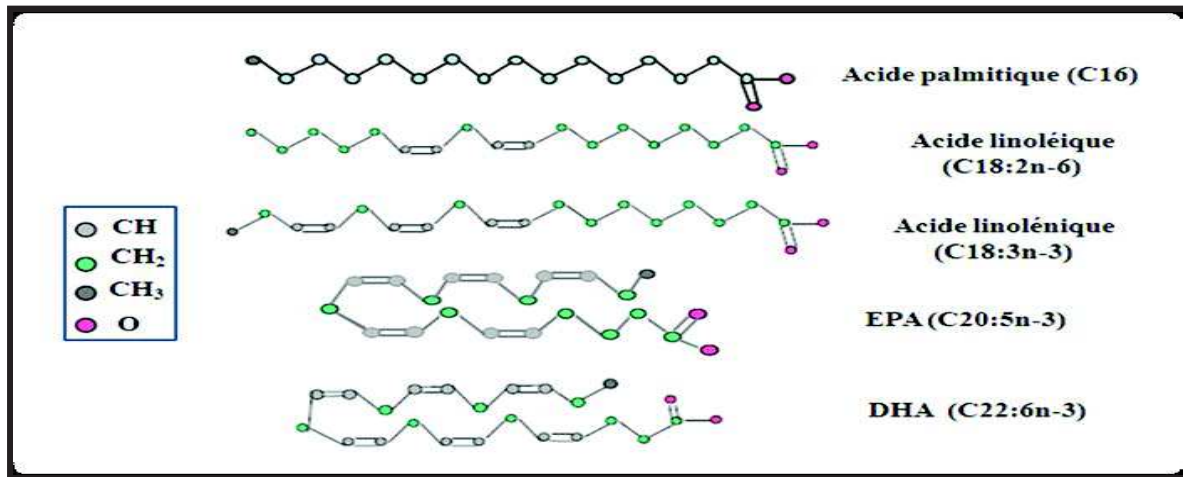
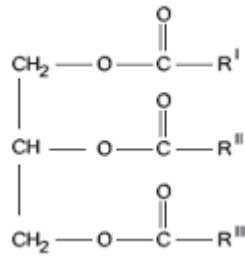


Figure 1. Structure chimique de quelques acides gras (Genot et Michalski, 2010).

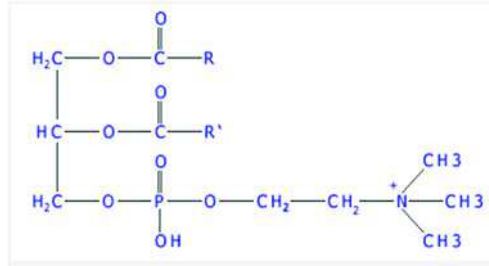
1. 1. 1. 2. Structure des molécules vectrices des acides gras

Les acides gras non estérifiés ou libres ne sont présents qu'en faible proportion dans les lipides alimentaires (5 à 7%). La grande majorité des AG alimentaires sont sous forme estérifiée dans les triglycérides qui sont des lipides neutres (TG ; huiles et graisses alimentaires) ou dans les phospholipides qui sont des lipides polaires (PL).

Les triglycérides constituent la majeure partie des lipides alimentaires (~97%) ainsi que des lipides stockés dans le tissu adipeux. Ils sont composés de trois molécules d'acides gras estérifiés à une molécule de glycérol. Une autre classe de lipides importante pour ses fonctionnalités technologiques et nutritionnelles est celle des phospholipides (glycérophospholipides, couramment appelés lécithines en technologie) dans lesquels la fonction alcool du glycérol en position *n-3* est estérifiée par un groupement phosphoryle lui-même substitué par un groupement polaire, chargé (phosphatidyl sérine, phosphatidyl inositol,...) ou non (phosphatidyl choline, phosphatidyl éthanolamine). Sur les deux autres fonctions alcool sont fixés soit une, on a alors un lyso-phospholipide, soit deux chaînes grasses. La chaîne en position *sn-1* peut être fixée par une liaison ester, éther ou vinyl-éther, ce qui est le cas des plasmalogènes présents dans les produits carnés. Dans les phospholipides naturels, généralement au moins une chaîne grasse est insaturée, le plus souvent en position *sn-2* (Figure 2).



Triglycérides



Phospholipides

Figure 2. Structure chimique des triglycérides et des phospholipides.

Ainsi, dans l'étude de la biodisponibilité et des effets métaboliques de différents types d'acides gras, il convient également de tenir compte du rôle possible de leur molécule vectrice, PL ou TG.

I. 1..2. Digestion des lipides

La digestion est définie par une série de réactions d'hydrolyse qui vont permettre de dégrader les lipides d'origine alimentaire en molécules lipidiques absorbables au niveau de la barrière intestinale. Ces lipides, pour qu'ils puissent traverser la paroi intestinale et entrer dans la cellule épithéliale doivent subir une hydrolyse gastrique puis duodénale. Etant donné que l'essentiel des apports lipidiques alimentaires est constitué des triglycérides.

La digestion des lipides est amorcée dans l'estomac où la lipase gastrique, enzyme sécrétée par les cellules principales de l'estomac chez l'Homme, hydrolyse préférentiellement les liaisons esters en position en *sn*-3 d'une proportion non négligeable de TG, pour libérer des AGL et des diacylglycérols (DG) (Moreau et *al.*, 1988). Cette enzyme agit à pH acide qui varie entre 4 et 6. Elle intervient dans l'hydrolyse de 5 à 37 % des triglycérides alimentaires (Carriere et *al.*, 1993).

Les AGL contenus dans l'estomac induisent la libération de l'hormone cholécystokinine de la paroi intestinale, déclenchant ainsi des contractions dans la vésicule biliaire. Les acides biliaires et les enzymes pancréatiques, notamment la lipase pancréatique sont alors excrétés dans la partie proximale de l'intestin grêle (Hildebrand et *al.*, 1990). Les TG résiduels et les DG issus de l'hydrolyse gastrique sont alors hydrolysés en position *sn*-1 et *sn*-3 en AG et 2- monoacylglycérols (2-MG) dans l'intestin grêle proximal par le complexe lipase-colipase pancréatique (Armand et *al.*, 1994). La lipase pancréatique fonctionne à des

pH compris entre 6.5 et 9 et nécessite l'intervention d'une colipase qui permet l'adsorption de la lipase pancréatique à l'interface lipides-eau. Elle est inhibée par la présence des sels biliaires (seulement en absence de colipase) et par les phospholipides. L'hydrolyse duodénale contribue ainsi à la digestion des triglycérides alimentaires à hauteur de 40 à 73 % (Carriere et *al.*, 1993). Après l'hydrolyse des lipides, les produits de dégradation sont ensuite associés aux sels biliaires, aux PL et aux stérols pour former des micelles mixtes. Les micelles ainsi formées gagnent la bordure en brosse des cellules intestinales puis sont absorbées dans l'entérocyte (Armand et *al.*, 1994).

I. 1. 3. Absorption intestinale des lipides

Les produits d'hydrolyse des lipides (AG, monoacylglycérols, lysophospholipides...) inclus dans les micelles vont entrer dans le pôle apical des entérocytes afin de passer dans la lumière intestinale à la circulation lymphatique puis sanguine. L'absorption des lipides est un phénomène complexe en raison de leur hydrosolubilité très limitée et de la taille importante de ces molécules.

L'absorption intestinale des lipides est classiquement décomposée en trois étapes successives : (i) captage entérocytaire des lipides, (ii) métabolisme des lipides intra-entérocytaires et (iii) assemblage et sécrétion des chylomicrons.

I. 1. 3.1. Captage entérocytaire des lipides

Pour que les lipides contenus dans les micelles soient absorbés par la cellule intestinale, ils doivent être d'abord séparés des sels biliaires. Les entérocytes ont la particularité de posséder à la surface de leur bordure en brosse un microenvironnement particulier. Il s'agit d'une couche d'eau «non agitée», zone aqueuse ayant une vitesse de renouvellement plus lente par rapport aux autres compartiments intestinaux due à la présence de glycoprotéines hydrophiles. Ce microenvironnement dont l'épaisseur se situe entre 50 et 500 μm présente un pH acide (pH 5.3- 6). Cette acidité est générée par des pompes à protons qui génèrent dans cette zone un gradient de pH, celui-ci permet la protonation des AG dans les micelles conduisant ainsi à la dissociation des micelles et à la libération des AG protonés à travers la membrane microvillositaire. Ces derniers sont capturés dans l'entérocyte. Cependant le mécanisme d'entrée des AG et des monoacylglycérols dans les entérocytes est encore sujet à débat. En effet, il semble que leur passage à travers la membrane

microvillositaire soit complétement par deux mécanismes de transport : la diffusion simple résultante du gradient de concentration créé par l'abondance de lipides dans la lumière intestinale et leur faible concentration dans le milieu cytosolique (Trotter et *al.*, 1996) et le transport facilité qui implique des transporteurs membranaires pour transporter les AG à longue chaîne (Chaves et *al.*, 2003). Il existe trois protéines intestinales présentes à la membrane apicale entérocytaire et qui possèdent une haute affinité pour les lipides. Elles sont regroupées sous le terme générique de «lipid binding proteins ».

1.1.3.2. Métabolisme intra-entérocytaire des lipides

Une fois dans l'entérocyte, les lipides sont transférés à des protéines cytosoliques de liaison des AG, soit les isoformes I-fatty acid binding protein (FABP) (intestinale) (Westergaard and Dietschy, 1976) et L-FABP (hépatique) (Stremmel et *al.*, 1985) qui ont été identifiées simultanément et en abondance dans l'intestin grêle. Les 2 FABP permettent de transférer les AG de la membrane plasmique jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) (Agellon et *al.*, 2002). Les AG sont ensuite métabolisés en acyl coenzyme A (CoA) par les «long chain acyl-CoA synthetases» (ACS) puis en triglycérides ou en phospholipides sous l'action de l'enzyme diacylglycérol-acyltransférase (DGAT). La synthèse des TG peut s'effectuer selon 2 voies: celle des 2-monoacylglycérols ou celle de l' α -glycérophosphate (Figure 3). Durant les périodes post-prandiales, la voie des 2-monoacylglycérols qui est spécifique de l'intestin est la plus active alors que pendant les périodes de jeûne ou inter-prandiales, la 2^{ème} voie qui se déroule également dans le foie, est majoritaire.

La voie des 2-monoacylglycérols permet l'acylation des monoacylglycérols en position *sn*-2 par l'action de l'enzyme monoacylglycérol acyltransférase (MGAT). Le monoacylglycérol en position *sn*-2 est alors acylé en diglycéride qui subit à son tour une acylation en TG par l'action de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT). La voie de l' α -glycérophosphate quant à elle, recrute l'enzyme glycérophosphate acyltransférase (GPAT) pour former l'acide phosphatidique à partir de d'acyl-CoA. Sous l'action de l'enzyme phosphatidate phosphohydrolase, l'acide phosphorique est hydrolysé en 1,2-diacylglycérol qui est ensuite estérifié soit par la DGAT en TG soit par la phosphocholine diacylglycérol-acyltransférase en phospholipides.

Le cholestérol libre est estérifié par l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) en esters de cholestérol.

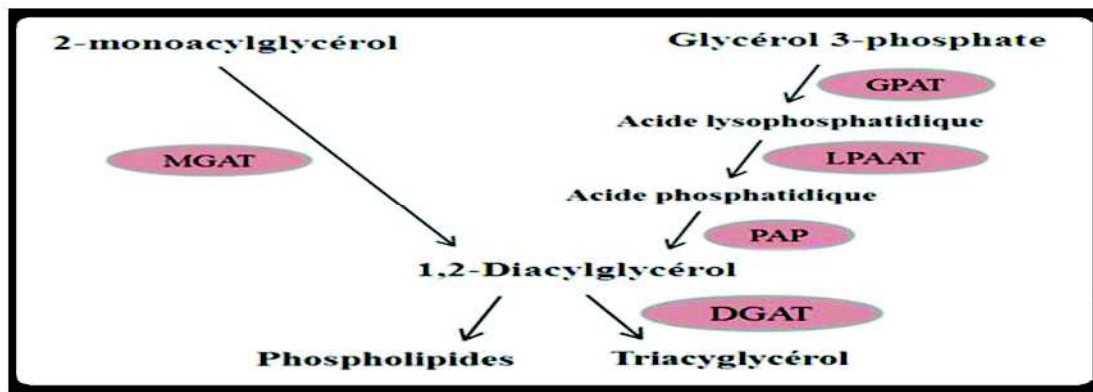


Figure 3. Voies de ré-estérification des lipides au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Les abréviations utilisés : MGAT : monacyglycérol acyltransférase ; GPAT : glycérol 3-phosphate acyltransférase ; LPAAT : aide lysophosphatidique acyltransférase ; PAP : acide phosphatidique phosphatase (Stremmel et *al.*, 1985).

Les TG néosynthétisés pénètrent ensuite dans le RE grâce au transporteur (microsomal triglyceride transfert protein) où ils s'associent à l'apolipoprotéine A et à l'apolipoprotéine B-48 (Apo B-48) pour former des préchylomicrons.

L'Apo B-48 est la forme tronquée de l'Apo B-100. Les deux protéines sont codées par le même gène «APOB». L'Apo B-48 est exprimée au niveau de l'intestin, elle intervient dans la formation des chylomicrons postprandiaux. L'Apo B-100 est plus exprimée dans le foie où elle est nécessaire à la production des VLDL dans le foie.

1. 1. 3. 3. Assemblage et sécrétion des chylomicrons

Afin que les lipides puissent être libérés dans la circulation, ils doivent être incorporés dans les lipoprotéines qui sont les particules de transport dans le milieu aqueux. L'intestin a la capacité d'assembler et de sécréter différentes sortes de lipoprotéines mais plus particulièrement des chylomicrons qui sont les principaux véhicules des lipides alimentaires. La formation des chylomicrons débute au niveau du RE avec l'assemblage des préchylomicrons pendant la période postprandiale. Elle se fait sous le contrôle de l'Apo B-48 et de la protéine : microsomal triglycéride transfert protein (MTP). La MTP joue un rôle primordial dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL). En effet, elle permet la «lipidation» de l'apo B-48 afin de la protéger contre la dégradation de protéasome durant son transport vers le RE (Hussain et *al.*, 1996). De plus, une étude récente réalisée chez des souris dont le gène MTP a été invalidé, a montré une accumulation des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des entérocytes avec une

diminution de sécrétion des chylomicrons associée à une diminution de 80% de sécrétion de l'Apo B-48 par l'entérocyte (Xie et *al.*, 2006).

La synthèse des chylomicrons contenant de l'Apo B-48 se déroule en 2 étapes : la première étape correspond à la synthèse de lipoprotéines primitives et la seconde étape correspond au développement du noyau et à la synthèse des lipoprotéines.

Au cours de la 1^{ère} étape, la MTP prend en charge les lipides comme les TG, les PL et les esters de cholestérol pour les transférer de la membrane du RE à l'Apo B-48, assemblant ainsi les lipoprotéines primitives.

Durant la 2^{ème} étape, des gouttelettes lipidiques riches en triglycérides et en ester de cholestérol se forment dans la lumière du RE indépendamment de la présence d'Apo B-48. Ces gouttelettes lipidiques fusionnent avec les lipoprotéines primitives aboutissant à la formation des préchylomicrons de petites ou de grandes tailles selon l'apport alimentaire lipidique qui vont gagner l'appareil de Golgi.

Une fois dans l'appareil de Golgi, les pré-chylomicrons sont maturés et transformés en chylomicrons. Ces derniers sont ensuite libérés au niveau de la partie basale de la cellule épithéliale et gagnent le chylifère central de la villosité intestinale. De là, ils sont transportés par la lymphe jusqu'au canal thoracique et aboutissent dans la circulation générale (Figure 4).

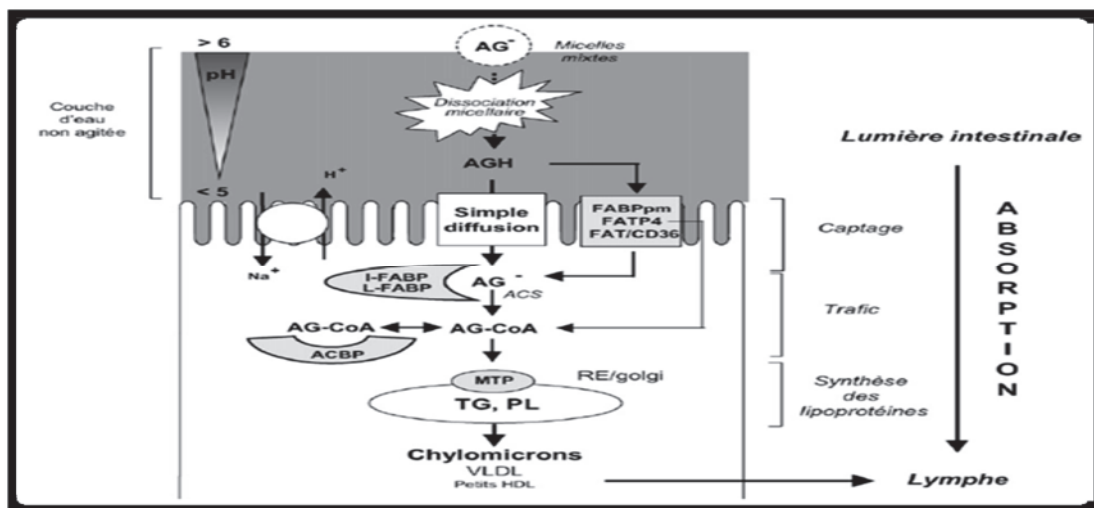


Figure 4. Absorption intestinale des lipides. Dans la lumière intestinale, les AGH (acides gras protonés) sont captés par l'entérocyte par diffusion passive ou par l'intermédiaire des transporteurs membranaires. Dans l'entérocyte, ils sont ré-estérifiés au niveau du RE en TG sous le contrôle de la MTP et l'Apo B-48 pour former des pré-chylomicrons. Ces derniers subissent la maturation dans l'appareil de Golgi pour donner des chylomicrons. Les chylomicrons sont ensuite transportés vers la lymphe (adapté de (Petit et *al.*, 2007).

Les TG des chylomicrons subissent ensuite une hydrolyse par la «lipoprotéine lipase» ou LPL. Il est important de noter que la clairance des chylomicrons dépend de leur taille et de leur nombre.

En effet, les chylomicrons de grande taille sont plus hydrolysés que ceux de petites tailles en raison de leur grande affinité avec la LPL (Xiang et *al.*, 1999). Les AG libérés lors de la lipolyse sont utilisés comme source d'énergie par les tissus périphériques ou sont mis en réserve.

I. 2. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne : essentiels mais sensibles à l'oxydation

Les lipides sont des éléments essentiels de notre alimentation. Ils contribuent, après absorption intestinale au bon fonctionnement de l'organisme et à son développement. En effet, les acides gras présents dans les chylomicrons atteignent différents tissus et organes pour exercer des rôles cruciaux dans l'édification et le développement de ces tissus. Toutefois, les AGPI alimentaires plus particulièrement les AGPI *n*-3 et *n*-6 interviennent dans divers mécanismes physiologiques importants au sein de l'organisme, non seulement comme substrats énergétiques et composants essentiels des membranes biologiques, mais également comme molécules impliquées dans la régulation des gènes et la signalisation cellulaire. Ces AGPI sont ainsi reconnus pour lutter contre diverses pathologies.

I. 2. 1. Sources et métabolisme des AGPI

Les AGPI sont classés en deux catégories:

- La série *n*-6 dérive de l'acide gras essentiel, l'acide linoléique (LA, 18:2, *n*-6) qui se trouve dans les huiles végétales, les graines et les noix.
- La série *n*-3 dérive de l'acide alpha-linolénique (ALA 18:3, *n*-3) apporté par les huiles végétales notamment l'huile de lin (51% en poids), l'huile de soja (7% en poids), l'huile de colza (9% en poids) et l'huile de noix (6% en poids).

Ces deux acides gras subissent différentes étapes métaboliques pour former respectivement, l'acide arachidonique (AA, 20:4, *n*-6) et les acides eicosapentaénoïque (EPA,

20:5, *n*-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6, *n*-3). Leur synthèse se déroule principalement dans le foie, mais peut aussi avoir lieu dans les micro-vaisseaux de la barrière hémato-céphalique, les astrocytes et les cellules endothéliales microvasculaires (Moore et *al.*, 1990) mettant en jeu les voies de régulation de l'expression des gènes du métabolisme lipidique.

La conversion est basée sur une succession de réactions d'élongation catalysées par des élongases, ajoutant 2 carbones, et des réactions de désaturation catalysées par des désaturases, éliminant 2 atomes d'hydrogènes entre 2 carbones adjacents. Il est important de noter que les mammifères ne possèdent pas les enzymes nécessaires à l'addition d'une double liaison après le carbone C₉ et sont donc incapables de synthétiser l'acide linoléique et l'acide linoléique, raison pour laquelle ces derniers sont indispensables.

L'acide α -linoléique est un acide gras (AG) d'origine végétale qui peut être converti après avoir été consommé par l'alimentation en EPA. Il a été démontré que chez l'Homme, l'acide α -linoléique est extrêmement catabolisable et très faiblement converti en DHA (Burdge and Calder, 2005). L'EPA et le DHA sont abondants dans les produits animaux d'origine marine et principalement dans les poissons gras des eaux froides comme le saumon, le thon, le maquereau.

Récemment, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a réactualisé les apports nutritionnels conseillés (ANC) en lipides qu'elle avait été établis en 2001 pour mieux prévenir certaines pathologies telles que le syndrome métabolique, le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Ainsi, pour prévenir ces pathologies, la part recommandée des lipides dans l'apport énergétique total chez l'adulte est de 35 à 40 %. L'ANSES apporte également de nouvelles recommandations pour la part des AGPI indispensables ou non (AFSSA, 2010) (Tableau II).

Tableau II : Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI pour un adulte consommateur de 2000 Kcal (AFSSA, 2010).

Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI		
AG Essentiels	Acide linoléique	4% de l'AE soit 8,8 g/j
	Acide α -linoléique	1% de l'AE soit 2,25 g/j
	Acide docosahexaénoïque	0,113% de l'AE soit 250mg/j
Dérivés d'AG Essentiels	Acide eicosapentaénoïque	0,113% de l'AE soit 250mg/j

CHAPITRE II: LE STRESS OXYDATIF

II. 1. Présentation des notions d'espèces réactives oxydantes et de radicaux libres:

Un radical libre (RL) est une entité chimique (atome, molécule, fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Finaud et *al.*, 2006b, Mac Laren, 2007). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (Exemple : $\cdot\text{OH}$) (Sayre et *al.*, 2005, Mac Laren, 2007, Goto et *al.*, 2008).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

1. Addition d'un électron libre à un non radical ($\text{NR} + e \rightarrow \text{R}\cdot$)
2. Perte d'un électron par un non radical ($\text{NR} - e \rightarrow \text{R}\cdot$)
3. Scission homolytique d'une liaison covalente ($\text{A} : \text{B} \rightarrow \text{A}\cdot + \text{B}\cdot$)

La réactivité des RL dépendra des éléments en présence : si un radical rencontre un autre radical, le produit sera un non radical ($\text{A}\cdot + \text{B}\cdot \rightarrow \text{AB}$). Si un radical rencontre un non radical, un nouveau radical sera formé ($\text{A}\cdot + \text{B} \rightarrow \text{A} + \text{B}\cdot$) et donnera l'origine à une chaîne qui continuera jusqu'à ce que le radical rencontre un autre radical ou un antioxydant (Wolinsky et Thompson, 1998, Clarkson et *al.*, 2000, Finaud et *al.*, 2006b, Mac Laren, 2007).

Les espèces oxygénées actives (EOA ou ROS Reactive Oxygen Species) également désignées dans la littérature de dérivés réactifs de l'oxygène ou d'espèces réactives de l'oxygène peuvent être définies comme des molécules qui contiennent de l'oxygène et sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air. Les EOA incluent les RL et des composés réactifs oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans leur couche externe) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux, le singulet d'oxygène, et l'ozone (O_3). Plus récemment les espèces azotées actives (EAA ou RNS Reactive Nitrogen Species) ont été définies comme un sous groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO). Ceci a poussé certains auteurs à parler de RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) au lieu de ROS pour désigner l'ensemble des espèces réactives oxydantes

radicalaires ou non radicalaires (Mac Laren, 2007), que nous désignons par l'abréviation ERO (Tableau III). Les principales espèces réactives oxydantes sont dérivées de l'oxygène et de l'azote, et peuvent être produites par le métabolisme cellulaire normal tout comme pathologique ou par exposition environnementale (ex: tabagisme, ozone, alimentation, température corporelle...) (Altan et *al.*, 2003, Vergani et *al.*, 2004, Mac Laren, 2007, Kirschvink et *al.*, 2008, Bloomer et Fisher-Wellman, 2008).

Tableau III : Principales espèces réactives oxydantes organiques

ERO	Abréviation	Représentation selon Lewis
<u>Espèces oxygénées actives</u>		
Radical (ion, anion) superoxyde	$\cdot\text{O}_2^-$	$^-\cdot\text{O}\cdot\text{O}\cdot$
Radical hydroperoxyde	$\text{HO}_2\cdot$	$\text{H}\cdot\cdot\text{O}\cdot\text{O}\cdot$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	$\text{H}\cdot\cdot\text{O}\cdot\text{O}\cdot\cdot\text{H}$
Radical hydroxyle	$\cdot\text{OH}$	$\cdot\text{O}\cdot\text{H}$
Singulet oxygène	$^1\text{O}_2$	$\text{O}\cdot\cdot\text{O}$
Ozone	O_3	$\text{O}=\text{O}+\cdot\text{O}^-$
<u>Espèces azotées actives</u>		
Monoxyde d'Azote	$\cdot\text{NO}$	$\cdot\text{N}\cdot\text{O}\cdot$
Dioxyde d'azote	$\cdot\text{NO}_2$	$\cdot\text{N}\cdot\text{O}\cdot\cdot\text{O}\cdot$
Peroxynitrite	ONOO^-	$\cdot\text{O}\cdot\text{N}\cdot\cdot\text{O}\cdot\cdot\text{O}\cdot^-$
<u>Espèces soufrées actives</u>		
Radical thiyl	$\text{RS}\cdot$	$\text{R}\cdot\cdot\text{S}\cdot$

II. 2. Définition du stress oxydant:

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Sayre et *al.*, 2005, Bloomer et *al.*, 2008, Browne et Fisher-Wellman, 2008, Power et *al.*, 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink et *al.*, 2008). L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren, 2007).

II. 2. 1. Conséquences du stress oxydant

II. 2. 1. 1. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situation physiologique, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (Human, 2002).

L'anion superoxyde O_2^- , produit dans la chaîne respiratoire des mitochondries ou durant la phagocytose, est nécessaire à la performance de la réponse immunitaire ; par exemple, un déficit de sa production peut déterminer la survenue de la granulomatose septique chronique caractérisée par l'incapacité de l'organisme à lutter contre l'agression d'agents microbiens pyogènes (Beaman et Beaman , 1984, Lehucher-Michel et *al*, 2001). L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important en établissant le tonus vasculaire et en modulant la réponse inflammatoire (figure 5).

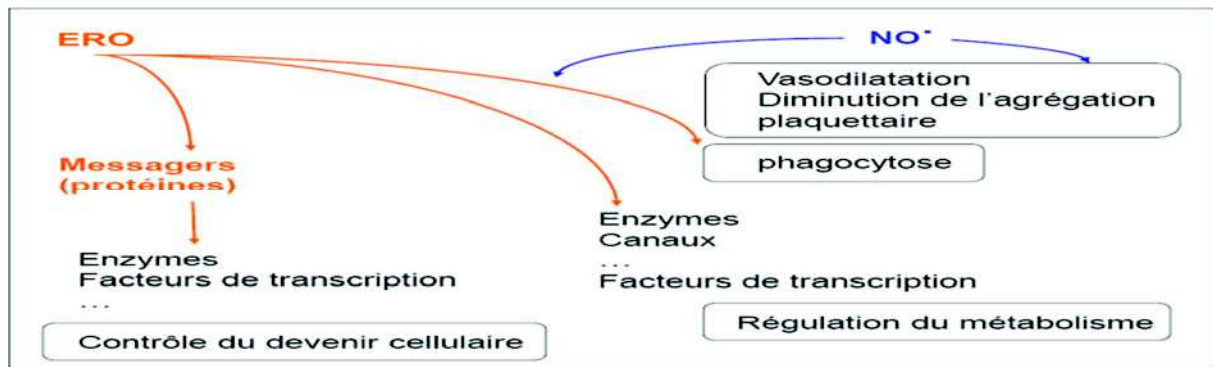


Figure 5. Rôles physiologiques des espèces réactives.

II. 2. 1. 2. Le déséquilibre : origines et conséquences

Le déséquilibre profond dans la balance entre les prooxydants, producteurs d'espèces radicalaires, et les antioxydants, au profit des premiers peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale des phénomènes d'ischémie reperfusion (xanthine oxydase), d'une activation de systèmes enzymatiques (NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine, transferrine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine,

cathécholamine). L'origine de ce déséquilibre peut également être de nature exogène : une alimentation pauvre en antioxydants, une exposition aux rayons ultraviolets, à l'action de substances oxydantes (solvants, pesticides, anesthésiques, tabac) ou lors d'un accroissement brutal de l'apport en oxygène (Michelson, 1982). Les ERO très électrophiles tentent de réappairier leur électron célibataire en agressant toutes les molécules susceptibles de céder un électron ; leur durée de vie est donc très courte. L'espèce agressée devient à son tour radicalaire, initiant de cette façon un processus de réactions en chaîne (Lehurch-Michel et *al.*, 2001).

L'acide désoxyribonucléique (ADN), les lipides membranaires polyinsaturés ou encore les protéines sont les cibles privilégiées de ces oxydations. Le déséquilibre prooxydant entraîne la formation de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées et de multiples dysfonctionnements cellulaires : processus pro-inflammatoires, d'apoptose et/ou de nécrose (Beaudeau et *al.*, 2006).

II. 3. Les principales Espèces Réactives Oxydantes dans la cellule : formation et caractéristiques

Toutes ces espèces réactives partagent la même propriété : elles sont relativement instables et ont de fait une durée de vie généralement très courte : leur demi-vie est de 10^{-9} à 10^{-6} sec pour les plus instables (Tessier et Marconnet, 1995), jusqu'à quelques dizaines de secondes pour $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . Leur courte durée de vie ne devrait pas permettre aux espèces réactives oxydantes (EOR) d'avoir une action majeure sur la cellule. Or cela est contrecarré par leur forte réactivité et leur capacité à produire des réactions en chaîne. En effet chaque espèce pourra générer à son tour une nouvelle espèce (Figure 6).

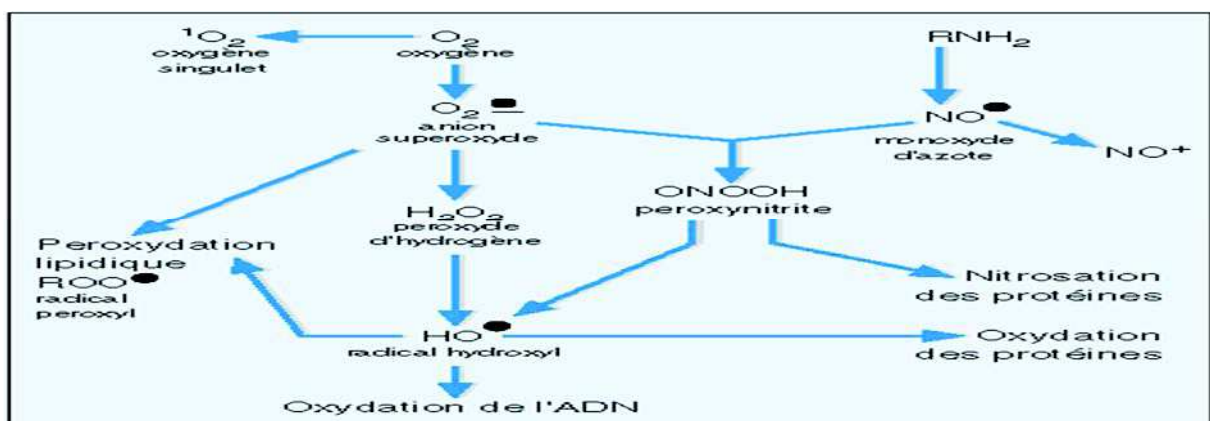


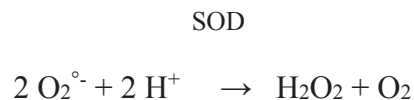
Figure 6. Cascade de production des principales espèces réactives oxydantes (Favier, 1997).

Nous allons présenter dans ce paragraphe les principales EOR que nous pouvons retrouver dans la cellule, en distinguant les espèces radicalaires des espèces non radicalaires.

II. 3. 1. Espèces réactives oxydantes radicalaires

a) L'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$

C'est l'une des premières EOR à être formées, par réduction d'une molécule d' O_2 . Sa demi-vie longue comparée aux autres EOR est contrebalancée par le fait que les membranes biologiques lui sont relativement imperméables; il reste ainsi moyennement dangereux. Il peut conduire à la formation du H_2O_2 par la réaction suivante (Mandelker, 2008):



Cette réaction peut être bénéfique comme délétère pour l'organisme :

- bénéfique car on passe d'une espèce très oxydante -le radical superoxyde- à une espèce moins oxydante -le H_2O_2 ; c'est d'ailleurs l'étape catalysée par une enzyme antioxydante la Superoxyde Dismutase (SOD)
- délétère car le H_2O_2 peut être à l'origine d'autres EOR, par la réaction de Fenton.

b) Le radical hydroxyl : HO°

Il est certainement l'EOR la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Malgré une durée de vie très brève et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il possède une très grande réactivité liée à un potentiel oxydant très élevé (Powers et Jackson, 2008), il est à l'origine de la formation des radicaux peroxy.

c) L'oxyde nitrique : NO°

L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est synthétisé par une enzyme, l'oxyde nitrique synthase NOS à partir d' O_2 et d'un acide aminé, la L-arginine. Mandelker (2008) mentionne qu'il n'est vraiment délétère pour la cellule que lorsqu'il est présent en quantité importante et qu'il génère ainsi une autre EOR : le peroxy nitrite ($NO_2^{\circ-}$)

d) Les radicaux peroxy : ROO°

Ils font plutôt partie de la « deuxième vague » d'EOR, dans la mesure où leur formation fait suite à une réaction d'oxydation d'AGPI par d'autres EOR formées préalablement.

La partie « R » correspond à un AGPI. Leur formation comprend 2 étapes principales : la première (réaction ①) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical hydroxyl, et la seconde (réaction ②) à la liaison avec une molécule d'oxygène (Powers et Jackson, 2008; McMichael, 2007) :



Le radical peroxy est très instable. Pour gagner en stabilité, il peut :

- récupérer un atome d'hydrogène, notamment en « l'arrachant » à un AGPI voisin. Cela conduira au redémarrage d'une nouvelle réaction similaire jusqu'au dernier AGPI accessible, autrement dit à une réaction en chaîne (Figure 7):

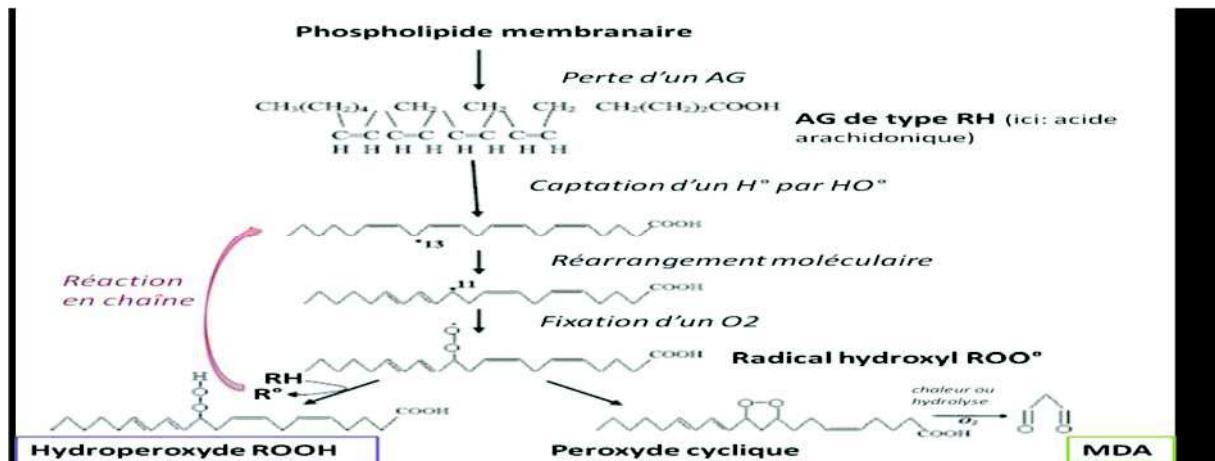


Figure 7. Oxydation d'un phospholipide membranaire conduisant soit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique soit à un réarrangement moléculaire. AG : acide gras ; MDA : malondialdéhyde. (Powers et Jackson, (2008) et Sachdev et Davies (2008)).

- subir un réarrangement moléculaire à savoir l'apparition d'un cycle avec les 2 atomes d'oxygène ; le peroxyde cyclique ainsi formé pourra donner naissance, par hydrolyse ou chaleur, au malondialdéhyde (MDA) (Powers et Jackson, 2008). Powers et Jackson (2008) soulignent que la molécule de départ, ici notée RH, pourrait aussi bien être un acide gras monoinsaturé (AGMI), voire même un acide gras saturé (AGS). Toutefois la double liaison est plus sensible à une oxydation, ce qui fait que ce sont les AGPI les cibles majoritaires.

II. 3. 2. Espèces réactives d'oxygènes non radicalaires

a) L'oxygène singulet: $1O_2$

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O_2 : il possède la même structure électronique que l'oxygène mais 'agencée' différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état 'excité' lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 2007).

b) Le peroxyde d'hydrogène: H_2O_2

Il est relativement stable, possède une demi-vie longue, et les membranes biologiques lui sont perméables. Il est peu dangereux en soi pour la cellule, mais il constitue la source du radical hydroxyl HO° par la réaction de Fenton :



Certains auteurs préfèrent alors considérer la réaction de l'anion superoxyde avec le H_2O_2 , catalysée par un ion métallique tel que le fer ; cette réaction est appelée réaction d'Haber-Weiss :



L'importance *in vivo* de cette réaction est encore largement débattue, dans la mesure où l'ion ferreux Fe^{2+} existe rarement à l'état libre, et souvent maintenu par le potentiel rédox de la cellule en ion ferrique Fe^{3+} (Halliwell et Gutteridge, 1990)

c) Le peroxynitrite: NO_3^-

Son apparition est extrêmement rapide, et se produit par une réaction entre deux EOR produites très vite au cours du processus de stress oxydant :



A l'instar du radical hydroxyl, NO_3^- est une EOR qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires.

d) L'acide hypochloreux: HClO

Il est formé à partir du H₂O₂. Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant.



II. 3. 3. Le cas des métaux de transition

Les métaux de transition ne sont pas des EOR à proprement parler. Mais ils possèdent de nombreux électrons non appariés qui, après fixation sur divers ligands (formation de complexes métalliques), peuvent être transférés vers l'oxygène ou ses EOR. Ils participent ainsi à la formation de davantage d'EOR (Grandjean, 2001). C'est le cas du fer avec la réaction de Fenton.

D'autres métaux de transition comme le cuivre ou le manganèse sont aussi cités (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Pour autant il ne s'agit pas de considérer les métaux de transition comme uniquement prooxydant : en effet la plupart d'entre eux sont des cofacteurs enzymatiques importants.

II. 4. Les Dégâts oxydatifs cellulaires

II. 4. 1. Peroxydation lipidique

Les lipides ont de nombreux rôles : molécules énergétiques, réserves d'énergie, molécules signal et font partie intégrante des membranes cellulaires. Parmi les membranaires, les phospholipides sont les plus abondants. La partie hydrophobe des phospholipides est liée à la présence d'acides gras qui peuvent être saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés. Les AGPI plus susceptibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation des lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le MDA et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont été très

étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Marnett, 1999). Ces deux derniers produits réagissent avec les protéines et l'ADN. Une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule. Cependant, le groupe de Brand (Echtay, 2002) a observé que le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS. Ce mécanisme pourrait être un moyen de régulation de la production de ROS par la mitochondrie lors d'une peroxydation lipidique afin de limiter la production de ROS.

II. 4. 2. Oxydation des protéines

Les modifications oxydatives des protéines par les ROS provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} . Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories : d'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées (Levine, 2002). Le rôle des protéines dans la cellule est tel que leur disfonctionnement peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (enzymes, protéines structurales, ...).

Les protéines modifiées par oxydation vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites du stress (Heat Shock Protein, HSP). Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide. Chez les mammifères, les cellules surexpriment les HSP en réponse à une grande variété de stress cellulaires en plus du choc thermique, ce qui conduit à employer le terme de protéine de stress (SP) (Parsell et Lindquist, 1994). Toutefois, il est important de noter que certaines HSP sont exprimées de façon constitutive dans les cellules.

II. 4. 3. Dommages oxydatifs de l'ADN

L'ADN mitochondrial est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn (Stevnsner, 2002).

Les réactions d'oxydation de l'ADN créent un grand nombre de dommages de l'ADN et peuvent être classées en deux catégories.

- **Oxydation directe:** parmi ces dommages, nous pouvons citer les lésions des bases purines et pyrimidines. La plus abondante des bases oxydées est la 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) (Helbock et *al.*, 1999), en effet la guanine est la cible privilégiée de nombreux oxydants tels que l' OH° et le peroxydant (Cadet et *al.*, 1999).

Le 8-oxodGuo est considérée comme une lésion pré-mutagénique car elle peut conduire, en l'absence de réparation, à une transversion (passage d'une base purique en une base pyrimidique) GC→TA.

- **Modification de base par fixation de produits secondaires : formation d'adduits de l'ADN:** Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique (dont le MDA et 4-HNE) peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN (Marnett, 1999; Nair, 1999).

Ces différents dommages de l'ADN semblent fortement impliqués entre autres dans les phénomènes de cancérisation (Feng, 2003 ; Nair, 1999) de même que les mutations de l'ADNmt pourraient être impliquées dans les phénomènes de mort cellulaire altérant le fonctionnement mitochondrial (Bohr, 2002).

II. 4. 4. Les cibles glucidiques du stress oxydant

Les ERO agissent essentiellement sur le glucose et sur les protéoglycanes (présents en grande quantité dans les cartilages). L'oxydation du glucose ou glycosoxydation s'effectue par deux mécanismes qui aboutissent tous deux à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG) (Lenzi, 2011):

- Oxydation *stricto sensu* du glucose en dérivés carbonyles qui donnent des PFG en réagissant avec une protéine ;
- Glycosylation non enzymatique des protéines (ou « réaction de Maillard »): formation d'une liaison covalente entre un ose et des groupements aminés libres d'une protéine aboutissant à la formation de PFG après attaque de cette protéine glyquée par des EOR (OH° et NO^{3-} surtout).

CHAPITRE III : LES PATHOLOGIES LIEES AU STRESS OXYDANT.

Avant d'aborder les différentes pathologies liées au stress oxydant dans l'organisme, il est important de souligner que le lien de causalité entre le stress oxydant et l'apparition des pathologies reste un sujet de controverse dans la communauté scientifique. Le déséquilibre oxydant/antioxydant est-il cause ou conséquence de ces pathologies ? La carence en micronutriments résulte-t-elle d'une carence d'apport et/ou d'une consommation excessive résultant du stress oxydant ? Où se situe la frontière entre stress oxydant physiologique et pathologique ? (Magder, 2006).

III. 1. Cancer

Le cancer semble être une maladie dégénérative liée à l'âge. Il a été démontré que ni O_2^- , ni H_2O_2 ne pouvaient réagir avec le désoxyribose ou les bases de l'ADN, ce qui suggère que le radical OH serait le principal responsable des dégradations observées. Certaines régions de l'ADN dites "nues", contiennent des métaux de transition (Fe ou Cu), et ne sont pas couvertes par les histones. Ainsi des réactions d'oxydation peuvent survenir, catalysées par ces métaux.

La mutagénicité démontrée des produits hydroxylés de la guanine et de la thymine est due à des erreurs de lecture de l'ADN lors de réplication. Par ailleurs, de nombreux facteurs favorisant la survenue de cancers sont en fait des facteurs générant des ERO, soit directement comme le tabac (Hoshino et *al.*, 1990), soit après phagocytose comme l'amiante (Goodlick et Kane, 1986, Shatos et *al.*, 1987), soit par réaction de Fenton par des métaux carcinogènes comme le chrome ou le nickel (Sugiyama et *al.*, 1991), soit par photolyse ou photoactivation comme les ultra-violets A et B (Béani, 1995).

III. 2. Allergies

Des enquêtes épidémiologiques en Europe et au Japon indiquent une augmentation des allergies comme l'asthme, la rhinite allergique, l'eczéma atopique et la dermatite de contact, notamment sur les lieux de travail (Belaich et Marck, 1997, Wada et *al.*, 1995). Le rôle des ERO dans ces affections est de plus en plus décrit. En effet, dans la dermatite de contact, une production des radicaux libres a été mesurée (Wada et *al.*, 1995). En ce qui concerne la dermatite atopique, on observe une production de radicaux O_2^- par plusieurs cellules de l'immunité dont les éosinophiles (Berliner et Hzincke, 1996). Certaines activités

professionnelles prédisposent tout particulièrement à l'apparition, l'entretien ou l'aggravation d'un eczéma atopique des mains (Nilsson *et al.*, 1985, Rysted, 1985). Dans le cas de l'asthme et de rhinites allergiques, les éosinophiles relarguent des médiateurs de l'inflammation notamment le radical O_2^- (Smith *et al.*, 1997). Ainsi, dans toutes les pathologies, les ERO interviennent sur le site de l'inflammation (Trenam *et al.*, 1992).

III.3. Maladies neurodégénératives : la piste oxydative

Le rôle du stress oxydant dans les mécanismes de mort cellulaire au cours des maladies neurodégénératives est évoqué depuis plusieurs années (Christen, 2000). Parmi ces affections, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Parkinson sont les plus fréquentes. Elles sont caractérisées sur le plan neuropathologique par une perte sélective de groupes neuronaux. Tout récemment, un lien vient d'être établi entre des dommages oxydatifs affectant une protéine neuronale, l' α -synucléine, et le développement de pathologies neurodégénératives. La forme familiale de la maladie de Parkinson, qui touche 1 à 2 % de la population âgée de plus de 50 ans, est associée à deux mutations de cette protéine présente dans les synapses neuronales. Des chercheurs de l'université de Pennsylvanie ont montré que, dans les lésions cérébrales neurodégénératives et dans les corps de Lewy, l' α -synucléine est abondante sous forme nitrée, issue de sa combinaison avec les ER. Le stress oxydant pourrait ainsi constituer une étape précoce dans le développement de ces affections (Giasson *et al.*, 2000). Dans la maladie d'Alzheimer, la formation des dépôts amyloïdes est accélérée par la présence d'oxygène (Yatin *et al.*, 1999). Chez les patients ayant une démence de type Alzheimer (DTA), les diènes conjugués et les peroxydes lipidiques sont significativement plus élevés ; de même, il a été observé une diminution de la capacité antioxydante au niveau du cortex temporal inférieur (Karelson *et al.*, 2001).

III. 4. Le diabète et l'hyperglycémie

L'hyperglycémie entraîne une surproduction d'ERO qui peuvent attaquer les cellules endothéliales et provoquer des lésions vasculaires responsables des micro-angiopathies rencontrées dans certains cas de diabète. Comme le rappellent Carriere *et al.*, (2006) et

Delattre *et al.*, (1999), lors d'hyperglycémie, la SOD mitochondriale et d'autres enzymes anti-oxydantes sont surexprimées ce qui permet de limiter la production des ERO les plus délétères. Les sujets diabétiques seraient également soumis à une oxydabilité accrue des LDL ce qui a pour conséquence une augmentation du risque d'accidents vasculaires.

Enfin, Collins *et al.*, (1998) ont évalué les cassures des brins d'ADN de dix patients diabétiques et ont montré que les cassures des brins d'ADN des patients diabétiques sont significativement plus élevées que chez la population témoin conduisant à une situation similaire que lors du vieillissement cellulaire.

III. 5. Le vieillissement cellulaire

III. 5. 1. Théorie radicalaire

Barouki (2006) nous rappelle que c'est Harman en 1956 qui énonce pour la première fois la théorie radicalaire du vieillissement selon laquelle le vieillissement peut s'expliquer par l'accumulation de molécules oxydées aboutissant à des mutations sur l'ADN, à des lésions protéiques (carbonylation, dénaturation et agrégation), à des oxydations lipidiques et à l'augmentation des produits terminaux de glycation avancée. L'ensemble des fonctions physiologiques sont dégradées et les organismes se trouvent plus sensibles aux pathologies.

Chez un nématode (*C. elegans*), l'absence du complexe II (mutation *mev-1*) au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne une surproduction d'anion superoxyde et d'ERO qui en dérivent ce qui diminue de 30% la durée de vie du nématode. L'addition de composés antioxydants (ayant une activité identique à celle de la SOD par exemple) permet de recouvrir une durée de vie égale à celle du lot témoin (Melov *et al.*, 2000).

III. 5. 2. La restriction calorique

Chez l'Homme, des études ont été menées dans une population japonaise (sur l'île d'Okinawa) dont l'espérance de vie est plus élevée qu'ailleurs. La restriction calorique serait à l'origine de cette longévité (Barouki, 2006). Chez d'autres espèces, selon Carriere *et al.* (2006), la restriction calorique aurait également un effet bénéfique sur la durée de vie du nématode *C. elegans*. La faible quantité de substrat énergétique entrainerait une diminution de la quantité de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH,H⁺) et FADH₂ permettant une moindre production d'anion superoxyde et de ses dérivés. De plus, Barouki (2006) cite l'action des protéines découplantes (qui est cependant discutée) qui agissent lors de stress

oxydant en réduisant le gradient de protons de la membrane interne mitochondriale et ainsi diminue les fuites électroniques et la production d'ERO.

III. 5. 3. Stress oxydant et inflammation

Selon Jungbluth (2008), les mécanismes à l'origine de la surproduction d'ERO sont initiés par des cytokines produites lors de l'inflammation et les cellules phagocytaires en sont les principales productrices même si les cellules endothéliales, les fibroblastes et les chondrocytes peuvent également produire des ERO. De plus, il a été montré que les ERO interviennent dans la régulation de l'inflammation par la stimulation de la synthèse de molécules d'adhérence et de médiateurs de l'inflammation. Cette surproduction d'ERO est directement liée au phénomène d'explosion oxydative et permet la destruction des agents pathogènes phagocytés. Rappelons que la myéloperoxydase (MPO) est au centre des processus inflammatoires dans lesquels interviennent les neutrophiles. Cependant, elle peut être délétère pour les cellules phagocytaires et le tissu environnant lorsque les ERO traversent les membranes ou sont relâchés avec les déchets de la phagocytose (Jungbluth, 2008).

III. 6. Les pathologies vasculaires et cardiaques

III. 6. 1. L'insuffisance cardiaque

Des études ont montré que le stress oxydant était accru lors de pathologies cardiaques et plus précisément lors d'insuffisance cardiaque. Une production chronique d'ERO au sein de la mitochondrie des cellules cardiaques provoque des dégâts sur l'ADN mitochondrial et l'accumulation de mutations induit des dommages cellulaires aboutissant à des remodelages cardiaques importants. Ces processus interviendraient dans certaines pathologies cardiaques comme les cardiomyopathies hypertrophiques, les cardiomyopathies dilatées, les blocs de conduction ou encore les infarctus chez l'Homme (Tsutsui, 2001).

III. 6. 2. Pathologies vasculaires

III.6. 2. 1. L'athérosclérose

Il s'agit d'une pathologie qui affecte essentiellement l'espèce humaine. Les ERO et le processus de stress oxydant sont directement impliqués dans la pathogénie de cette maladie. Les lipoprotéines (LDL notamment) oxydées par les neutrophiles activés sont reconnues et phagocytées par les macrophages. La MPO et ses dérivés participent activement à ces

oxydations (Daugherty *et al.*, 1994). Les LDL oxydées s'accumulent dans le macrophage et forment une cellule spumeuse ce qui constitue l'initiation de la formation des plaques d'athérome (Babior, 2000). Une surproduction d'ERO (due à une hypertension, une hypercholestérolémie, un diabète, au tabagisme, etc...) intervient dans l'activation des cellules impliquées dans l'athérosclérose, dans la formation et dans la progression de la lésion (on pourra citer l'intervention de la NADPH oxydase vasculaire par exemple) (Beaudeau *et al.*, 2006)

III.6. 2. 2. Ischémie-reperfusion

Lors d'une rupture, d'une torsion, d'une occlusion ou d'une obstruction vasculaire le flux sanguin est stoppé : c'est l'ischémie. Lorsqu'une ischémie survient, l'apport d'oxygène aux tissus atteints est fortement diminué voire absent et plus l'ischémie dure longtemps, plus les lésions seront graves et irréversibles (Tissier, 2011). Selon Babior (2000), les lésions observées se créent essentiellement lors de la phase de reperfusion. Le processus d'ischémie-reperfusion a beaucoup été étudié dans des cas d'infarctus du myocarde chez l'Homme et les lésions observées ont été attribuées aux ERO (et principalement aux radicaux libres) libérés par les neutrophiles activés sur le site lésionnel. Selon Babior (2000), après une ischémie, on détecte des radicaux libres en concentration importante dans les tissus reperfusés et ce, dès la première minute de reperfusion.

CHAPITRE IV : LES SYSTEMES ANTIOXYDANTS

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme une substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substances oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substances. Les antioxydants cellulaires sont enzymatiques ou non enzymatiques (Mates *et al.*, 1999 ; Comhair, 2002; Droge, 2002).

IV. 1. Systèmes antioxydants enzymatiques

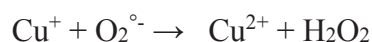
Les principales enzymes antioxydantes sont la SOD, la GPX et la CAT. Plus récemment d'autres enzymes ayant des propriétés antioxydantes ont été révélées, les peroxyrédoxines.

IV. 1. 1. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont le premier et le plus important élément de défense contre les EOR et plus particulièrement contre l'anion superoxyde (Zelko *et al.*, 2002). En effet, même si elles sont à l'origine de la production de H₂O₂, elles permettent surtout de diminuer la durée d'existence de l'anion superoxyde et ainsi, d'empêcher la formation d'espèces beaucoup plus néfastes comme le peroxydinitrite par exemple. Découverte en 1969 par McCoord et Fridovich (Valko *et al.*, 2007), il existe trois isoformes de la SOD (Fridovich, 1997) qui diffèrent par leurs localisations et leurs cofacteurs.

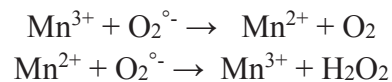
a. SOD 1 ou Cu Zn-SOD

Découverte en premier, il s'agit d'un homodimère très stable. Elle possède du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) comme cofacteurs dans son centre catalytique et est localisée dans le milieu intracellulaire (Fridovich, 1997 et Starkov, 2008). Elle est particulièrement active dans le foie, le cerveau et les globules rouges. Le cuivre participe à l'activité catalytique alors que le zinc stabilise le site actif (Jungbluth, 2008) où il se produit une alternance de réduction et d'oxydation du cuivre par les anions superoxydes :



b. SOD 2 ou Mn-SOD

Assemblée en tétramère, la protéine SOD-2 possède Mn comme cofacteur dans son centre catalytique et est présente dans les membranes internes des mitochondries (Fridovich, 1997). Andreyev *et al.* (2005) et Starkov (2008) signalent sa présence plutôt dans la matrice mitochondriale où elle permet la protection des mitochondries face aux anions superoxydes produits. Son activité est plus notable dans le cœur, le cerveau, le foie et les reins (Jungbluth, 2008). On observe aussi, au sein du site actif, une alternance de réduction et d'oxydation :



IV. 1. 1. 3. SOD 3 ou EC-SOD

Il s'agit de la SOD découverte le plus récemment. Assemblée en tétramère, elle possède une haute affinité pour l'héparine et a été détectée dans le plasma, la lymphe, les liquide d'ascite et dans le liquide cérébro-spinal (Fridovich, 1997). Comme SOD 1, elle possède Cu et Zn comme cofacteur dans son centre catalytique mais est localisée dans le milieu extracellulaire. Son mécanisme d'action est encore mal connu (Jungbluth, 2008).

IV. 1. 2. Glutathion peroxydase

La GPx fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H_2O_2 . Ce système prend aussi en charge des lipides peroxydés. La GPx est l'enzyme clef du système et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron. Le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule (Figure 8).

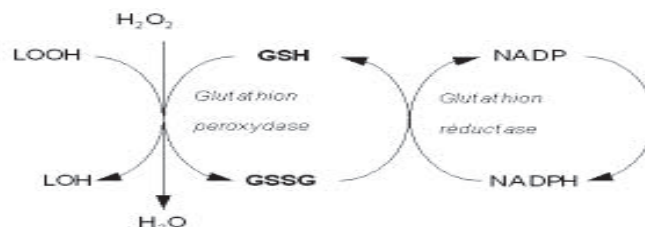


Figure 8. Elimination du H_2O_2 par les réactions enzymatiques combinées de la GPX et de la GRD.

Il existe plusieurs isoformes de GPx contenant du sélénium (Mates, 1999; Comhair, 2002) : i). la GPx cytosolique et mitochondriale, présente dans la plupart des tissus ; ii). La

GPx phospholipide-hydroperoxyde (HPGPx) se trouve dans le cytosol et peut directement réduire les phospholipides hydroperoxydés, et les hydroperoxydes de cholestérol ; iii) ; et enfin la GPx extracellulaire.

A la différence de la GPx qui n'est capable de réduire les peroxydes membranaires qu'après action de la phospholipase A2, et qui n'agit que sur les acides gras hydroperoxydés, les HPGPx réduit directement les hydroperoxydes du cholestérol, les cholestéryl-esters, et des phospholipides présents dans des membranes oxydées ou des lipoprotéines oxydées

IV.1. 3. Catalase

La CAT agit efficacement avec le H₂O₂ pour donner de l'eau et de l'O₂ ($2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{O}_2$). La CAT est localisée principalement dans le peroxyosome, mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme. La GPx et la CAT permettent ainsi l'élimination du H₂O₂. Toutefois, la CAT semble jouer un rôle important en présence de forte concentration de H₂O₂, alors que la GPx prend en charge les hydroperoxydes et même le H₂O₂ en faible quantité.

IV. 1. 4. Peroxyredoxines

Les peroxyredoxines (Prx), ou thioredoxine peroxydase, ont été découvertes récemment et font l'objet de nombreux travaux concernant leurs fonctions antioxydantes (Wood, 2003). Elles sont au nombre de 6 chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxyosomes, associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant dans la cellule à travers une activité peroxydase, où H₂O₂, le peroxy-nitrite et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Malgré leur plus faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et la CAT, ces protéines pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes du fait de leur quantité importante (0.1 à 0.8% de protéines solubles cellulaires) et de leur large distribution dans la cellule. De plus, les Prx joueraient un rôle significatif lors du développement du poumon et en réponse à un stress oxydant pulmonaire (Kim et *al.*, 2001).

IV. 2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques

IV. 2. 1. Vitamine E

vitamine E est un terme générique pour tous les tocophérols et les tocotriénols, desquels existent 8 dérivatifs et dont l' α Test le plus abondant (Shils et *al.*, 2006). La vitamine

E agit directement sur une grande variété d'ERO pour former un radical peu réactif. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie principalement par la vitamine C, mais également par d'autres composés comme le GSH, la vitamine A et l'ubiquinol. La vitamine E est liposoluble et a été démontrée comme le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Morris et Carson, 2003, Shils et *al.*, 2006, Traber et Atkison, 2007). Elle pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Margaritis et *al.*, 2003, Lyn Patrick 2006).

IV. 2. 2. Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est le plus important antioxydant hydrosoluble : son rôle est essentiel dans les compartiments intra- et extra-cellulaires. Son mécanisme d'action est mal connu. Il fait intervenir des réactions d'oxydoréduction entre la forme réduite de la vitamine C (l'acide ascorbique) et sa forme oxydée (dehydroascorbate) (Stoyanovsky et *al.*, 1995).

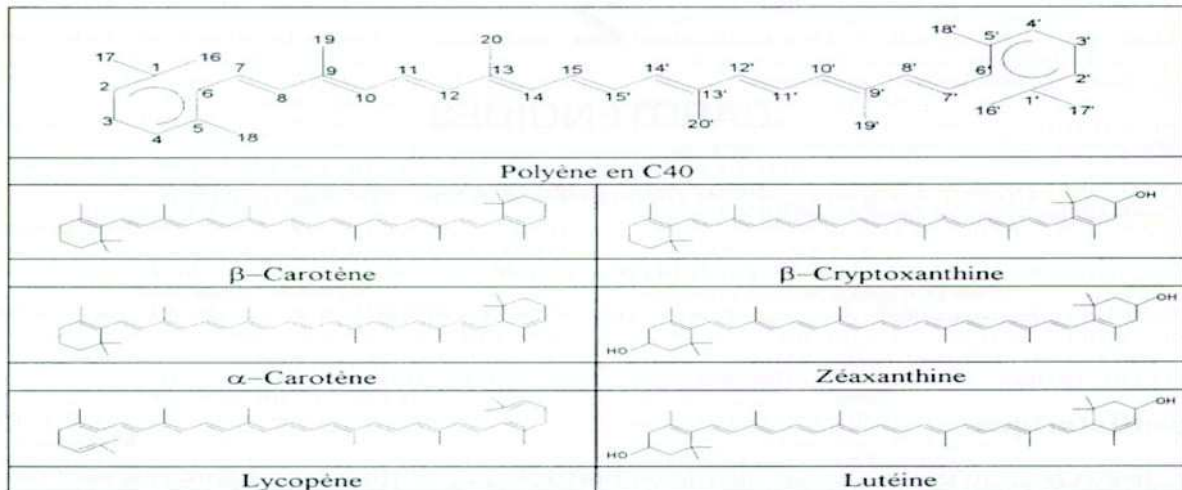
L'ascorbate capte les anions superoxydes, hypochlorite, hydroxyl et l'oxygène singulet. Ses principaux rôles sont les suivants :

- *in vitro*, il inhibe la peroxydation lipidique avant la vitamine E,
- il protège les membranes vis à vis de l'attaque peroxydative, en piégeant efficacement les radicaux peroxydes ROO° dans la phase aqueuse, avant qu'ils puissent initialiser les peroxydations,
- il participe à la régénération de la vitamine E,
- il est capable de neutraliser l'oxygène singulet

IV. 2. 3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une grande famille qui regroupe plus de 600 molécules (Tableau IV).

Tableau IV : Structure des principaux caroténoïdes (Le Moel et *al.*, 1998)



Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β-carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A. Leur fonction dans l'organisme leur est propre et est indépendante de cette conversion (Le Moel et *al.*, 1998).

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes:

- ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes:

$$BC + ROO^\circ \rightarrow BC^\circ$$

$$BC^\circ + O_2 \leftarrow BC-OO^\circ$$

$$BC + ROO^\circ \rightarrow \text{Produits inactifs}$$
- ils empêchent l'initiation des réactions radicalaires en neutralisant l'oxygène singulet.

Néanmoins, tous les caroténoïdes n'ont pas la même efficacité pour inactiver l'oxygène singulet. Par ordre décroissant d'efficacité on classe : le lycopène puis le β-carotène et enfin la lutéine.

Comme la vitamine E, les caroténoïdes sont des molécules lipophiles. Ils sont localisés dans la membrane plasmique et participent donc à la protection et au maintien de l'intégrité cellulaire.

IV. 2. 4. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes (thé, raisin, cacao, blé, orge, maïs, fruits et

légumes...). Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Jacques et *al.*, 1995).

Le polyphénol (AOH) cède un atome H aux radicaux libres. Sa forme oxydée (AO^o) est stabilisée ensuite par résonance ou dimérisation.

IV. 2. 5. Taurine

La taurine (acide 2-aminoethanesulfonique) est un acide aminé sulfoné (Figure 9). La majeure partie de cette molécule se trouve dissoute dans le cytosol soit liée aux membranes cellulaires. Son action dans l'organisme est mal connue. Elle serait capable d'inactiver des radicaux libres. A côté de son rôle dans les défenses antioxydantes, elle participerait aussi à la régulation de la pression osmotique cellulaire en modifiant les concentrations intracellulaires de calcium (Lyn Patrick, 2006).

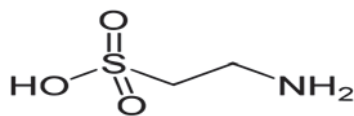


Figure 9. Structure de la taurine.

IV. 2. 6. Oligo-éléments

Le zinc, le sélénium et le manganèse sont des oligo-éléments qui interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres.

Selon Di Silvestro (2000), les possibles actions antioxydantes du zinc sont les suivantes :

- Protection contre la diminution de concentration de la vitamine E
- Stabilisation de la structure membranaire
- Limitation de la production endogène de radicaux libres
- Participation à la structure et à la fonction de l'enzyme extracellulaire à activité antioxydante : la SOD

- Participation au maintien de la concentration tissulaire en métallothionine, molécule potentiellement capable de piéger les radicaux libres.

Le sélénium est connu pour ses propriétés antioxydantes. Il entre dans la constitution de la GPx. Cette enzyme sélénio-dépendante participe au recyclage du glutathion et réduit la peroxydation lipidique en catalysant la réduction des peroxydes dont le H₂O₂. D'autres rôles sont attribués à cette enzyme : elle interviendrait dans la transduction des signaux cellulaires, la régulation de l'expression de gènes (par son action au niveau des facteurs de transcription), l'induction de Bêta carotène et jouerait donc un rôle clé lors du cycle cellulaire.

IV. 2.7. Minéraux

Nous citerons tout particulièrement, le magnésium. Il se trouve dans le chocolat, les produits céréaliers, les légumes et les fruits secs. Son déficit favorise la peroxydation lipidique.

CHAPITRE V : LA VITAMIE E

V. 1. Historique

En 1922, l'embryologiste Herbert Evans et son assistante Katherine Bishop, de l'Université de Californie à Berkeley, constatent que chez des rats soumis à un régime appauvri en lipides, les femelles peuvent tomber enceintes mais aucun fœtus ne se développe. Cependant, les grossesses arrivent à terme quand le régime est supplémenté avec des feuilles de laitue ou du germe de blé. Les deux scientifiques soupçonnent l'existence d'un composé lipophile, qu'ils nomment *Facteur X*, indispensable au développement du fœtus. En 1924, indépendamment des recherches de H. Evans et K. Bishop, Bennett Sure, de l'Université de l'Arkansas, montre qu'un composé retiré d'un régime alimentaire induit la stérilité chez les rats mâles. Bennett Sure nomme ce composé *Vitamine E*. Elle reçoit aussi le nom de tocophérol, du grec *tokos* : progéniture et *pherein* : porter. H. Evans et Oliver Emerson réussissent à isoler la vitamine E à partir de l'huile germe de blé en 1936, et Erhard Fernholz en détermine la structure en 1938. La même année, le Prix Nobel de chimie Paul Karrer réalise la synthèse de l' α Tracémique. Ce n'est qu'en 1968 que la vitamine E est reconnue comme un élément nutritif essentiel pour l'homme par le National Research Council des États-Unis. Les circonstances de la découverte de la vitamine E lui ont valu dans le grand public une réputation de vitamine de

la fertilité, voire de la puissance sexuelle. Historiquement, la vitamine E reste tout de même la vitamine de la reproduction (Compagne, 2000).

V. 2. Structure chimique

La vitamine E existe sous huit formes, quatre tocophérols et quatre tocotriénols. Les tocophérols sont des substances constituées par un noyau hydroxychromane et une chaîne latérale saturée phytyle à 16 carbones. Le nombre et la position des groupements méthyle sur le noyau hydroxychromane définissent les différentes formes de tocophérols et tocotriénols (Tableau V). La forme la plus active est l' α -tocophérol (α T) que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature. Les β et γ tocophérols ont une activité vitaminique réduite (respectivement 40 et 15 % environ de l'activité de la forme α , alors que le δ est pratiquement inactif. Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale (Figure 11). Deux de ces produits possèdent également une certaine activité vitaminique : environ 20% pour l' α -tocotriénol et 5% pour le β -tocotriénol. Les autres sont inactifs (Kayden et Traber., 1993).

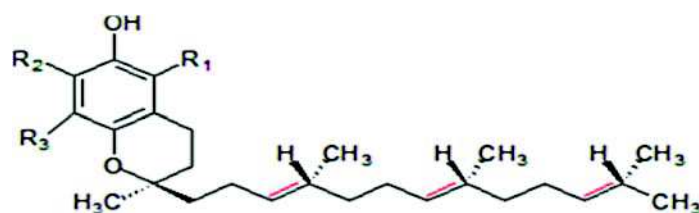


Figure 11. Structure des tocotriénols

Tableau V : Les différentes formes de tocophérols.

	R ₁	R ₂	R ₃
alpha-tocophérol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
béta-tocophérol	CH ₃	H	CH ₃
gamma-tocophérol	H	CH ₃	CH ₃
delta-tocophérol	H	H	CH ₃

V. 3. Propriétés physico-chimiques

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

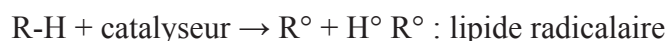
V. 4. Vitamine E et peroxydation lipidique

V. 4. 1. Mécanismes d'oxydation des lipides

Les principaux substrats de l'oxydation sont les AGI car ce sont les doubles liaisons qui vont attirer l'oxygène atmosphérique. Plus l'AG est insaturé, plus il s'oxydera facilement. L'AG gras s'oxydera également plus vite à l'état libre que lorsqu'il fait partie de molécule de TG ou de PL. On distingue trois types de réactions (Pre, 1991):

- L'initiation primaire qui correspond à la formation de radicaux libres. Un radical libre est une molécule qui possède un électron non apparié et on le note souvent R° .

Ces réactions nécessitent une énergie d'activation élevée et sont catalysées par la lumière, l'élévation de température et par la présence d'ions métalliques (Cu, Fe).



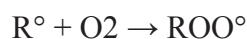
R-H: acide gras insaturé



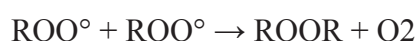
Lorsque la teneur en peroxydes (générés lors des réactions primaires) s'accroît, on observe une oxydation dite secondaire qui résulte de la décomposition des peroxydes.

- La propagation est l'étape d'oxydation des lipides insaturés par l'oxygène gazeux. Elle se caractérise par une accumulation de peroxydes lipides et nécessite l'intervention de radicaux libres qui, dans le cas de lipides purs, peuvent provoquer la formation de 10 à 100 molécules de peroxyde.

L'énergie d'activation de ces réactions est très faible.



- La terminaison entraîne la disparition des espèces radicalaires accumulées dans le milieu et la formation de composés stables non radicalaires. Ces réactions peuvent donner naissance à des composés très divers.



On a la formation de polymères de poids moléculaires élevés ce qui entraîne l'épaississement des CG. L'apparition dans le milieu de cétones, d'aldéhydes et d'époxydes est à l'origine de l'odeur et du goût désagréable des corps gras. A un niveau d'altération moindre, on peut craindre que l'ingestion des graisses oxydées ait des effets néfastes sur la qualité nutritionnelle des denrées, par exemple en entraînant la destruction des vitamines sensibles à l'oxydation telle que la vitamine A, ou la dégradation d'acides gras essentiels qui sont indispensables à l'organisme. Il faut noter également que les produits issus de la dégradation des lipides peuvent être toxiques pour l'organisme.

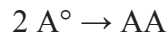
Les répercussions économiques peuvent être importantes car les denrées alimentaires deviennent inconsommables. Il suffit de très faibles doses de matières grasses oxydées (de l'ordre de 1%) pour rendre un aliment impropre à la consommation car le goût de rance apparaît nettement. D'où l'intérêt des industriels d'avoir recours à des antioxydants tels que la vitamine E pour limiter ces phénomènes.

IV. 4. 2. Action antioxydante de la vitamine E

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



Le radical libre A° formé par la vitamine E (AH) se stabilise en s'associant avec d'autres molécules selon les réactions suivantes :



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

IV. 4. 3. Les tocophérols piègent l'oxygène singulet

Les tocophérols inhibent les oxydations induites par l'oxygène singulet. L' α T a une meilleure efficacité que le bêta et le delta tocophérol. 40 à 120 molécules d'oxygène singulet peuvent être neutralisées, avant que ce tocophérol ne soit détruit. Cette activité est cependant 50 fois moindre que si elle était réalisée par les caroténoïdes.

IV. 4. 4. Métabolisme de l'acide arachidonique

Le métabolisme de l'acide arachidonique ressemble à une peroxydation lipidique et enzymatique contrôlée. Les radicaux libres augmentent l'activité de la phospholipase A2 membranaire et la libération de l'acide carotène à partir des lipides membranaires. Celui-ci est à l'origine de la production de prostaglandines et de leucotriènes. Ces molécules interviennent ensuite dans les réactions inflammatoires, par exemple. En bloquant ce type de réaction, la vitamine E permettrait de limiter l'emballement de la réaction immunitaire et aurait des effets immunomodulateurs (Needleman et *al.*, 1986)..

IV. 5. Sources

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

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

IV. 6. Toxicité des antioxydants

Les doses de vitamines utilisées en supplémentation sont assez fortes. Ces molécules ne présentent qu'une faible toxicité. La tendance actuelle est d'enrichir les aliments avec le maximum possible d'antioxydants. Pourtant, cette utilisation de fortes doses n'est pas dénuée de danger.

IV. 6. 1. Effet antivitamine K

La supplémentation à fortes doses de vitamine E n'est pas associée à des effets délétères significatifs. Cependant, il faut noter que la vitamine K est potentiellement inhibée par la vitamine E : sous forme de quinone, la vitamine E diminue l'adhésion plaquettaire.

O'reilly *et al.* (2000) ont exploré les effets de fortes doses de vitamine E sur l'hémostase. Le temps de saignement de chats supplémentés avec 1000 UI de vitamine E/kg d'aliment n'a pas été significativement augmenté. Ce résultat confirme des études menées chez l'homme, mais sont différents de ceux obtenus chez le rat. De plus amples recherches semblent ainsi nécessaires avant de conclure sur l'innocuité de l'utilisation de fortes doses de vitamine E et ses effets sur l'hémostase.

VI. 6. 2. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques

Des effets pro-oxydants peuvent être mis en évidence *in vitro* pour tous les agents réducteurs. Qu'en est-il réellement *in vivo* ?

a. Expérience de supplémentation

Un programme d'enrichissement à des doses de 100 UI d'acétate d' α T par jour, pendant 8 semaines puis de 1000 UI pendant 8 semaines encore, a été expérimenté par Hill *et al.* (2001), chez des lévriers de courses. Leurs temps de course ont été mesurés et montrent

que les chiens supplémentés à 1000 UI sont moins rapides. L'utilisation de la vitamine E serait donc néfaste aux performances de ces chiens. Par contre, les temps de course des chiens supplémentés à une dose de 100 UI et du groupe témoin sont comparables. Seules les fortes doses de vitamine (1000 UI) auraient des effets négatifs, d'un point de vue sportif.

b. Effets pro-oxydants

Les radicaux peroxy- réagissent plus rapidement avec le tocophérol qu'avec les lipides. Une molécule de tocophérol suffit pour protéger 103-108 molécules d'AGPI, si le niveau de peroxyde est faible. Cela pourrait expliquer le fait que la concentration en α T dans les membranes cellulaires ramenée à celle en AGPI ne soit pas très élevée : α T/Ac Arachidonique = 1/500 dans la membrane érythrocytaire. Une faible quantité de vitamine E suffit à interrompre les réactions de propagation. A de fortes concentrations, des effets pro-oxydants sont à craindre. Il existe des réactions parallèles qualifiées de pro-oxydatives faisant intervenir la vitamine E. L'effet pro-oxydant de l' α T serait, en particulier, lié au radical tocophéroxy ($A\text{-TO}^\circ$). Il pourrait oxyder directement les lipides membranaires en l'absence de molécules capables de régénérer le tocophérol comme la vitamine C (Stoyanovsky et *al.*, 1995).

c. Effets co-pro-oxydants

In vitro, les tocophérols sont capables de réduire les ions métalliques (M^{n+}) selon des réactions similaires à celle de Fenton :



Ces ions ($M^{(n+1)+}$) sont ensuite capables d'exercer leur action prooxydante. Les tocophérols ne sont pas directement des pro-oxydants, dans ce cas. Ils réagissent plutôt de façon synergique, en présence de pro-oxydants reconnus comme les métaux de transition sous forme ioniques, les lipides peroxydés... C'est pour cela qu'ils sont appelés co-pro-oxydants (Sayre et al. 2005).

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1. Animaux étudiés

Une huile de tournesol fortement oxydée par insufflation d'air à 98°C, a été administrée à des rats males de souche Wistar âgés de 4 semaines et ceci pendant une durée de 8 semaines.

Le premier lot : Sunflower Oil (SO) reçoit un régime équilibré avec 5g/100g d'aliments d'huile fraîche, le second lot : Oxidized Sunflower Oil (OSO) reçoit un régime équilibré avec 5g/100g d'aliment de cette huile oxydée, le troisième lot : Oxidized Sunflower Oil α T 600 mg/kg d'aliment (OSOE₆₀₀) reçoit un supplément de vitamine E de 600mg avec 5g/100g d'aliment de cette huile oxydée, enfin, le quatrième lot : Oxidized Sunflower Oil α T 1200 mg/kg d'aliment (OSOE₁₂₀₀) reçoit un supplément de vitamine E de 1200mg avec 5g/100g d'aliment de cette même huile oxydée.

La période de 8 semaines devrait entraîner un changement au niveau des activités du système enzymatique antioxydant ainsi qu'au niveau du tissu cardiaque.

I.2. Elevage

Nos expériences ont été réalisées sur des rats males de souche Wistar; ils nous ont été fournis par le centre d'élevage de l'Institut Pasteur de Kouba.

Après sevrage et une semaine d'adaptation, quatre (04) lots expérimentaux de huit (08) animaux chacun sont constitués. Les aliments et l'eau sont donnés *ad libitum*, l'aliment est mis dans des boites 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 (Holman, 1970).

La température de l'animalerie est de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec un cycle jour-nuit de 12 heures et une hygrométrie de 35%. Tous les 2 à 3 jours les rats sont pesés.

I.3. Préparation des régimes

Les animaux reçoivent un régime en poudre composé d'aliments alipidiques auxquels est incorporée soit de l'huile de tournesol fraîche, soit de l'huile oxydée, à raison de 5g/100g d'aliments. La teneur des aliments en différents constituants est semblable pour les quatre régimes (tableau VI). Le taux en vitamine E est de 170 mg/Kg d'aliments, pour les régimes des lots SO et OSO. Du fait des ses propriétés antioxydantes dans la cellule, ce composé peut exercer un effet protecteur vis-à-vis de l'ingestion des esters oxydés de l'huile dégradée ; par contre pour les lots OSOE₆₀₀ et OSOE₁₂₀₀ le régime est supplémenté en vitamine E, respectivement de 600 et 1200 mg / Kg de régime.

Les aliments sont préparés tous les 1 ou 2 jours par fraction de 500 g d'aliments et gardés à 4°C dans des boites hermétiques.

Tableau VI: Constitution des régimes alimentaires

Ingrédients	SO	OSO	OSOE ₆₀₀	OSOE ₁₂₀₀
Caséine	20	20	20	20
Amidon	44.9	44.9	44.9	44.9
Saccharose	21.94	21.94	21.94	21.94
Agar-agar	2	2	2	2
<i>dl</i> -Méthionine	0.16	0.16	0.16	0.16
Mélange minéral	4	4	4	4
Mélange vitaminique	2	2	2	2
Huile fraîche	5	/	/	/
Huile oxydée	/	5	5	5
Energie (Kcal)	392	392	392	392

- SO, Sunflower Oil; OSO, Oxidized Sunflower Oil; OSOE₆₀₀, Oxidized Sunflower Oil α T (600 mg · kg⁻¹); OSOE₁₂₀₀, Oxidized Sunflower Oil α T (1200 mg · kg⁻¹).

- Mélange minéral / 100 g d'aliment: KH₂PO₄ 20.0 mg; CaCO₃ 34.6 mg; CaHPO₄ 26.55 mg; NaCl 13.70 mg; MgSO₄ 7H₂O 3.42 mg; CuSO₄ 5H₂O 0.042 mg; MnSO₄ H₂O 0.27 mg; FeSO₄ 7H₂O 1.02 mg; ZnSO₄ H₂O 0.15 mg; CaCOGG 0.0008 mg; KI 0.0016 mg.

- Mélange vitaminique / 100 g d'aliment: Vit A 19.800 IU; 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 -tocopherol acetate) 170 mg; K3 40 mg; PP 100 mg; choline chloride 1.360 mg; acide folique 5 mg; Ac PAB 50 mg; biotine 0.3 mg.

I. 4. Réactifs et appareillage

I. 4. 1. Réactifs

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). L'eau bidistillée est utilisé pour l'ensemble des analyses.

I. 4. 2. Chromatographie en phase gazeuse

I. 4. 2. 1. Description de l'appareil

- Le chromatographe est de type CARLO HERBA muni d'un injecteur automatique « oncolumn» et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).
- Colonne capillaire en silice greffée type carbowax C. P. AX 52 C. B. d'une longueur de 50 m, muni d'une précolonne de 2m en silice désactivée. Les colonnes capillaires, par rapport aux colonnes classiques, offrent l'avantage d'être plus performantes (meilleur pouvoir séparateur, analyse des quantités très faibles) et plus rapides à éluer les éléments constitutifs des échantillons (1h au lieu de 2 à 3h).

I.4. 2. 2. Conditions opératoires

- Gaz vecteur : hydrogène
- Pression du gaz vecteur : 1 bar
- Température de la chambre d'injection : température ambiante
- Température du détecteur : 250°C
- Température du four : 54°C à 220°C à raison de 3°C/mn
- Traitement des données sur microordinateur STANG et par logiciel Nelson (intégrateur des signaux perçus par le détecteur de retransmission sous forme de chromatogramme ou en quantité numérique).

I. 4. 3. Chromatographie d'adsorption

Le dosage des triglycérides altérés a été réalisé par chromatographie d'adsorption, selon la technique préconisée par Guhl et *al.*, modifiée par Grimard et *al.*, (1984) et Gere (1984). On a utilisé une colonne de silice et trois solvants pour éluer les différentes fractions : un mélange éther de pétrole-éther éthylique 87 :13 (v/v), éther méthylique et méthanol.

I.4.4. Chromatographie Liquide Haute Performance

La technique Chromatographie Liquide Haute Performance a été adoptée par de nombreux chercheurs comme méthode de choix pour l'identification des antioxydants liposolubles tocots, en raison de la séparation relativement facile des isomères β et γ tocophérols et tocotriénols, qui possèdent chacun deux groupements méthyles sur le cycle chromanol. En effet, la HPLC avec phase stationnaire à base de silice présente une grande sélectivité et permet de différencier les nombreuses formes d'antioxydants tocophérols et tocotriénols (Gimeno et *al.*, 2000).

a). Préparation de l'échantillon : l'échantillon est dilué dans de l'hexane 1/10 (v/v), on transfère 200 μ l de cette solution dans un tube et on ajoute 800 μ l de méthanol, puis on agite au vortex pendant 5 mn, et enfin filtré à travers un filtre de 0.45 μ m.

b). Conditions chromatographiques:

- Volume à injecter : 50 μ l
- Phase mobile : méthanol/eau (96/4) (v/v).
- Colonne : C 18
- Température : 45°C
- Débit : 2 ml/ mn
- Longueur d'onde : 292 nm.

c). Expression des résultats : L'interprétation des chromatogrammes se fait par comparaison par rapport au chromatogramme de l'étalon pur de la vitamine E réalisé dans les mêmes conditions, grâce au logiciel millenium.

II. METHODES

II.1. Dégradation de l'huile

Notre choix a porté sur la méthode de dégradation oxydative avec insufflation d'air dans l'huile maintenue à 98°C pour accroître la vitesse du processus naturel d'autoxydation (Drozdowki et Szukalska, 1987; AFNOR, 1984), modifiée par Blanc *et al.*, (1992).

L'échantillon, 500 ml d'huile de tournesol est placé dans un bioréacteur de 1l, et est maintenu à $98\pm 3^{\circ}\text{C}$ sur une plaque chauffante avec agitation. L'insufflation d'air est assurée par un accessoire du bioréacteur baignant dans l'huile et relié à une pompe à air réglée à un débit de 80 l/h, la température est contrôlée régulièrement.

La dégradation, est faite à l'abri des rayons solaires; ce processus à été choisi du fait de la température modérée et de l'oxygène de l'air qui est le facteur déterminant de la dégradation. Après la dégradation, l'huile oxydée et l'huile fraîche sont réparties dans des flacons de 100 ml, dans lesquels on introduit de l'azote avant de les conserver à - 20°C.

II.2. Etude de l'état d'altération de l'huile

II.2.1. Mesure de l'état d'altération globale

L'estimation globale de l'état d'altération de cette huile oxydée a été réalisée en étudiant les différents indices de l'huile (Association Française de Normalisation, 1984).

- Indice de peroxyde (norme AFNOR T60-220 : Association Française de Normalisation), quantité de peroxydes contenue dans 1g de corps gras et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode.
- Indice d'iode (norme AFNOR T60-203 : Association Française de Normalisation), quantité d'iode fixée par 100g de corps gras.

- Indice d'acide (norme AFNOR T60-204 : Association Française de Normalisation), c'est la teneur en acides gras libres exprimée en mg de KOH nécessaire pour neutraliser l'acidité libre d'1g du corps gras.
- la détermination de l'absorbance E à 232 nm ou au voisinage de 268 nm (norme AFNOR T 60-223) permet la détection et éventuellement le dosage des acides gras conjugués ou des produits d'oxydation conjugués présents dans le corps gras.

II.2.2. Dosage des produits polaires

Le dosage des produits polaires a été réalisé en utilisant les techniques suivantes (Perrin *et al.*, 1984).

- Dosage des triglycérides polaires par chromatographie d'adsorption, sur colonne de silica-gel (Gere, 1984).
- Obtention des esters polaires par chromatographie phase gaz (Grandgirard et Julliard, 1987) ;

II.3. Sacrifices et prélèvements

Les animaux sont sacrifiés à l'âge adulte (90 jours), après un jeun de 24 heures, en les anesthésiant au chloroforme, le cœur 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 SOD, la CAT, la GPX, la Glutathion Réductase et la Glucose-6-phosphate déshydrogénase ont été réalisées sur du tissu cardiaque gardé à - 80°C. Pour l'étude histologique, le cœur est rapidement fixé dans le formol 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.

II. 4. Etude du tissu cardiaque

II. 4.1. Préparation de l'homogénat cardiaque

Pour l'homogénéisation du tissu cardiaque, 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 homogénéiseur de Potter, maintenu dans un bain d'eau glacée.

II. 4.2. Dosage des protéines

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

II. 4.3. Peroxydation lipidique

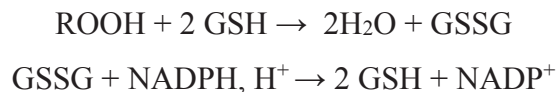
La peroxydation lipidique est mesurée sur l'homogénat de cœur (100 mg/ml, tampon 0.2 M phosphate pH 7.4) par la méthode de Draper (1993), basée sur la formation d'un complexe absorbant à 532 nm entre une molécule de malondialdéhyde produite lors de la peroxydation lipidique et deux molécules d'acide thiobarbiturique avec l'élimination de deux molécules d'eau. La gamme étalon est réalisée avec une solution de malondialdéhyde préparée par hydrolyse du 1, 1, 3, 3 – tétraméthoxypropane avec l'acide sulfurique 1%, la loi de Beer Lambert est vérifiée de 1 à 20 $\mu\text{mol/l}$. Deux pics d'absorption secondaires sont observés à 245 nm et 305 nm (Draper, 1993). Cette réaction est très sensible aux conditions opératoires et de plus, différentes absorptions dont les amines peuvent interférer en réagissant avec l'acide thiobarbiturique utilisé.

II. 4. 4. Dosages enzymatiques

Les dosages colorimétriques sont effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Ultaspec 2000 UV/visible. Les activités enzymatiques sont exprimées en activités spécifiques en fonction de la quantité en protéines ; 4 essais sont réalisés pour chaque échantillon.

II. 4. 4. 1. Dosage de la Glutathion Peroxydase

L'activité de la GPX (EC 1. 11. 1. 1) est évaluée en présence de Glutathion comme réducteur, selon la méthode de Paglia et Valentine (1967), cette réaction est couplée à la réduction par GRD 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 par minute et par mg de protéines (qui correspond à la quantité d'hydroperoxydes réduit), le substrat utilisé est l'eau oxygénée (H_2O_2 à 6.6 mmol), mais il est nécessaire d'ajuster le milieu réactionnel à une concentration de 20 mmol avec de l'azide de sodium, pour inhiber l'activité de la CAT, la réaction non enzymatique est importante avec le H_2O_2 , ce qui impose également de ne pas dépasser une concentration finale de GSH de 0.5 mmol.

L'homogénat du cœur (1g /10ml), est réalisé dans du tampon Tris-HCL de 50 mmol, 0.1 mmol EDTA, pH 7.6 à l'aide d'un broyeur homogénéiseur de Potter ; 100µl d'échantillon sont mis en suspension dans une solution A contenant 13 mg de NADPH, 34 mg de GSH et 100 µg de GRD pour 100 ml de tampon, on incube à 37°C pendant 3 mn pour activer l'enzyme, puis on ajoute 50 µl de substrat H_2O_2 à 6.6 mmol, on agite et on enregistre l'absorption à 340 nm pendant un temps supérieur ou égal à 2 mn.

II. 4. 4. 2. Dosage de la Glutathion Réductase

L'activité de la GPX (EC 1. 6. 4. 2) est évaluée selon la méthode de Beutler, (1984), en mesurant la disparition du NADPH à 339 nm, elle est exprimée en nmol de NADPH oxydé par mn et par mg de protéines.

100 µl d'échantillon obtenu après broyage de tissu dans un tampon phosphate à 0.12 mol, pH 7.6 ; sont mis en suspension, avec 2.6 ml de tampon phosphate à 0.12 mol, pH 7.6 à 37°C, et 100 µl d'une solution d'EDTA à 15 mmol et 100 µl d'une solution de GSSG à 65.3 mmol. On attend 5 mn puis on ajoute 50 µl d'une solution de NADPH à 9.6 mmol et on lit l'absorbance à 339 nm pendant un temps de 3 mn.

II. 4. 4. 3. Dosage de la Superoxyde dismutase

La SOD Cu-Zn (EC 1.15. 1. 1), est évaluée selon la méthode de Marklund et Marklund (1974), dont le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par l'anion superoxyde (O_2^-) et la dismutation de O_2^- par la SOD.

Les échantillons sont centrifugés à 4000 t/mn à - 20°C pendant 5 m dans du Tampon (tris 50 mM /DTPA 1mM), prélever le surnageant :

Pour le dosage de la SOD totale, 80 µl du surnageant est mis en présence de 40 µl de pyrogallol, homogénéiser, attendre 45 s et lancer la cinétique à 420 nm pendant 1 mn. Concernant le dosage de la Mn SOD, prendre 200 µl du surnageant et 40 µl de KCN (35.2 mg/10 ml d'eau distillée) pour inhiber la SOD Cu-Zn ; prendre 100 µl du mélange et 50 µl de pyrogallol, homogénéiser, attendre 45 S et lancer la cinétique à 420 nm pendant 1 mn.

Une unité d'activité enzymatique étant définie comme la quantité capable d'inhiber 50% de l'oxydation du pyrogallol, on calcule les activités des SOD totales, Mn et Cu/Zn, comme suit :

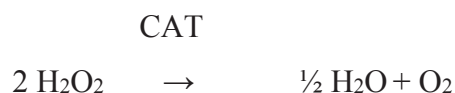
$$\text{SOD totale (U/ml)} = (\% \text{ d'inhibition} \times 1000) / (\text{Vol de prise d'essai} \times 50)$$

$$\text{SOD Mn (U/ml)} = (\% \times 1000) / (100 \times 50) \times 1.2$$

$$\text{SOD Cu/Zn (cytoplasme)} = \text{SOD totale} - \text{SOD Mn (mitochondrie)}$$

II. 4. 4. 4. Dosage de la Catalase

L'activité de la CAT (EC 1. 11. 1. 6) est mesurée en suivant la décomposition du H₂O₂, qui absorbe à 240 nm (Aebi, 1984).

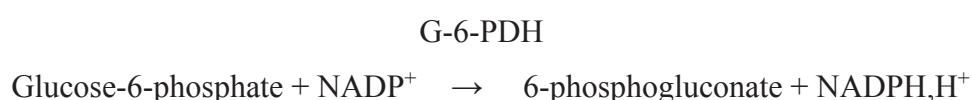


Les résultats sont exprimés en nmol de H₂O₂ réduit/mn/mg de protéines.

L'homogénat de cœur (1g pour 7 ml de tampon), sont préparés dans du tampon Tris-HCL à 50 mmol et à 0.1 mmol d'EDTA par litre, pH 7.4, 100 µl d'échantillon sont mis en présence de 1.5 ml de tampon de broyage, on incube à 35°C pour activer l'enzyme, puis on rajoute 50 µl de substrat (H₂O₂ à 10 mmol), et on lit l'absorbance à 240 nm pendant un temps de 3 mn.

II. 4. 4. 5. Dosage de la Glucose-6-phosphate Déshydrogénase

L'activité de la Glucose-6-phosphate Déshydrogénase (EC 1. 1. 1. 49) a été mesurée en suivant l'apparition du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) à 339 nm qui est exprimée en nmol par mn par mg de protéines ; selon la technique spectrophotométrique décrite par Bergmeyer (1963), basée sur la réaction suivante :



L'homogénat tissulaire du cœur, est réalisé dans le tampon Tris-HCl à l'aide d'un broyeur homogénéiseur de Potter. Le principe consiste à mettre 20 µl d'une solution contenant 580 µl de H₂O bidistillée, 100µl d'une solution de NADP⁺, 100 µl de tampon Tris et 100 µl d'une solution de MgCl₂ ; et 100 µl de Glucose-6-Phosphate, à laquelle on ajoute 0.5 mg de maleinimide qui est un inhibiteur de la 6-phosphogluconate déshydrogénase, qui est un enzyme qui oxyde le NADP⁺ en NADPH,H⁺, et on lit l'absorbance à 339 nm pendant un temps de 3 mn.

II. 4. 4. 6. Détermination de la teneur en alpha-tocopherol

La concentration en alpha-tocopherol du tissu cardiaque a été déterminée par la technique de Desai (1984). 0.5 ml de l'homogénat du tissu cardiaque, 0.5 ml d'éthanol et 0.25 ml de 25% d'acide ascorbique sont incubés à 70°C pendant 5 min, on rajoute 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 alpha-tocopherol est obtenue directement par la courbe étalon.

II. 4. 4. 7. Traitement des prélèvements histologiques :

Les prélèvements histologiques ont été traités au laboratoire d'histopathologie du service Pierre Marie Curie de l'hôpital Mustapha Pacha d'Alger, selon les techniques décrites par Martoja, (1967) et Gabe (1968).

Pour l'observation en Microscope optique, les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

a) Fixation, Inclusion en paraffine et coupe : des prélèvements de 5 mm à 1 cm de côté ont été réalisés et fixés dans du formaldéhyde dilué à 10% et tamponné à la neutralité pendant 48 heures. Tous les prélèvements ont été enrobés en paraffine après déshydratation (passages successifs dans différents bains d'alcool de concentration croissante : 80°, 95° et 100°) puis éclaircissement dans du toluène. Les prélèvements ont ensuite été inclus en paraffine dans une station d'enrobage (MICROM) et coupés à une épaisseur de 3 µm à l'aide d'un microtome à mouvement vertical (MICROM HM 330). Après récupération sur milieu liquide (bain-marie à 40°C), les coupes ont été étalées sur lame de verre préalablement recouverte d'une goutte d'albumine glycinée. Elles ont ensuite été séchées à l'étuve (1 heure à 37°C) avant d'être colorées.

b) Coloration : après déparaffinage au toluène et réhydratation progressive de la coupe tissulaire (bains d'alcools à 100°, 95° et eau), une coloration biochimique à l'Hématéine-éosine a été effectuée. Les coupes ont été plongées pendant 2 minutes dans une solution d'Hématéine de Mayer puis rincées à l'eau courante pendant 5 minutes avant de subir une deuxième coloration dans une solution d'Eosine jaunâtre –Erythrosine aqueuse à 2% pendant 30 secondes. Elles ont enfin rapidement été rincées à l'eau courante puis déshydratées par passage dans des alcools de concentration croissante puis placées dans du toluène. Le montage s'est effectué par l'apposition d'une lamelle sur chaque lame, restant fixée par le dépôt préalable d'une noisette de baume synthétique non miscible à l'eau.

c) Méthodes d'observation et principe de lecture : Les coupes sont observées et prises en photos par un appareil numérique de type *Canon Power Shot A610* adapté à un microscope photonique de type *Zeiss AxioStar plus*, les photos sont par la suite analysées et discutées afin d'en tirer les conclusions de notre étude.

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

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

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

III. Analyse statistiques des résultats

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).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude de l'huile de tournesol oxydée

I. 1. Choix de la méthode dégradative de l'huile

Nous avons retenu comme méthode de dégradation oxydative une insufflation d'air dans de l'huile maintenue à $98 \pm 2^\circ\text{C}$ pour accroître la vitesse du processus naturel d'autoxydation, cette technique est dérivée de celle utilisée dans les testes accélérés d'oxydabilité (AFNOR, 1984; Drozdowski et Szukalska, 1987).

Les principaux avantages de cette technique sont :

- La conduite de l'autoxydation en absence de catalyseur chimique i. e. un initiateur radicalaire dans le milieu réactionnel comme cela est le cas avec des méthodes d'hydroperoxydation chimique à basse température ($\sim 50^\circ\text{C}$) de l'acide linoléique (Yamamoto et *al.*, 1982; Kimura et *al.*, 1984).
- Une durée relativement courte du processus d'oxydation, ramenée à 46 heures. La durée d'oxydation était un paramètre important car notre étude nécessitait le traitement d'un volume suffisant d'huile, pour nourrir les rats pendant la durée de l'essai. Les techniques reproduisant les conditions de fritures avec des cycles de chauffages vers 200°C permettent l'utilisation d'une grande quantité d'huile mais n'aboutissent pas en une teneur élevée en produits d'oxydation; il se forme au maximum 20% d'esters oxydés après quinze cycles de chauffage. De plus ces hautes températures favorisent l'apparition de dérivés cycliques de thermopolymérisation.

I. 2. Formation de mousse stable au cours de la dégradation

Après 15 heures d'oxydation, nous avons observé une mousse stable à la surface de l'huile, cette mousse est différente de la formation des bulles résultant du dégagement des produits volatiles dont la vapeur d'eau.

En 1992, Blanc *et al.*, après oxydation d'une huile de tournesol, pendant 30 heures à 100°C ont obtenu une mousse stable et persistante, le taux en glycérides polaires est de 84.4%. Perrin *et al.*, (1984), ont rapporté que le chauffage continu à 175°C d'une huile avec insufflation d'air s'accompagne d'une mousse fine et persistante liée à l'apparition de glycérides polaires (28%) et de polymères de triglycérides (18%).

Dans notre système, ce phénomène reste modeste; cette particularité est très certainement liée aux conditions opératoires: nous avons agité fréquemment un grand volume d'huile (700 ml) alors que Perrin *et al.*, (1981) agitent un petit volume d'huile (15 ml) et introduisent un tampon de cellulose pour reproduire le processus naturel correspondant à l'apport de l'eau de constitution des aliments.

Dans notre cas, le taux en glycérides polaires a atteint 71.7%, ce qui représente plus du double de ce qui a été retrouvé par Perrin *et al.*, (1985), et un taux avoisinant celui retrouvé par Blanc *et al.*, (1992), nos résultats montrent que cette huile est hautement dégradée (tableau VI).

I. 3. Evolution de l'indice de peroxyde au cours de la dégradation

La mesure de l'indice de peroxyde, méthode iodométrique qui renseigne sur la teneur en hydroperoxydes, produits primaires de l'oxydation (Paquot et Cuvier, 1976), a été réalisé à des intervalles de temps d'environ 4 heures tout au long de l'oxydation (Figure 12).

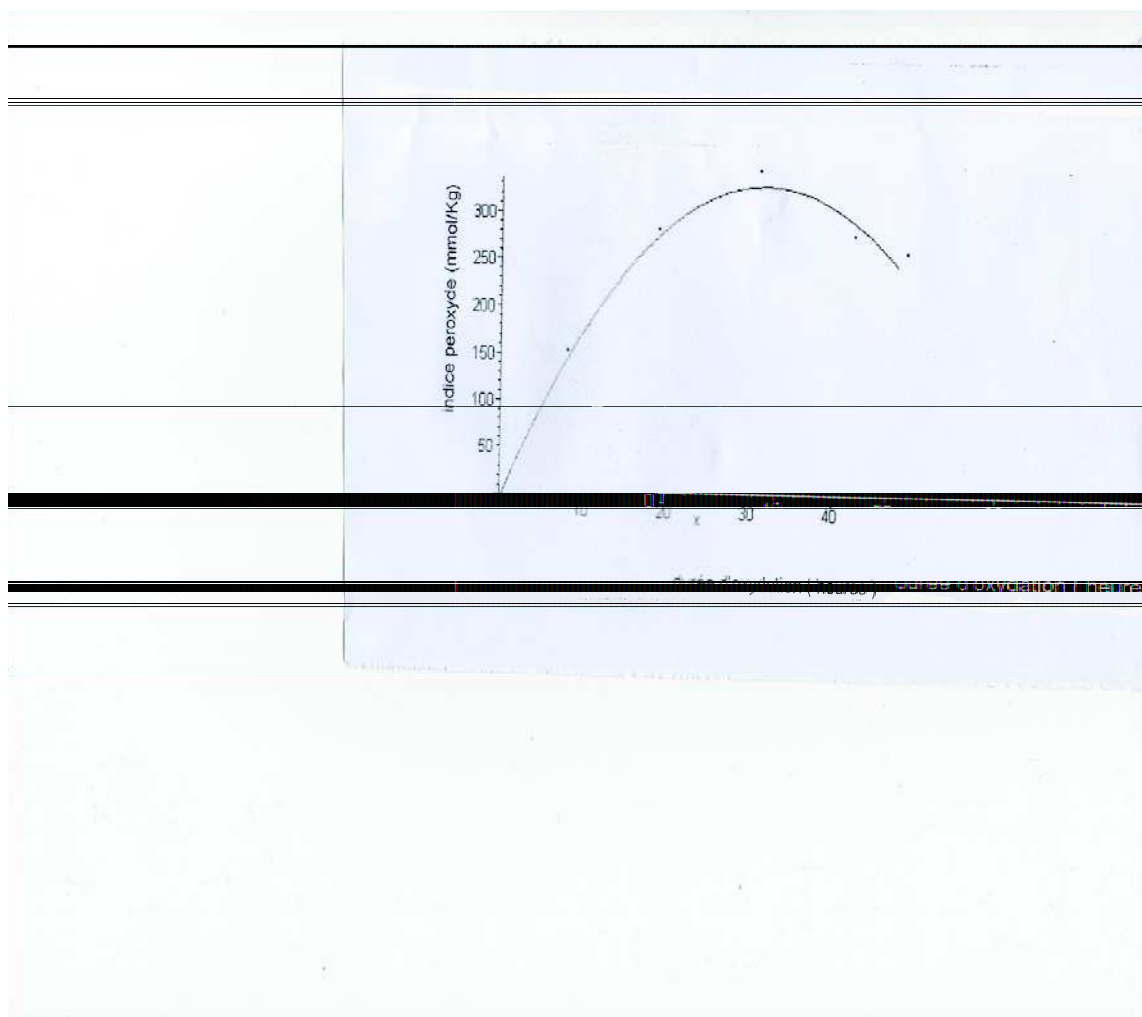


Figure 12. Evolution de l'indice de peroxyde pendant la dégradation oxydative d'une huile de tournesol.

La concentration maximale de peroxydes est atteinte après 30 h avec une valeur de 370 mmol/Kg, cette valeur est égale au triple de celle obtenue par Paquot et Cuvier (1976) après chauffage à 110°C pendant 48h d'une huile de tournesol placée dans un cristalliseur à raison de 1g/cm³. Une étude réalisée par Blanc *et al.*, (1992), a montré que le taux maximal en peroxydes est de 290 mmol/Kg après chauffage d'une huile de tournesol à 98°C pendant 24h, lorsque la peroxydation devient importante, les peroxydes se décomposent en dérivés secondaires et ils disparaissent plus vite qu'ils ne se forment d'où un plateau et une décroissance de la courbe (Figure 12).

Les premiers composés qui se forment au cours de la réaction d'oxydation sont les hydroperoxydes d'où l'augmentation de l'indice de peroxyde (tableau VI), ces hydroperoxydes évoluent ultérieurement lorsqu'ils reçoivent suffisamment d'énergie sous forme de chaleur ou bien s'ils sont en présence de catalyseurs métalliques, il y a alors formation de composés volatiles ou non, présentant très souvent des fonctions oxygénées, ce qui correspond à la diminution de l'indice de peroxyde (Capella, 1989).

Selon Dobarganes et Perez-Comino (1988), la variation de l'indice de peroxyde est sans relation avec la dégradation produite, car dans le cas de l'altération thermo-oxydative, les hydroperoxydes se décomposent plus vite qu'ils ne se forment. En réalité, lors du déroulement de ce processus d'auto-oxydation la formation des hydroperoxydes et leur destruction sont en fait étroitement liées l'une à l'autre, souvent même elles se déroulent simultanément.

I. 4. Estimation de l'état d'altération de l'huile de tournesol

Selon le protocole expérimental les caractéristiques chimiques de l'huile oxydée sont rassemblées dans le tableau VII.

Tableau VII: Caractéristiques chimiques de l'huile de tournesol fraîche et oxydée (les valeurs sont les moyennes de deux déterminations).

Caractéristiques	Huile fraîche	Huile oxydée
Aspect	Liquide, jaune	Plus épaisse, reflet vert clair et mousse, saveur altérée
Indice de peroxyde (mmol/Kg)	1	258
Hydroperoxydes (mmol/Kg) d'après la DO à 232 nm (Diène conjugués)	10	232
Absorbance spécifique E (1% 1 cm)	1	34
Produits secondaires d'après la DO à 268 nm (dicétones éthyléniques)	0.6	2.8
Indice d'iode	130	82
Indice d'acide (mg KOH/g)	0.1	4.2
Triglycérides non modifiés (%)	100	28.3
α - tocophérol ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	2	0

A la surface de notre huile nous avons obtenu une mousse persistante ; il est connu que quand une huile a été utilisée plusieurs fois, on constate la formation de mousse stable : bulles fines et permanentes, s'accumulant à la surface de l'huile. Selon Perrin et *al.*, (1981), elle traduit la présence de triglycérides altérés, qui sont pour une large part des polymères de triglycérides et modifie de façon assez significative diverses caractéristiques physiques, en particulier accroît la viscosité des ces huiles oxydées.

La coloration de notre huile change de plus en plus au fur et à mesure que l'oxydation se prolonge, après une durée d'oxydation de 46 h, sa couleur a viré du jaune clair au vert clair. Selon Weil (1979), la couleur de l'huile varie sensiblement au cours de la friture, ceci peut être expliqué par la présence de produits secondaires d'oxydation susceptibles d'apporter une variation de teinte. En général, la coloration des huiles s'accroît avec l'élévation du nombre de friture. Sous l'influence de la température, les pigments (les caroténoïdes) qui communiquent la couleur à l'huile se dégradent indiquant par là seulement une altération à caractère organoleptique de l'huile.

A la fin de l'oxydation notre huile présente une consistance visqueuse, d'après Vilas (1994), au cours de l'oxydation, la consistance de l'huile devient plus importante, ceci est expliqué par la présence sur les chaînes grasses de fonctions secondaires d'oxydation (alcool, cétones, aldéhydes), ainsi que par la formation des composés à poids moléculaires élevés, élaborés lors du chauffage, l'huile de tournesol serait probablement altérée avec formation de dimères dont le poids moléculaire est largement supérieur à celui de ces constituants.

Une forte odeur traduisant l'altération de huile de tournesol oxydée a été ressentie à la fin de l'oxydation ; Capella (1989) précise lors de son étude sur l'altération des huiles lors des fritures que la réaction de l'oxygène avec les lipides insaturés provoque un rancissement donnant lieu à des odeurs qui rendent les aliments inacceptables, de plus la formation de produits secondaires, constitue un danger potentiel pour la santé de l'homme.

En 1998, Adrian et *al.*, définissent l'acidité comme étant la mesure des acides gras libres, qui nous renseigne principalement sur l'altération des triglycérides, lorsqu'ils se trouvent dans des conditions adéquates. De plus, l'accroissement de l'acidité peut être expliqué par une perte importante en tocophérols lors des opérations de l'oxydation; c'est d'ailleurs, ce qui a été observé lors de la dégradation de l'huile de tournesol, c'est à dire une

augmentation de l'acidité et une baisse de la concentration de l' α T jusqu'à sa disparition. En outre la température affecte l'activité antioxydante. En effet, une forte teneur en tocophérols peut bloquer l'hydrolyse des triglycérides.

Nous avons obtenu un indice d'iode de 82, il est nettement plus bas que celui retrouvé par Blanc *et al.*, (1992), dont la valeur d'indice est de 103 ; dans notre cas les produits secondaires sont moins importants que ceux rapportés par Blanc *al.*, (1989) qui sont de l'ordre de 8.6, ceci peut être dû au fait qu'ils aient été transformés en composés finaux (durée plus longue d'oxydation et qui été de 46 h).

I. 5. Composition en acides gras de l'huile fraîche et oxydée

La composition en A. G. est donnée dans le tableau VIII, il ressort que 56.7% des A. G. ne sont pas altérés, dont 25.52 % et 19.85 % représentent respectivement les acides oléiques et linoléique, conformément aux résultats de Perrin *et al.*, (1985), le 18: 2(n-6) est pratiquement le seul A. G. qui contribue à la formation des esters polaires. La répartition des A. G. habituels avec 16 et 18 atomes de carbone est proche de celle obtenue après une dégradation par des cycles de chauffage à 200°C pendant 100h (Dobarganes et Perez-Camino, 1988), ce qui montre que l'insufflation d'air a profondément accéléré le processus oxydatif. Ces mêmes auteurs, ont obtenu une altération des A. G. identique à la notre, après chauffage à 200°C pendant 100h, les acides oléique et linoléique représentent alors 36 et 44% des esters normaux, l'absorbance spécifique à 323 nm atteint alors la valeur de 40.5. Blanc *et al.*, (1992), ont obtenu après chauffage à 98°C pendant 30h avec insufflation d'air, les valeurs 32 et 42% respectivement pour les acides oléique et linoléique qui sont inférieurs aux nôtres, par contre la valeur de l'absorbance est identique à la notre et qui est de 34.

Tableau VIII : Composition en acides gras des huiles fraîche et oxydée exprimée en pourcentage d'acides gras totaux (les valeurs sont les moyennes de deux déterminations).

Acides gras	Huile fraîche	Huile oxydée
Esters polaires (%)	000.0	43.3
A. G. normaux (%)	100.0	56.7
14 : 0	00.05	Nd
16 : 0	05.62	05.62
18 : 0	03.57	04.32
18 : 1 (n-9)	27.48	25.52
18 : 2 (n-6)	61.56	19.85
18 : 3 (n-3)	00.19	00.25
20 : 0	00.23	00.11
AG non identifiés	01.30	01.03
AGS	09.48	10.05
AGMI	27.48	25.52
AGPI	61.76	20.09

nd : non détecté

I. 6. Etude des produits secondaires d'autoxydation de l'huile oxydée : dérivés polaires

L'huile dégradée pendant 46 h présente une mousse stable en surface, elle contient 71.7% de glycérides polaires et 43.3 % d'esters polaires (tableau IX), ces résultats reflètent une dégradation importante.

A partir de ces données pondérales Perrin et *al.*, (1985), proposent de calculer différents rapports susceptibles de donner des indications intéressantes, notamment sur le degré de polymérisation ou sur la polarité des esters. Le rapport des esters polaires sur les glycérides polaires permet de connaître le nombre des acides gras altérés dans les glycérides polaires, il est égal à 60.9% dans notre cas, il ya donc des glycérides 1 à 2 chaines polaires, car ce rapport prend les valeurs de 33, 66 ou 100, quand, une, deux ou les trois chaines d'A. G. sont polaires par molécules de glycérides polaires, les pontages sont soit inter-moléculaires, entres les différents acides gras des triglycérides, soit intra-moléculaires au sein même d'un triglycéride. Ces résultats laissent penser que l'huile oxydée est profondément altérée.

Tableau IX: teneurs en composés polaires et polymérisés de l'huile oxydée (les valeurs sont les moyennes de deux déterminations).

Caractéristiques globales	
Triglycérides	
• Triglycérides	28.3
• Glycérides polaires	71.7
Esters méthyliques	
• Esters normaux	56.7
• Esters polaires	43.3
Rapports des composés issus de l'oxydation	
• Esters polaires / glycérides polaires	60.90

Plusieurs études, ont été faites sur des huiles oxydées pour la détermination de leurs états de dégradation :

Guillaumin (1973), a oxydé une huile par chauffage à 220°C par cycles répétés quotidiennement pendant 20 jours, condition équivalente à un séjour de 10 à 20 heures à plus de 200°C, il obtient un pourcentage d'esters polaires d'une valeur égale à 10%.

Perrin *et al.*, (1985), dans des conditions de friture réelle, cas où le dégagement de l'eau de constitution des aliments sous forme de vapeur d'eau, abaisse la température vers 150°C, ils obtiennent un pourcentage d'esters de 14%.

Blanc *et al.*, (1992), après avoir oxydé une huile de tournesol pendant 30h à 100°C avec insufflation d'air, ont obtenu une valeur de 41.4% d'esters polaires, 84.4% de glycérides polaires et 33% d'esters polymérisés, ces paramètres reflètent une dégradation étendue due à l'insufflation d'air.

Un décret français du 18 juillet 1986 n°86-857 stipule « les graisses et les huiles dont la teneur en composés polaires est supérieure à 25% sont impropres à la consommation humaine ». Le 22 juin 2005, l'AFSSA avait rappelé qu'une teneur en composés polaires inférieure à 25 % après chauffage était de nature à protéger la sécurité sanitaire du consommateur et que le respect de bonnes pratiques d'utilisation des huiles en friture profonde était de nature à limiter l'apparition de composés chimiques indésirables.

II. Administration de l'huile dégradée à l'animal

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets d'une huile thermooxydée administrée à 5% et de la supplémentation de l' α T, chez des rats de souche Wistar, quatre lots ont été constitués, le premier lot représente le lot témoin à 5 % d'huile fraîche: FSO, le second lot, le lot huile oxydée contenant 5% d'huile oxydée : OSO, le troisième lot à 5% d'huile oxydée et est supplémenté à 600 mg d' α T: OSOE600 et enfin le quatrième lot à 5% d'huile oxydée et est supplémenté à 1200 mg d' α T: OSOE1200. Cette étude s'est focalisée sur les effets de telles ingestions sur l'équilibre antioxydant / prooxydant cardiaque.

II. 1. Modifications physiologiques

II. 1. 1. Effets de l'huile oxydée associée ou non à une supplémentation en vitamine E sur la croissance

Les symptômes classiques d'une carence en AGE, telles les lésions cutanées ou de la queue signalés par Sinclair et Collins (1968), n'ont pas été observés chez les rats traités par l'huile oxydée ou l'huile oxydée et supplémentée en vitamine E; nous observons par contre une réduction de la prise alimentaire, accompagnée de diarrhée chez les lots OSO et OSOE₁₂₀₀ ceci a été observé aussi par Kimura et *al.*, (1984), après administration d'une dose de peroxydes dont l'indice était supérieur à 380, et incorporé au taux de 10%, ils ont obtenu après une semaine de traitement des perturbations digestives, une inappétence et une réduction du poids.

Dans notre étude nous avons observé chez le lot OSO une nette réduction significative de la croissance par rapport au témoin (Fig. 12), elle est de 15 %; Blanc et *al.*, (1992), ont eux obtenu une réduction de croissance allant de 20 à 23% chez des rats nourris pendant 1 mois avec un régime contenant 4% d'huile de tournesol oxydée pendant 30 h à 98°C; d'autres auteurs, en particulier Vilas et *al.*, (1976) ont obtenu une réduction du poids corporel de rats nourris pendant 14 semaines avec une huile de maïs oxydée ; Lopez Valeras et *al.* (1994) ont obtenu également une réduction de croissance après ingestion pendant 4 semaines d'une huile de tournesol oxydée pendant 10 h à 180°C.

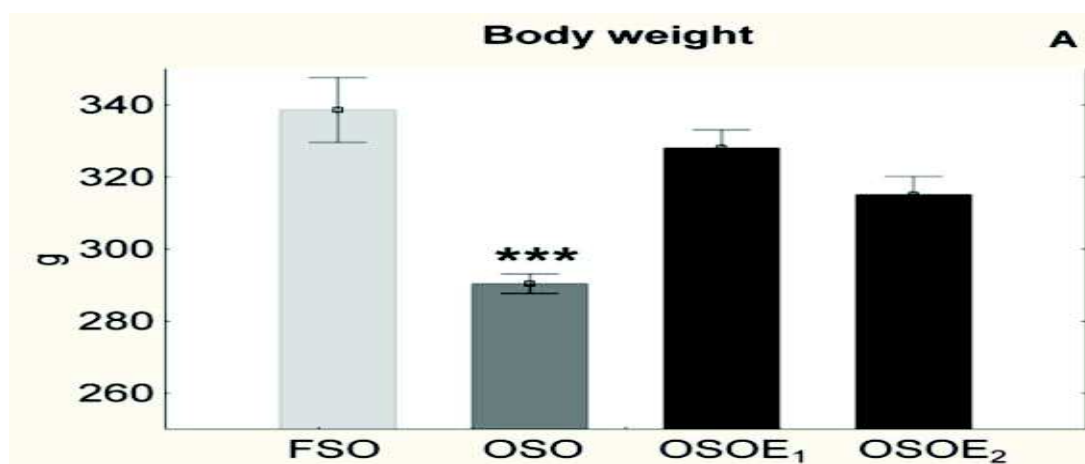


Figure 12. Effets de la supplémentation de l' α -T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le poids corporel chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre témoin et groupe traités).

La réduction de croissance observée après ingestion d'une huile oxydée résulte d'une toxicité induite par la présence de dérivés oxygénés et d'un apport lipidique moindre du fait de la dégradation de l'acide linoléique au cours de l'oxydation de l'huile. Selon Vilas *et al.* (1976), le ralentissement de croissance est dû à l'ingestion des esters oxydés. En 1985, Nielsen *et al.* rapportent, que la plupart des acides aminés réagissent avec les produits primaires et secondaires des lipides oxydés ceci diminue l'utilisation digestive des protéines, des acides aminés et des graisses, ce qui induit une baisse de croissance.

Nous signalons que dans notre étude, il y a eu tolérance partielle de l'organisme vis-à-vis de ces dérivés. Toutefois, Blanc *et al.* (1992), ont observé, un effet létal d'une huile de tournesol oxydée quand elle est incorporée à un taux de 12% et ceci après quelques jours seulement de traitement.

Pour le lot OSOE₆₀₀, nous avons obtenu une augmentation non significative du poids corporel par rapport au lot OSO (Fig. 13). L'administration de 600 mg d' α T/kg d'aliment prévient la perte de poids protégeant les organes contre les dommages causés par les radicaux libres et les produits réactifs des LPO. En outre, l' α T inhibe la peroxydation des lipides membranaires et captant les radicaux peroxy lipidiques et il est par conséquent converti en radical α -tocophéroxyl (Garrido-Polonio *et al.*, 2004).

Une étude réalisée en 1995 par Liu *et al.* a montré des résultats contradictoires aux nôtres, en effet ces auteurs ont obtenu une légère diminution non significative du poids corporel chez des rats mâles Long Evans soumis pendant 6 semaines à un régime contenant 15% d'huile de soja oxydée et supplémentée avec 500 mg d' α T et ceci par rapport au témoin (15% d'huile de soja fraîche), ils déduisent que la supplémentation de 500 mg d' α T d'une huile oxydée, dans ce cas l'huile de soja n'affecte pas la croissance corporelle.

Aucune amélioration dans la croissance du poids corporel du lot OSOE₁₂₀₀ n'a été obtenue lors de la supplémentation avec 1200 mg α T/kg d'aliment et ceci par rapport au lot OSOE₆₀₀, au contraire nous avons obtenu une baisse de la croissance même si celle-ci n'est pas significative (Fig. 13).

En effet, McCuaig et Motzok (1970) ont constaté que 10,000 IU α T/kg d'aliment n'ont pas affecté la croissance de poussins. Une autre étude menée par March et *al.* (1975), a montré que le taux de croissance a été manifestement réduit chez des poussins dont le régime alimentaire est supplémenté en 2,200 IU de vitamine E/kg pendant 50 jours. Yang et Desai (1977), ont également montré que le traitement de rats pendant 8 mois avec des doses importantes en vitamine E (2.500, 10.000 et 25.000 IU d' α T/kg d'aliment) induisait une baisse significative de la croissance, et que cette baisse est également retrouvée après 16 mois de traitement.

Il est à noter que nos résultats viennent également corroborer ceux de Kiron et *al.* (2004), qui ont confirmé lors de leur étude qu'aucune différence du poids corporel n'a été obtenue chez des poissons alimentés avec des régimes supplémentés avec 1500 mg α T/kg d'aliment.

II. 1. 2. Effets de l'huile oxydée associée ou non à une supplémentation en vitamine E sur la variation du poids du tissu cardiaque

Concernant la variation du poids du tissu cardiaque lors des différents traitements, le groupe OSO, montre une baisse non significative du poids du tissu cardiaque. La réduction du poids des organes, incluant celle du cœur, a été observée chez des rats nourris avec un régime contenant de l'huile de palme oxydée (Dawson et *al.*, 1992). Cette diminution du poids du tissu cardiaque persiste après une supplémentation en α T et demeure non significative comparée au lot témoin.

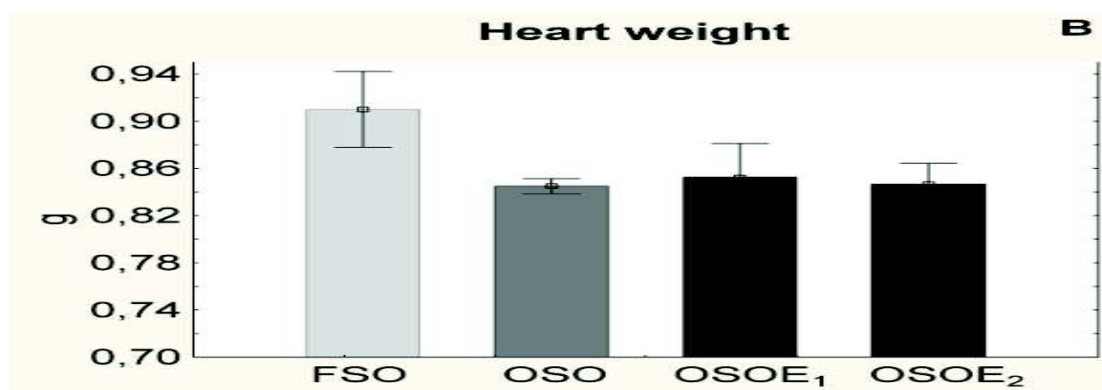


Figure 13. Effets de la supplémentation de l' α T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée au niveau du cœur (B) chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01, p <0.001 entre témoin et groupe traités).

En 2008, Leong et *al.*, on montré que chez des rats Spargue Dawley pesant 200 à 270 g et soumis à un régime alimentaire contenant 15% d'une huile de palm ayant subi un nombre de friture respectives de 5 et 10 (lots HPO 5 et HPO 10), ils notent une diminution significative du poids du tissu cardiaque chez les lots 5 HPO et 10 HPO comparé au lot témoin.

Une étude réalisée en 2010 par Nascimento et *al.*, avait pour objectif l'effet d'une dose pharmacologique d' α T sur le tissu cardiaque de rats Wistar adultes. Cette étude a montrée que l'administration d'une quantité de 250 mg/Kg de rat/jour d' α T sur une période de 7 semaines induisait la diminution du poids du tissu cardiaque comparé à celui du témoin.

Yang et Desai (1977), ont également montré que le traitement de rats pendant 8 mois avec des doses importantes en vitamine E (2.500, 10.000 et 25.000 IU d' α T/kg d'aliment) induisait une baisse du poids du tissu cardiaque, ils expliquent cette baisse par la perte de poids corporel des rats.

III. Effets des différents régimes sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation au niveau du tissu cardiaque

III. 1. Effets d'un régime à 5% d'huile de tournesol oxydée sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation

Le lot de rats nourri à 5% d'une huile oxydée (OSO), présente des variations du taux en MDA, de la teneur en α T Fig. 14 (A et B) et de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx, GRD et G6PDH), par rapport au lot témoin (FSO) Fig. 15 (A à E). Il est vrai que (09) neuf semaines de traitement, nous ont permis d'obtenir une augmentation significative du taux en MDA accompagnée d'une diminution significative de l' α T, parallèlement nous avons noté une diminution significative des activités de la GPx et de la CAT tandis que l'activité de la SOD diminue mais d'une manière non significative, la GR subit la même variation que celle subie par la GPx mais d'une manière non significative, du fait de son implication dans un système métabolique commun, par contre la G6PDH diminue d'une manière significative.

De nombreuses études ont été réalisées à l'échelle expérimentale pour montrer les effets d'une huile oxydée sur des paramètres structuraux et fonctionnels chez l'animal, celles-ci ont pu mettre en évidence l'altération de la balance prooxydante/antioxydante: du taux en MDA, de la teneur en α T et de l'activité des principales enzymes antioxydantes. De ces études nous avons cité quelques unes : A

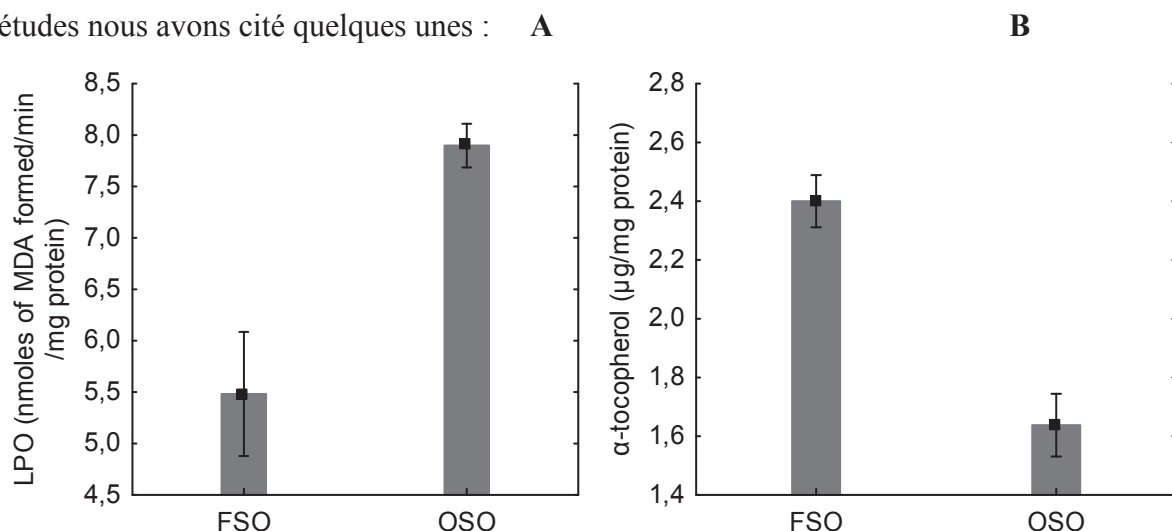


Figure 14. (A à B). Effets d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le taux en LPO et la teneur en α T dans le cœur de rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 entre témoin et OS

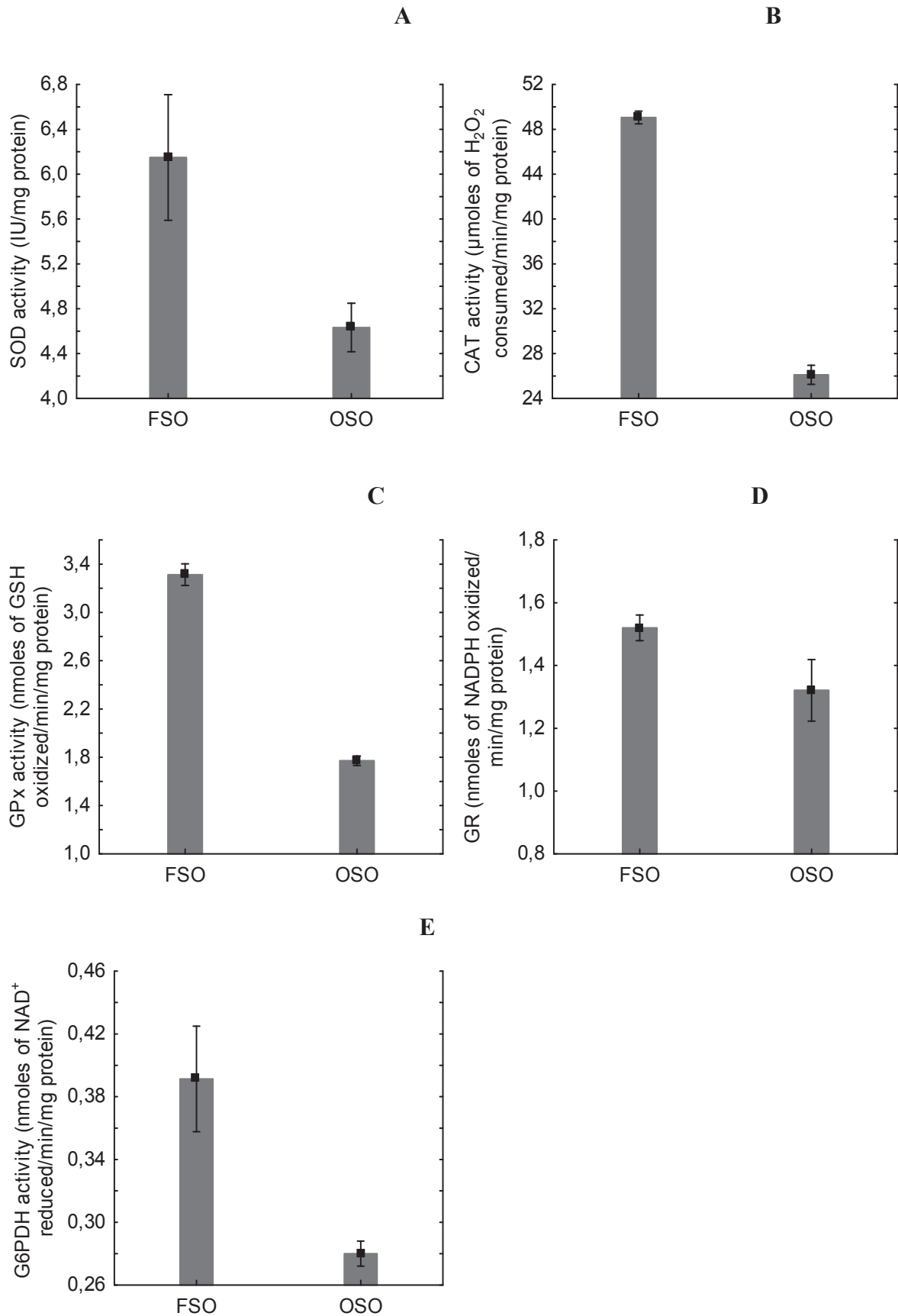


Figure 15. (A à E). Effets d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le système enzymatique antioxydant (SOD, CAT, GPx, GR et G6PDH) du cœur chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ entre témoin et OSO).

Dès 1985, Giani *et al.* ont montré qu'un effet toxique sur les icosanoïdes vasculaires était obtenu après ingestion pendant 8 semaines d'une huile fortement oxydée au taux de 10% dans l'alimentation; en 1988, Alexander *et al.*, avaient réalisé une étude qui avait pour objectif l'administration pendant 4 semaines d'une huile de Canola oxydée à 180°C pendant 72 heures à des rats Wistar au taux de 15%, ces auteurs ont obtenu une diminution de la GPx et de la G6PDH, ces résultats concordent aux nôtres mais contradictoires par rapport à l'activité de la CAT, vu qu'ils ont obtenu une activité accrue de celle-ci, ils en déduisent que l'activité de la CAT est plus importante que celle de la GPx pour le contrôle du niveau des peroxydes dans le foie.

En 1992, Blanc *et al.*, réalisaient une étude sur des rats de souche wistar nourris avec un régime contenant 4% d'une huile oxydée par insufflation d'air pendant 32 heures à 100°C et ceci pendant quatre semaines, l'ingestion de cette huile n'a pas induit de perturbation de la peroxydation lipidique tissulaire, ils expliquent ce résultat par le fait que son administration au taux de 4% dans les aliments est relativement bien supportée, en effet, ils n'observent pas de manifestation aiguë de l'intoxication ; ils précisent qu'il faut l'incorporer à raison de 12% dans l'alimentation pour provoquer la mort de l'animal en 7-8 jours pour un rat de six semaines (150g) et en 3-4 jours pour un rat âgé de 3 semaines (60g), dans ce cas, l'animal ne mange plus et présente de la diarrhée, il perd du poids et dépérit.

L'administration d'AG oxydés est réputée pour accroître la peroxydation lipidique dans les tissus mesurée par l'acide thiobarbiturique mais cette induction dépend de la structure chimique des esters oxydés, de la quantité ingérée et de la voie d'administration. Ainsi Kok *et al.* (1988) n'observent pas d'accroissement du MDA dans le foie après administration pendant quatre semaines d'une huile oxydée pendant 72 heures à 180°C, incorporée au taux de 15% dans l'alimentation chez les rats. De même chez la souris, Oarada *et al.*, (1988) n'obtiennent pas de modification chimique dans le foie, après l'ingestion pendant un mois d'une huile oxydée (au taux de 0.6%) dont l'indice de peroxyde égale 3 meq / kg, cette quantité étant équivalente à 540 mg d'hydroperoxydes du linoléate par kg de poids corporel (souris) et par jour. Après une seule intubation gastrique de 270 mg d'hydroperoxydes chez la souris, ces mêmes auteurs observent que la concentration en produits réactifs à l'acide thiobarbiturique est doublée dans le foie et triplée dans le sérum, 24 h après l'intubation.

Différentes équipes de chercheurs japonais ont obtenu des résultats similaires chez le rat : l'ingestion pendant 13 semaines de 15% d'huile oxydée induit le doublement de la concentration hépatiques en MDA, alors que le niveau de peroxydation demeure stable dans le sérum (Izaki *et al.*, 1984). De façon analogue, 36 heures après l'intubation de 100 mg d'hydroperoxydes ou de 700 mg de dérivés secondaires de l'autoxydation, la peroxydation lipidique est fortement accrue dans le foie du rat (Kanasawa *et al.*, 1985). Par contre, après 3 intubations gastriques quotidiennes d'une huile époxydée avec un indice de peroxyde égale à 380, Kimura *et al.*, (1984), n'observent pas de variations significatives de la concentration en MDA du sérum. Par contre Ammouche *et al.* (2002), ont obtenu après une étude menée sur des rats Wistar nourris d'un régime contenant 5% d'une huile de tournesol oxydée pendant 48 heures sous insufflation d'air, une augmentation du taux en MDA dans le foie et le cerveau, ils confirment par ces résultats l'effet toxique réel de cette huile oxydée.

D'autres études plus récentes montrant l'effet du stress oxydatif induit par d'autres composants autre que l'huile oxydée sont à citer :

Le Polychlorinate Biphényle (PCB), également connu sous le nom de l'Aroclor 1254, polluant environnemental retrouvé dans la chaîne alimentaire, déjà étudié par Brown *et al.* en 1987, ces derniers ont montré qu'une fois dans l'organisme, il sera transporté par le sang dans différents organes à savoir le foie, le muscle et le tissu adipeux ou il sera accumulé dans celui-ci du fait de sa nature lipophile. Le PCB est connu comme étant un médiateur de ROS, donc inducteur du stress oxydatif. Plusieurs études ont montré qu'il affecte le système enzymatique de protection contre la peroxydation lipidique. Nous citerons quatre études pour montrer ses effets en tant qu'inducteur de stress oxydatif ainsi que son action sur les enzymes antioxydantes: dans l'ensemble de ces études le PCB a été administré par voie intrapéritonéale à une dose de 2 mg/kg poids corporel/jour et ceci pendant 30 jours à des rats de souche Wistar adulte de 3 mois:

La première étude réalisée en 2004 par Senthil kumar *et al.*, sur des cellules de Sertoli, les résultats obtenus ont montré une augmentation significative des LPO, et une diminution significative de la SOD, de la GPx, de la CAT et de la GR.

En 2007, trois études ont été réalisées, l'une portant sur le fémur (Ramajayam *et al.*), la seconde sur le sperme (Krishnamorthy *et al.*), et la troisième sur différentes régions du cerveau (Sridevi *et al.*), toutes trois ont montré une augmentation significative des LPO, les

études menées par Ramajayam *et al.* et Krishnammorthy *et al.* quand a elles ont montrées une diminution significative de la SOD et de la GPx ; Krishnammorthy *et al.*, ont également dosé la CAT, la GR ainsi que l' α T, les résultats ont montré une baisse significative de l'ensemble des ces paramètres.

L'ensemble de ces auteurs expliquent l'augmentation des LPO par le fait que le PCB induit la production d'espèces réactives de l'oxygène qui initient et propagent l'oxydation lipidique en attaquant les membranes cellulaires ; la diminution de l'activité de l'ensemble des enzymes antioxydantes dosées est expliquée par une réduction de synthèse ou une dégradation de ces enzymes due à la présence excessives de ROS.

En effet en 2009, une étude réalisée par Bharrhan *et al.* montre que le lipopolysaccharide (LPS) provenant d'*E. coli* (serotype 0111:B4) induit un stress oxydatif chez des rats de type Wistar, ils obtiennent une augmentation significative du MDA accompagnée d'une diminution significative des activités de la CAT et de la SOD par rapport au témoin. Ils expliquent ces résultats par le fait que les LPS peuvent causés des dommages aux niveaux des membranes à savoir la fluidité et la perméabilité et augmentent également la vitesse de dégradation des protéines.

En 2011, El-Gendy réalisa une étude montrant l'effet de l'aluminium chez des rats males de type albinos. Son étude a été réalisée sur quatre organes à savoir, le foie, le cerveau, le rein et le testicule. Il obtint une élévation de la peroxydation lipidique au niveau des quatre organes étudiés, qui est traduite par l'augmentation de la production en MDA. Ceci suggérât la participation des radicaux libres induisant une oxydation cellulaire provoquée par la toxicité de l' Al_3^+ . Selon Stevanovic *et al.* (2008), le mécanisme d'action de l' Al_3^+ induit des changements provoquant des réarrangements lipidiques, les lipides membranaires peuvent être attaqués et ainsi facilité la propagation de la peroxydation lipidique touchant à l'intégrité de la membrane, diminuant sa fluidité, détruisant les récepteurs et les canaux ioniques et aboutissant finalement à la mort cellulaire. El-Gendy (2011), obtint également une diminution significative de la SOD dans le foie, le testicule et le rein et une diminution non significative dans le cerveau, il a été reporté que l' Al_3^+ altéré les caractéristiques physiologiques et biochimiques des systèmes biologiques. Des expérimentations animales et des études *in vitro* ont révélés des effets sur l'expression de la SOD induit probablement par la fragilité de la membrane (Abubakar *et al.*, 2003).

En 2012, El-mahder et *al.*, réalisent une étude afin d'évaluer le potentiel d'une hépatotoxicité et l'effet oxydant du Khat (*Catha edulis*), les résultats ont montré une augmentation significative du MDA au niveau du sérum, du foie et du rein de rats males de type albinos traités par le Khat et ceci par rapport au témoin. Ils expliquent ces résultats par le fait que quelques constituants du Khat (spécialement les alcaloïdes) peuvent être convertis en des métabolites prooxydants, ou induisent la diminution de la synthèse/activité du système antioxydant (Al-Hashem et *al.*, 2011). En plus le Khat peut augmenter l'activité de l'acétyl coenzyme A oxydase, induisant l'augmentation des LPO (Novikova et Zlotnikova, 2011).

Les résultats obtenus lors de la présente étude viennent corroborer l'ensemble des résultats obtenus par les auteurs cités, nous avons montré que l'huile oxydée avait réellement un effet toxique confirmé par l'augmentation du taux en MDA dans le tissu cardiaque accompagné par la baisse du système de protection antioxydant. L'augmentation significative du MDA accompagnée de la diminution significative des enzymes intervenants dans la détoxification des lipoperoxydes (LPO) notamment de la GPx et la CAT, a été décrite dès 1966 par Roubal et Tappel, 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° aux protéines préférentiellement au niveau du –OH des tyrosines, du –SH des cystéines et des méthionines, du –NH₃⁺ des lysines, du –NH des histidines, des tryptophanes et des arginines. Selon Pre (1991), les thioenzymes sont très sensibles à l'inactivation radicalaire par formation d'un radical thiyl (RS°) 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.* (1988), 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). D'ailleurs Deisseroth et Dounce (1970) et De Groot et *al.* (1985) 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.

III. 2. Effets de la supplémentation en alpha-tocophérol à un taux de 600 mg/kg d'aliment dans un régime contenant 5% d'huile oxydée sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation

Après avoir montré que l'huile de tournesol thermooxydée avait un réel effet oxydant, et qu'au taux de 5%, elle avait induit une augmentation de la teneur en MDA et une diminution de l'ensemble des paramètres antioxydants (enzymes antioxydantes et α T) chez des rats en croissance, nous nous sommes intéressés à supplémenter ce régime en 600 mg d' α T/kg, afin d'observer l'effet d'une telle supplémentation sur les paramètres antioxydants. Les résultats que nous avons obtenus ont montré des variations du taux en MDA, de la teneur en α T et de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx, CAT, GRD et la G6PDH), par rapport au lot OSO. Ces variations montrent une diminution du taux en MDA accompagnée d'une augmentation de la teneur en α T (Fig. 16.A et B), il est à signaler que ces deux paramètres ont évolué d'une manière non significative. Nous avons également obtenu, une augmentation significative des activités de la GPx et de la CAT tandis que l'activité de la SOD augmente mais d'une manière non significative, la GR subit la même variation que celle subit par la GPx mais d'une manière non significative, par contre la G6PDH augmente d'une manière non significative (Fig.17. A à E).

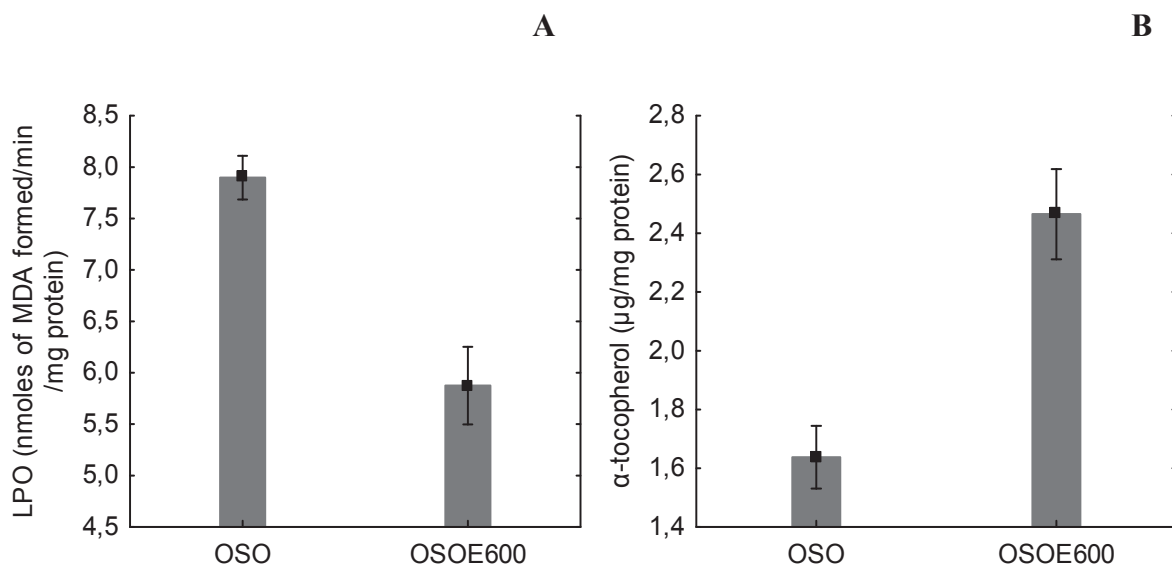


Figure 16. (A à B). Effets de la supplémentation de l' α T (600 mg·kg⁻¹) dans un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur la teneur en α T et du taux en LPO dans le cœur de rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre OSO et O

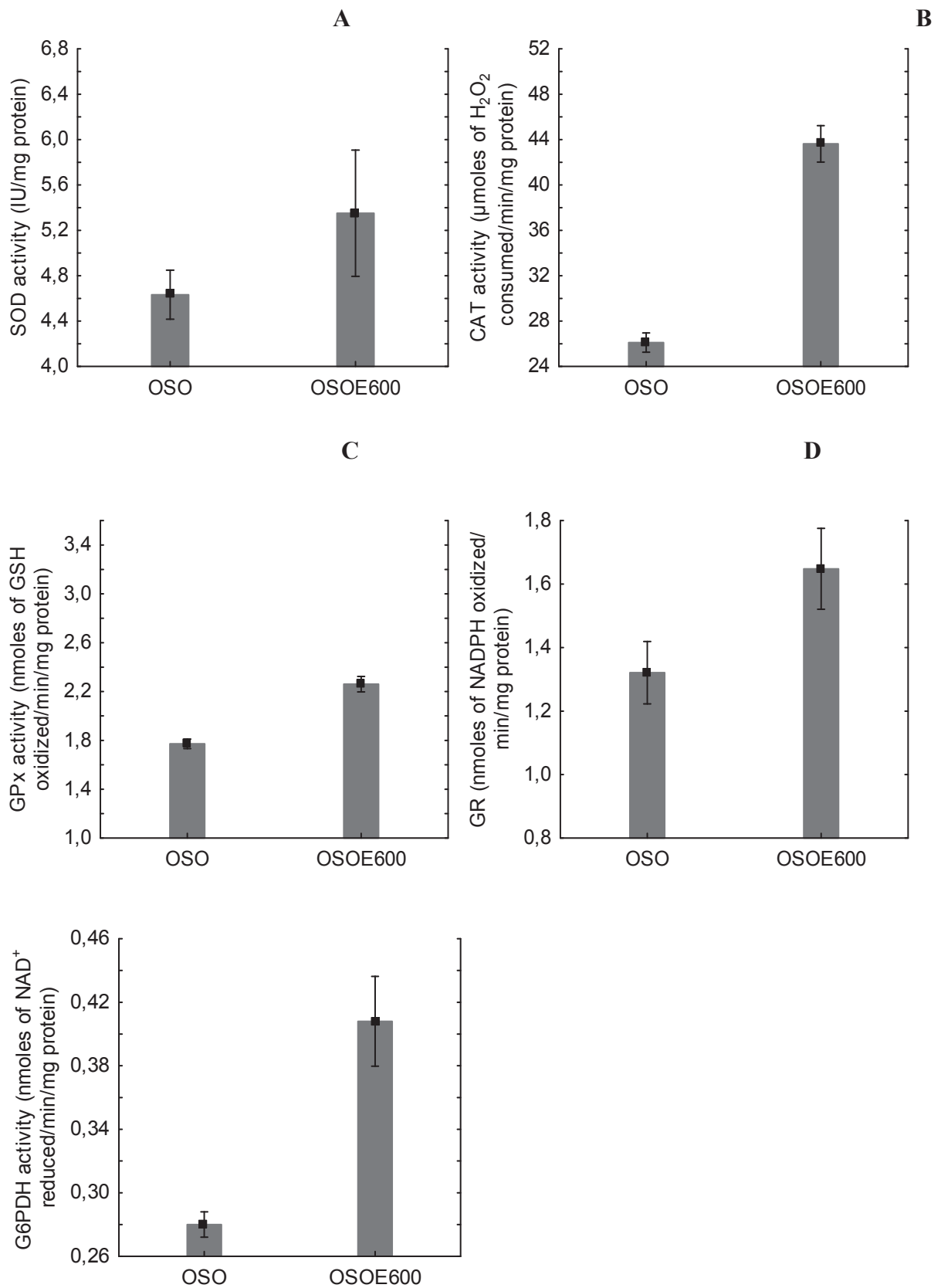


Figure 17. (A à E). Effets de la supplémentation de l' α T (600 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le système enzymatique antioxydant (SOD, Cat, GPx, GR et G6PDH) du cœur chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 entre OSO et OSOE₆₀₀).

De nombreuses études se sont intéressées à la variation du taux en MDA et de la teneur en α T lors d'un stress oxydatif causé par de l'huile oxydée ou tout autres inducteurs; il est vrai que dans notre étude nous avons obtenu une augmentation de la teneur en α T, précisons que celle-ci est non significative et une diminution du taux en MDA également non significative et ceci par rapport au lot OSO. Cette diminution est due au fait que la vitamine E protège *in vivo* les structures sensibles à l'oxydation: les lipides dans les membranes et les lipoprotéines, les protéines et les bases nucléotidiques des brins d'ADN.

En 1977, Csallany *et al.*, ont étudié l'effet protecteur de la vitamine E lors d'un stress oxydatif, ils ont observé qu'après 8 semaines de régime carencé en vitamine E, le taux en lipofuscine hépatique est significativement plus élevé chez les témoins que chez les lots supplémentés en vitamine E, ils ont déduit que cette vitamine a un rôle protecteur vis-à-vis des radicaux libres.

De nombreuses recherches se sont succédées après celle de Csallany *et al.*, (1977), prouvant à chaque fois que la vitamine E a un effet protecteur vis-à-vis des radicaux libres, c'est ainsi que Izaki *et al.* en 1984, ont obtenu après administration pendant 13 semaines au taux de 15% d'une huile de colza oxydée en friture pendant 88 heures, une consommation du tocophérol, chez des rats qui reçoivent un apport quotidien de cette vitamine à 540 mg/ kg d'aliments, la concentration passe de 34 à 8 μ g/g dans le foie et de 7 à 3 μ g/g dans le sérum. Une année plus tard, en 1985, Giani *et al.*, administrent à des rats pendant 8 semaines une huile fortement oxydée au taux de 10% dans l'alimentation, ils obtiennent une variation des icosanoïdes vasculaires, l'apport de l' α T est de 120 mg/ kg d'aliments; quand l'apport de cette vitamine est de 300 mg/ kg d'aliment, l'effet toxique observé sur les icosanoïdes est réduit, signifiant un effet protecteur du tocophérol.

En 1988, Niki *et al.* ont étudié les phénomènes d'oxydation des érythrocytes et ont mis en évidence que lors de l'attaque radicalaire, l' α T positionné au niveau de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire agissait majoritairement sur ces molécules réactives.

C'est ainsi qu'en 1990, les résultats de Benedett *et al.* viennent corroborer les résultats obtenus par l'ensemble des auteurs précédents; ayant réalisé eux-mêmes une étude sur des rats Sprague Dawley, nourris d'une huile de soja oxydée à 180°C pendant 48 heures en présence

d'air, incorporée au taux de 15% sur une durée de 16 jours, ils ont montré une légère augmentation de TBA-RS et une réduction de la vitamine E.

En 1996, plusieurs études se sont succédées pour montrer encore une fois l'effet protecteur de l' α T lors d'un stress oxydatif ou montrer l'impact de son importance lors d'une carence de celle-ci, c'est ainsi que l'étude menée par Wagner (1996) *in vivo* a montré qu'en présence d'un stress oxydatif puissant, le taux d'oxydation de lipide cellulaire a été ralenti par la vitamine E.

A la suite de l'ingestion d'une huile de soja oxydée à 205°C pendant 24 heures à des rats Long-Evans au taux de 15 % et pendant 9 semaines, une diminution significative de la concentration en α T hépatique, accompagnée d'une baisse du taux en TBA-RS a été observée, les auteurs de cette étude en déduisent que le tocophérol est piègeur de radicaux libres (Liu et *al.*, 1996). De même Barja et *al.* (1996), ont observé que chez des cobayes nourris d'un régime dont le taux en vitamine E était faible et ceci pendant 5 semaines, induisait une élévation significative en LPO hépatiques, par contre une teneur optimale en vitamine E permettait une diminution considérable en TBA-RS.

Un nombre important d'études ont montré qu'il existait un lien entre activités enzymatiques antioxydantes et concentration en α T:

Deux études espacées de 25 années, l'une menée en 1974 par Bray et *al.*, et la seconde en 1999 par Fujii et *al.*, ont toutes deux montré qu'en piégeant les ROS libres, la vitamine E augmente la capacité antioxydante totale et peut théoriquement en régler l'activité de la SOD et d'autres enzymes antioxydantes, et déduisent que les ROS sont des inhibiteurs puissants de ces enzymes antioxydantes. D'ailleurs Sharma et *al.* (1999), ont énoncé que l'élévation des radicaux libres peut être due à une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx), qui sont les enzymes protégeant les tissus de la peroxydation lipidique, mais qu'en présence de la vitamine E en une concentration adéquate, celle-ci permettait la prévention de la production de radicaux libres et donc protéger ces enzymes antioxydantes.

D'autres auteurs comme Golestani et *al.* (2006), ont montré que la vitamine E augmente l'activité de la SOD (aussi bien que l'activité d'autres enzymes antioxydants), donc,

il est possible que l'activité de la SOD (et l'activité d'autres enzymes d'antioxydant) ait tendance à augmenter quand les ROS sont piégés par la Vitamine E.

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

De même Buttner en 1993, avait déjà énoncé que la vitamine E régule les enzymes antioxydantes par un effet chimique direct. Il explique ceci par le fait que d'une part la vitamine E est liposoluble et existe seulement dans les membranes (plasmique et celles des organites); les enzymes antioxydantes, d'autre part résident dans la phase aqueuse de la cellule. L'interaction prouvée *in vitro* entre la vitamine C et la vitamine E est un phénomène semblable d'interaction entre deux molécules, l'une dans la phase lipidique et l'autre dans la phase aqueuse. Au niveau de la membrane cellulaire, le groupement phénolique OH de l' α T au niveau de l'interface membrane-eau réagit ainsi avec des molécules hydrosolubles comme l'ascorbate.

Plusieurs études s'intéressant à l'effet antioxydant de la vitamine E lors d'un stress oxydatif ont été réalisées, ses études ont utilisé des composés autre que l'huile oxydée, nous en citerons trois (03), l'une réalisée en 2009 et les deux autres en 2011; elles utilisaient comme inducteur de stress oxydatif respectivement les lipopolysaccharides (LPS) provenant d'*E. coli* (serotype 0111:B4), de l'aluminium et de l'Aroclor 1254:

C'est en 2010, que Bharrhan et *al.* étudiaient les effets oxydants de lipopolysaccharides (LPS) provenant d'*E. coli* (serotype 0111:B4), et antioxydant de la vitamine E chez des rats Wistar, ils ont montré que le lot ayant subi un stress oxydatif et supplémenté en vitamine E voit une baisse significative du taux en MDA et une augmentation significatives des activités antioxydantes de la CAT et de la SOD. Ces auteurs précisent que la vitamine E est utilisée pour prévenir les dommages oxydatifs en interrompant la propagation

de l'oxydation des AGPI. L'effet de la vitamine E peut être expliqué par son effet direct en tant que piègeur de radicaux libres (Di Mascio et *al.*, 1990 ; Packer et Landvik, 1990 ; Sakamoto et *al.*, 1990).

L'effet de l'aluminium combiné à un antioxydant (la vitamine E) a fait l'objet d'une étude chez des rats males de type albinos, réalisée sur quatre organes à savoir, le foie, le cerveau, le rein et le testicule. Les résultats obtenus ont montré une diminution de la peroxydation lipidique au niveau des quatre organes étudiés traduite par la diminution significative du MDA et ceci par rapport au lot traité par l' Al^{3+} et une augmentation significative de la SOD dans le foie, le testicule et le rein et non signification dans le cerveau, il confirma que la vitamine E joue un rôle important en tant qu'antioxydant, elle protège les tissus des dommages causés par les ROS (El-Gendy, 2011)..

L'étude menée par Dogan et Erisir en 2011, avait pour objectif d'analyser l'équilibre oxydant / antioxydant dans plusieurs tissus à savoir le tissu cardiaque de jeunes rats dont les mères ont été exposées pendant la gestation à l'Aroclor 1254 seul ou associé à la vitamine E. Au total, 15 femelles Sprague-Dawley gestantes ont été réparties en 3 groupes égaux en fonction du traitement instauré pendant la période de gestation de 20 jours – injections sous-cutanées quotidiennes d'Aroclor 1254 (2 mg/kg/jour) utilisé seul ou associé à la vitamine E (50 mg/kg/jour) ou bien de sérum physiologique chez les contrôles – puis elles ont été laissées avec leur progéniture pendant 4 semaines. L'exposition à l'Aroclor 1254 pendant la gestation a induit des altérations des différents systèmes antioxydants d'une manière significatives : augmentation de l'activité de la CAT au niveau du cœur par contre ils observent que l'activité de la GPx diminue. Dans le cas d'un co-traitement par la vitamine E, les systèmes antioxydants des jeunes rats ont été globalement restaurés et la teneur en MDA a nettement diminué. Ces résultats montrent que, chez le rat, l'exposition des femelles gestantes à l'Aroclor 1254 a induit des lésions oxydatives chez les descendants mais qu'un traitement adjuvant par la vitamine E réduit au moins partiellement les lésions biochimiques induites.

L'ensemble des études citées viennent corroborer nos résultats, en effet dans la présente étude nous avons observé une augmentation non significative de l' αT parallèlement à une diminution non significative du taux en MDA 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 αT est de 600 mg/kg d'aliments pour le groupe OSO600, cette valeur est excédentaire par

rapport au minimum conseillé qui est de 50 à 60 mg/ kg d'aliments pour le rat (Oarada et *al.*, 1988). Selon Bowry et Stocker (1993), la vitamine E doit son effet biologique à sa fonction comme antioxydant liposoluble, prenant en charge la majorité des radicaux libres. L' α T est biologiquement et chimiquement la forme la plus active de la vitamine E.

Lors du mécanisme de protection contre la peroxydation lipidique, l' α T est oxydé sous une forme régénérable, la forme radicalaire chromane-6-oxyle alpha-TO*, par les espèces moléculaires oxydées préalablement formées, par exemple les radicaux acylperoxyse. Ce qui fait l'une des particularités importantes de la vitamine E, c'est la nature physiologiquement régénérable de alpha-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 alpha-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) (Stoyanovsky et *al.*, 1995).

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 (Bourre, 1996).

III. 3. Effets de la supplémentation en alpha-tocophérol à un taux de 1200 mg/kg d'aliment dans un régime contenant 5% d'huile oxydée sur le système enzymatique et non enzymatique de protection contre la lipoperoxydation

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 : (OSOE₁₂₀₀), montre une augmentation significative du taux en LPO (Fig. 18. A), une diminution significative de la teneur en α T (Fig. 18. B), de la CAT et de la GPx (Fig. 20. B et C) et une diminution non significative du reste des enzymes antioxydantes à sa savoir la SOD, la GR et la G6PDH (Fig. 19. A, D et E) par rapport au lot OSOE600. 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 cardiaque chez le rat en croissance.

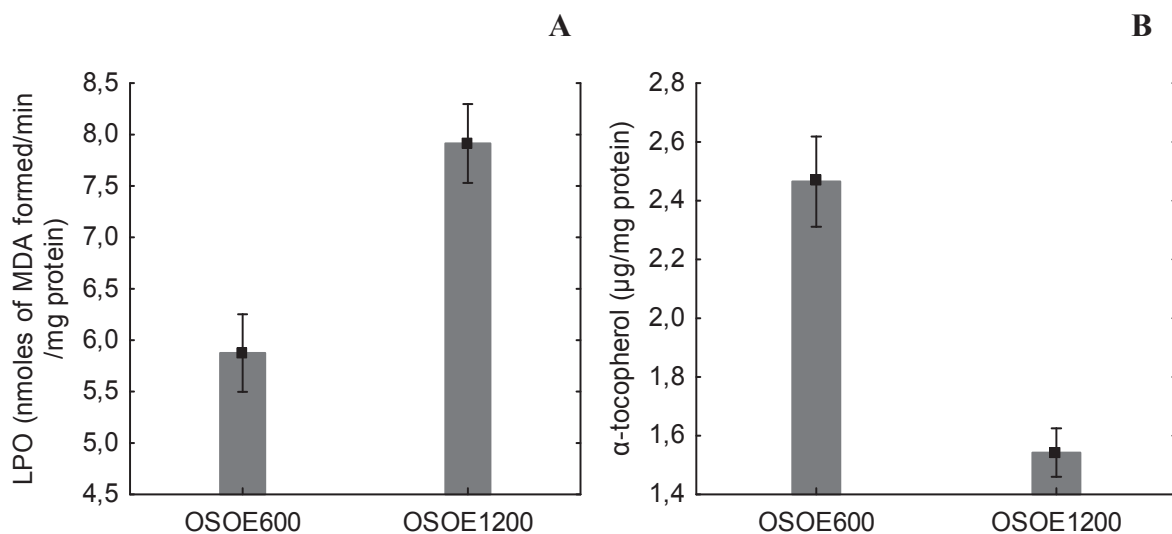


Figure 18. (A et B). Effets de la supplémentation de l' α T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur la teneur en α T et du taux en LPO dans le cœur de rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 entre OSOE₆₀₀ et OSOE₁₂₀₀).

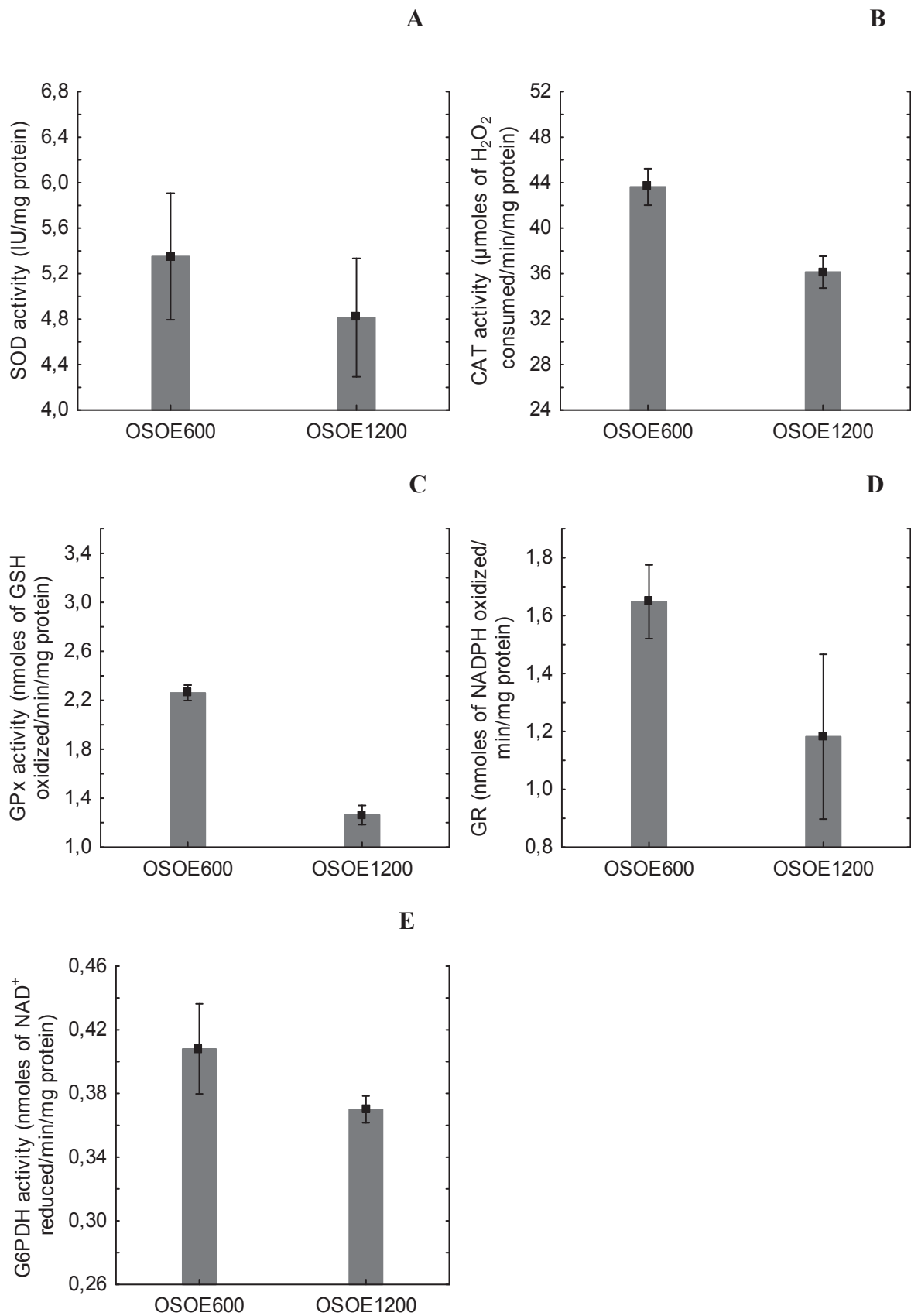


Figure 19. (A à E). Effets de la supplémentation de l' α T (600 et 1200 mg·kg⁻¹) d'un régime contenant 5 % d'huile oxydée sur le système enzymatique antioxydant (SOD, Cat, GPx, GR et G6PDH) du cœur chez des rats en croissance. Chaque barre représente la moyenne \pm SE (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 entre OSOE₆₀₀ et OSOE₁₂₀₀).

Avant de discuter de l'effet prooxydant *in vivo* de l' α T, il serait intéressant de retracer quelques-unes des nombreuses études effectuées *in vitro*, nous en citerons les plus importantes notamment celles réalisées par Bowry et Kontush:

Plusieurs études menées par Bowry se sont succédées pour montrer l'effet prooxydant de la vitamine E *in vitro*; Il a d'ailleurs cité et en collaboration avec d'autres auteurs (Ingold et Stocker) dans sa première étude réalisée en 1992, sur des LDL isolées de plasma humain enrichis en α T et soumis à l'azo : un initiateur d'hydroperoxydes : le 2,2'-azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH) et le 2,2'-azobis-(2,4 dimethylisovaleronitrile) (AMVN), que l' α T avait la capacité d'agir comme prooxydant et d'augmenter la peroxydation des lipides *in vitro*. C'est en 1993, qu'une autre étude menée par Bowry et Stocker toujours *in vitro* et sur le même type d'échantillon vient définir la théorie de « l' α T médiateur de peroxydation », il est vrai que dans cette étude, ces auteurs montrent clairement que l' α T donne le radical tocophéroxyl et que si ce dernier n'était pas réduit il devenait prooxydant. Ces auteurs se trouvent étonnés de découvrir que sous des conditions d'oxydations modérées l' α T accélère la peroxydation des LDL. Ils ont constaté que la peroxydation induite par un composé : l'azo hydrosoluble était plus rapide en présence d'un complément d' α T endogène des LDL, suivit de la consommation de cet α T. De plus, l'augmentation de la concentration de l' α T dans les LDL a augmenté le taux de la peroxydation lipidique. Ils ont présenté des arguments cinétiques et ont le soutien expérimental que cette activité prooxydant d' α T est causée par la réaction du radical de l' α T avec les groupements de LH actifs des LDL.

Enfin, Bowry et *al.* (1995) ont montré que pour prévenir l'oxydation des lipoprotéines *in vivo*, il est essentiel que l'ensemble des radicaux tocophéroxyl soient réduits par des composants qui les rendront incapables de poursuivre la chaîne de peroxydation. Dans des conditions normales ceci semblerait être réalisé par deux antioxydants endogènes, c'est-à-dire la vitamine C (dans le plasma) et CoQ10H2 (dans LDL), qui empêchent l'oxydation de LDL et ceci par deux mécanismes tout à fait distincts.

Il est important de citer l'étude de Buettner (1993), réalisée deux années avant celle de Bowry et *al.* (1995), et qui étudiait l'effet prooxydant de l' α T, il explique que chaque molécule d' α T peut faire don de deux électrons pour rompre la chaîne d'oxydation et pour être un antioxydant efficace, chaque tocopherol oxydé doit être recyclé, il déclare qu'aucun système d'enzyme capable de réduire ce radical oxydé n'a été décrit. Il suggère que c'est

l'acide ascorbique qui recycle le tocopherol *via* la production du radical d'ascorbate. Le seul problème qu'il avait émis à l'époque est que la vitamine E est liposoluble et existe seulement dans les membranes (plasmique et celles des organites); l'acide ascorbique, d'autre part, réside dans la phase aqueuse de la cellule. Comment se fait donc cette interaction entre ces deux molécules ? Il faut savoir qu'au niveau de la membrane cellulaire, le groupement phénolique OH de l' α T se trouvant au niveau de l'interface membrane-eau réagit facilement avec des molécules hydrosolubles comme l'ascorbate. La même année Stoyanovsky et *al.*, confirment les hypothèses de Buettner et Bowry, ils énoncent que l'une des particularités importantes de la vitamine E, est la nature physiologiquement régénérable de son radical alpha-tocophéroxyl. 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, qui, une fois oxydée par suite de la régénération de alpha-tocophéroxyl, 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).

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

Les quelques études réalisées *in vivo*, viennent confirmer les résultats obtenus lors des nombreuses études faites *in vitro* :

Dans notre étude, nous avons obtenu une diminution significative de l' α T, celle-ci peut être expliquée soit par son intervention dans le mécanisme antioxydant, soit par son élimination au niveau des urines, car il est vrai selon Schultz et *al.* (1995) que la diminution significative de l' α T peut être également expliquée par le 2,5,7,8-tetraméthyl-2(29-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (α -CEHC), qui est un autre métabolite de l' α T. Son excrétion augmente quand le niveau de l' α T excède le niveau normal du plasma, la structure intacte du noyau chromane de ce métabolite indique que l' α -CEHC dérive de l' α T, qui n'a pas réagi en tant qu'antioxydant. Ainsi, l'excrétion de l' α -CEHC peut être un indicateur de la supplémentation inadéquate ou excessive de l' α T. Il a d'ailleurs été rapporté dès les années 1950, que deux métabolites majeurs de l' α T, l'acide tocophéronique et le tocophéronolactone (appelés Simon métabolites), ont été manifestement augmentés dans l'urine de volontaires sains après une consommation quotidienne de 2 à 3 g d' α T, suggérant ainsi que ces sujets aient été soumis à un stress oxydatif.

Nos résultats se joignent à 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. De même Blasiak et *al.*, (2002), ont obtenu une augmentation des dommages au niveau de l'ADN de cultures cellulaires, attribués à l' α T, suite à des agressions générant des ROS.

Tout comme dans notre cas d'autres auteurs comme Kiron et *al.* (2004) ayant travaillé sur les érythrocytes ont obtenu une augmentation significative en LPO. Effectivement, lors de la supplémentation d'un régime équilibré avec 1000 mg α T/kg et administré à des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*); ces auteurs 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.

En 2007, Fu et *al.* ont étudié l'effet de la vitamine E sur les activités enzymatiques antioxydantes (CAT, SOD et GPx) de l'ormeau *Haliotis discus hannai*. Trois groupes d'ormeaux sont constitués et alimentés d'un régime contenant respectivement 0, 50 et 5,000-mg de vitamine E/kg d'aliment. L'ormeau a été échantillonné le 120^{ème} jour et le 240^{ème} jour, respectivement. Il n'y avait aucune différence significative des activités de CAT et de la SOD mais l'activité significativement plus élevée de la GPX a été retrouvée chez le lot nourri avec un régime supplémenté avec 5,000 mg de vitamine E/kg. Les activités de CAT et GPX ont été significativement élevées en présence de la vitamine E au bout de 240^{ème} jour. La vitamine E (5,000 mg/kg) n'a pas servi comme antioxydant, mais apparaît plutôt comme un prooxydant. Même si l'effet prooxydant a été retrouvé, ces résultats ne corroborent pas nos résultats et ce plusieurs raisons l'espèce animale utilisée, la durée du traitement qui était trop longue ainsi que la quantité importante de la vitamine E supplémentée dans le régime:

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

l'expression génique des enzymes antioxydantes ou leurs activités en se basant sur la suggestion faite par Huang et *al.*, (1999) et Liu et *al.*, (2003) et qui est que : la vitamine E peut augmenter l'effet de la SOD respectivement au niveau des cellules du muscle lisse aortique et des plaquettes. L'étude réalisée par Huang et *al.*, (1999) a porté sur l'évaluation de l'effet de l' α T sur le changement d'activité de la SOD dans des cultures cellulaires du muscle lisse aortique (A7r5) après court terme (2 jours) et long terme (7 jours) d'incubation. L'incubation des cellules A7r5 avec une concentration de 50 μ mol/l pendant 2 jours induit une augmentation et de l'activité et du niveau d'ARNm de la SOD. A forte concentration, 100 ou 200 μ mol/l après incubation pendant 7 jours, la vitamine E induit une diminution de l'activité et du niveau d'ARNm de la SOD. Les résultats obtenus suggèrent que la vitamine E peut augmenter l'effet de la SOD pour aboutir à l'influence avantageuse de cet antioxydant seulement à une concentration basse d' α T à court terme.

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 arracher 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.* (1996), 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.

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.

III. 4. Effets de la supplémentation en vitamine E aux taux de 600 et 1200 mg/kg d'aliment à un régime contenant 5% d'huile oxydée au niveau des cellules cardiaques

Concernant le groupe FSO, les coupes histologiques montrent une architecture normale des cellules cardiaques (Fig 20. a), par contre le groupe OSO révèle une vaste dégénérescence des myofibrilles, qui est relaté par une infiltration et d'œdèmes interstitiels (Fig 21. b) correspondant à des zones nécrosées, suggérant l'effet toxique de l'huile de tournesol oxydée causant ainsi des dommages importants au niveau du cœur. Le principal site des dommages des radicaux libres dans les cellules cardiaques sont les mitochondries; en effet, selon Singal et *al.*, (1983) l'attaque extensive des radicaux libres contribue aux dommages de l'ADN dans les mitochondries qui ne peuvent plus fonctionner d'une manière normale ce qui induit la mort cellulaire.

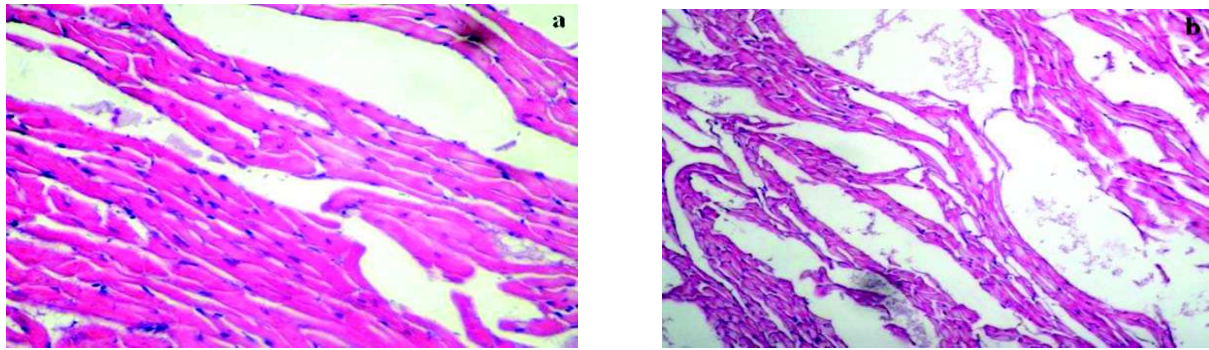


Figure 20 (a et b). Micrographie du cœur de rat (10×, *H&E*) montrant: (a) architecture normal chez le lot “huile fraîche” : SO, (b) œdème myocardique chez le lot “huile oxydée” : OSO. N: noyau, M: muscle cardiaque, Nc: cellules nécrotiques, Oe: œdèmes.

Il apparait 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) (Pre,1991).

Cependant, les coupes histologiques obtenues du cœur d'animaux alimentés avec 5% d’huile oxydée et supplémentée avec 600 mg d’ α T / kg d’aliment : OSOE600 ont conservé leur histologie normale, montrant une structure normale de myofibrilles et une continuité des myofibrilles adjacents (Fig 21. c) et suggérant les propriétés non-toxiques d'huile oxydée si une dose modérée d' α T est incorporée dans le régime. Il a été montré dans cette étude 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.* (2007), 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 (Stampfer et *al.*, 1993; Nwanguma et *al.*, 1998).

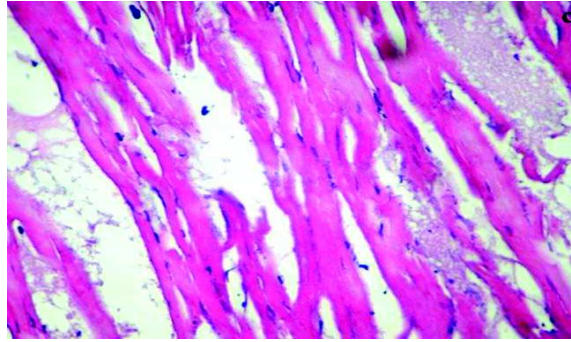


Figure 21 c. Micrographie du cœur de rat (10×, *H&E*) du lot “huile oxydée E600” : OSOE₆₀₀, montrant l’absence d’œdème myocardique. N: noyau, Nc: cellules nécrotiques.

En revanche, la supplémentation avec 1200 mg d’ α T / kg d’aliment contenant 5% d’huile oxydée : lot OSOE1200 induit un changement morphologique plus sévère que l’huile oxydée seul groupe OSO, elle a causé un changement morphologique cellulaire, avec présence de larges zones nécrosées, œdèmes interstitiels et nucléaires (Fig 22. d).

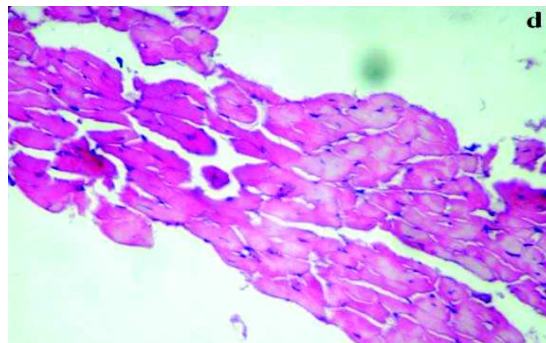


Figure 22 d. Micrographie du cœur de rat (10×, *H&E*) du lot “huile oxydée E1200” : OSOE₁₂₀₀, montrant la présence d’œdème myocardique.

En 2010, Nascimento et *al.*, ont réalisé une étude qui avait pour objectif l’effet d’une dose pharmacologique d’ α T sur le tissu cardiaque de rats Wistar adultes. Deux groupes expérimentaux de rats ont été constitués, un groupe témoin et un autre qui recevait par gavage 250 mg d’ α T /kg de poids de rat/jour pour des rats dont le poids variait de 350 à 400 g, soit environ une quantité d’ α T variant de 87.5 à 1000 mg/rat/jour et ceci sur une période de 7 semaines. Les coupes histologiques ont montré aucun changement pathologique chez le lot témoin par contre pour le lot supplémenté en α T des dommages cellulaires importants sont apparents et montrant une désorganisation morphologique des myocytes ainsi que la présence d’œdèmes. Ces auteurs déduisent qu’une telle dose d’ α T induit une cardiotoxicité chez les rats

wistar sains traduite par des changements au niveau du tissu cardiaque accompagnés de nécrose des cardiomyocytes. Ils rapportent également que les effets néfastes obtenus dans cette étude sont dues à des doses non physiologiques d' α T.

La fonction antioxydante de la vitamine E dépend de plusieurs facteurs, à savoir les conditions de stress (modérées ou fortes) et la présence de co-antioxydants. Il est connu que l'augmentation de la concentration en α T aboutit à l'augmentation des radicaux α -tocopheroxyl, qui peuvent amorcer la cascade de peroxydation des lipides (Upson et *al.*, 1999).

Quand le système antioxydant est équilibré, cette action prooxydante de l' α -tocopheroxyl est inhibée par les co-antioxydants. Cependant, les concentrations élevées d' α T surproduisent des radicaux α -tocopheroxyl, qui ne peuvent plus être efficacement désintoxiqués par les co-antioxydants (Stocker, 1999). C'est ce mécanisme cité par Stocker qui a été observé dans la présente étude, d'où une toxicité plus importante chez le groupe OSOE₁₂₀₀ que chez le groupe OSO.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans la présente étude, notre travail consiste à évaluer d'une part l'impact de l'huile thermooxydée sur les principales enzymes impliquées dans la protection contre la peroxydation lipidique et d'autre part d'évaluer son effet délétère sur le tissu cardiaque, et de voir également l'effet de la supplémentation de deux doses d' α T (600 et 1200 mg/kg d'aliment) dans le même régime (contenant 5% de cette huile) et ceci sur les mêmes paramètres. Au terme de cette étude, il ressort très clairement que :

Sur le plan technologique : la dégradation oxydative des acides gras de l'huile est très étendue, car en effet l'huile oxydée contient 232 mmol d'hydroperoxydes par kg, 43.3 % d'esters polaires et 71.7% de glycérides polaires. L'accroissement de l'acidité peut être expliqué par une perte importante en tocophérols lors des opérations d'oxydation; c'est d'ailleurs, ce qui a été observée lors de la dégradation de l'huile de tournesol, c'est à dire une augmentation de l'acidité et une baisse de la concentration de l' α T jusqu'à sa disparition. Nous avons obtenu un indice d'iode de 82, il est nettement plus bas que celui retrouvé par Blanc *et al.*, (1992), dont la valeur d'indice est de 103. Dans notre cas les produits secondaires sont moins importants que ceux rapportés par Blanc *al.*, (1989) qui sont de l'ordre de 8.6, ceci peut être du au fait qu'ils aient été transformés en composés finaux (durée plus longue d'oxydation : 46 h).

Sur le plan de la croissance : une réduction de croissance des rats à été observée après ingestion de l'huile oxydée, ceci résulte d'une toxicité induite par la présence de dérivés oxygénés et d'un apport lipidique moindre du fait de la dégradation de l'acide linoléique au cours de l'oxydation de l'huile. Concernant le lot OSOE₆₀₀, nous avons obtenu une augmentation non significative du poids corporel par rapport au lot OSO. L'administration de 600 mg d' α T/kg d'aliment prévient la perte de poids protégeant les organes contre les dommages causés par les radicaux libres et les produits réactifs des LPO contenu dans l'huile oxydée. Pour le lot OSOE₁₂₀₀, nous avons obtenue une baisse non significative du poids corporel des rats et ceci par rapport au lot OSO₆₀₀, la supplémentation de ce régime (contenant 5% d'une huile oxydée) avec 1200mg d' α T n'a ni affecté ni amélioré le poids de l'animal.

Sur le plan métabolique et cellulaire : les résultats montrent une augmentation significative du taux en MDA chez le lot OSO, parallèlement à une diminution du taux en α T ainsi qu'une diminution de l'activation des enzymes antioxydantes, et une altération de la structure membranaire des cellules cardiaques. Ces résultats indiquent la sévérité de l'action de l'huile oxydée qui a induit des dommages nécrotiques au niveau du cœur.

La supplémentation avec 600 mg d' α T a induit l'augmentation significative de l'activité de la GPx et de la CAT ainsi que celle de la teneur d' α T mais de manière non significative et une diminution non significative des LPO, démontrant ainsi la stabilisation du stress au niveau cœur quand il y a administration d'une concentration modérée en l' α T. Les coupes histologiques cardiaques obtenues chez l'animal nourri avec un régime témoin et un régime « huile oxydée E600 » garde un état normal, montrant une structure des myofibrilles normale et ayant une continuité avec les myofibrilles adjacentes. Ces résultats suggèrent des propriétés non toxiques de l'huile oxydée quand elle est incorporée avec une dose modérée en α T dans l'aliment.

D'autre part, nous avons obtenu chez le lot « huile oxydée E 1200 » une augmentation significative des LPO et une diminution significative de la GPx et de la CAT. Une dose importante d' α T sur une longue période augmente la teneur en LPO et diminue l'activité des enzymes antioxydantes (Hajiani et *al.*, 2008). Il est connu que lors de l'oxydation l' α T est transformé en radical tocophéroxyl, si ce dernier n'est pas éliminé, il y a augmentation des LPO, processus connu sous le nom de « tocophérol médiateur de peroxydation ». Concernant les coupes histologiques cardiaques, celles ci montrent un changement morphologique plus sévère que celui du lot « huile oxydée », ces modifications touchent le noyau et la morphologie cellulaire.

Toutefois, les interactions métaboliques entre les enzymes de protection contre la peroxydation lipidique et la vitamine E sont encore obscures, certains parlent d'effet direct d'autres d'effet indirect. Néanmoins nos résultats que ce soit ceux portant sur l'effet des huiles oxydées ou ceux portant sur la supplémentation des régimes en α T rejoignent les études faites par de nombreux auteurs portant sur les huiles oxydées, et la supplémentation en α T du point de vue, aspects chimiques de la dégradation thermooxydative de l'huile ou de des effets nutritionnels.

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

- plusieurs doses croissantes (entre 600 et 1200 mg) d' α T doivent être testées afin de déterminer la dose précise ou l'effet antioxydant de l' α T devient prooxydant,
- il serait intéressant de voir si l'effet prooxydant de l' α T peut être retrouvé au niveau d'autres organes,
- des marqueurs d'oxydation plus précis devraient être dosés (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl, oxygène singulet, ...),
- il serait également très intéressant d'étudier les effets d'une telle supplémentation sur l'ADN.

Ces nouvelles approches permettront d'améliorer les connaissances sur les risques du stress oxydant dans les mécanismes de mort cellulaire au cours des maladies neurodégénératives déjà évoquée depuis plusieurs années.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abubakar, M.G.A., Taylor, A., Ferns, G.A. (2003). The effects of aluminium and selenium supplementation on brain and liver antioxidant status in the rat. **Afri. J. Biothec.** **3 (1)**: 88-93.
- Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A., Dauvillier, P. (1998). Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. pp 254.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymol.** **105**: 121 – 126.
- AFSSA. (2010). Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. [<http://www.anses.fr/Documents/NUT2006sa0359.pdf>].
- Agellon, L.B., Toth, M.J., Thomson, A.B. (2002). "Intracellular lipid binding proteins of the small intestine." **Mol Cell Biochem** **239(1-2)**: 79-82.
- Alexander, J.C., Kok, T.S., Harris, P.G. (1988). Dietary protein level and oxidative stress in the livers of rats fed heated canola oil. **Nutr. Res.** **8**: 673-684.
- Al-Hashem, F.H., Bin-Jaliah, I., Dallak, M.A., Nwoye, L.O., Al-Khateeb, M., Sakr, H.F., Eid, R.A., Al-Gelban, K.S., Al-Amri, H.S., Adly, M.A. (2011). Khat (*Catha edulis*) extract increases oxidative stress parameters and impairs renal and hepatic functions in rats. **Bahrain. Med. Bull.** **33**: 32-36.
- Al-Mahdar, A.A., El-Denshary, E.S., Abdel-Wahhab., M.A. (2012). Alpha lipoic acid and alpha-tocopherol counteract the oxidative stress and liver damage in rats sub-chronically treated with Khat (*Catha edulis*) extra. **Global Journal of Pharmacology.** **6 (2)**: 94-105.
- Altan, O., Pabuccuoglu, A., Altan, A., Konyalioglu, S., Bayraktar, H. (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. **British Poultry Science.** **44**:545-550.
- Ammouche, A., Rouaki, F., Bitam, A., Bellal, M.M. (2002). Effect of ingestion of thermally oxidized sunflower oil on the fatty acid composition and antioxidant enzymes of rat liver and brain in development. **Ann. Nut. Metab.** **46 (6)**: 268-275.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry.** **70**: 246-264.
- Armand, M., Borel, P., Dubois, C., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Lafont, H., Lairon, D. (1994). "Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach." **Am J Physiol** **266(3 Pt 1)**: G372-81.
- Association française de normalization. (1984). Test accéléré d'oxydabilité, T60-219. In Recueil de norms françaises: corps gras, grains oléagineuses, produits dérivés, Paris, AFNOR. 157-163.
- Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.** **109**: 33-44.

- Barja, G., Cadena, S., Rojas, C., Perez-Compo, Lopez-Torres, M., Prat, J., Pamplona, R. (1996). Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxidation in guinea pig liver. **Lipids**. **3**: 963-970.
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. **Med. Sci.** **22**: 266-272.
- Beaman, L., Beaman, B. L. (1984). The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. **Ann. Rev. Microbiol.** **38**: 27-48.
- Béani, J.C. (1995). Actions biologiques du rayonnement solaires sur la peau. **Rev. Int. Pédiatrie**, **259bis** : 2-7
- Beaudeau, J. L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. Oxidative stress in the atherosclerotic process. **Immuno-analyse & Biologie spécialisée**. **21**: 144-150.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1999). Endogenous oxidative damage of mtDNA. **Mutat Res.** **424** : 51-8.
- Belaich, S., Marck, Y. (1997). Les dermatoses allergiques professionnelles. **Rev. Fr. Allergol.** **37 bis**: 943-946.
- Benedetti, P.C. Di Felice, M. Gentili, V. Tagliamonte, B. Tomassi, G. (1990). Influence of Dietary Thermally Oxidized Soybean Oil on the Oxidative Status of Rats of Different Ages. **Ann Nutr Metab.****34**:221–231.
- Bergmeyer, H.U. (1963). *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 744 – 751 and 875 – 879, Academic Press, New York.
- Berliner, J.A., Hzincke, J.W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Rad. Biol. Med.** **20**: 707-727.
- Beutler, E. (1984). *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*, 3rd ed., pp. 105 – 106.
- Bharrhan, S., Chopra, K., Rishi, P. (2010). Vitamin E supplementation modulates endotoxin-induced liver damage in a rat model. **Am J Biomed Sci.** **2 (1)**: 51– 62.
- Blanc, P., Revol, A., Pacheco, H. (1992). Chronical ingestion of oxidised oil in the rat: Effect on lipid composition and on cytidyl transferase activity in various tissues. **Nutr Res.** **12**: 833-844.
- Blasiak, J., Gloc, E., Wozniak, K., Mlynarski, W., Stolarska, M., Skorski, T. and Majsterek, I. (2002). Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine. **Chem. Biol. Interact.** **140**: 1 – 18.
- Bloomer, R.J., Fisher-Wellman, K.H. (2008). Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. **Gender Medicine.** **5(3)**:218-28.

- Bohr, V.A., Stevnsen, T., De Souza-Pinto, N.C. (2002). Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. **Gene** **286** : 127-134.
- Bourgeois, C. (2003). Les vitamines dans les industries agroalimentaires. **Editions TEC & DOC**. 708 p.
- Bourre, J.M. (1996). Developpement du cerveau et acides gras polyinsaturés. **OCL**. **3** : 173-178.
- Bowry, V.M., Iqbal, S., Stocker, R. (1992) Vitamin E in human low-density lipoprotein. When and how this antioxidant becomes a prooxidant. **Biochem. J.** **288**: 341 – 344.
- Bowry, V.W., 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.
- Bowry, V.W., Mohr, D., Cleary, J. and Stocker, R. (1995). Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.** **270**: 5756 – 5763.
- Bray, R.C, Cockle, S.A., Fielden, E.M., Roberts, P.B., Rotilio, G., Calabrese, L. (1974). Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. **Biochem J.** **139**: 43–48.
- Brown, J.F, Bedard, Jr., Brennan, D.L., Carnahan, M.J., Feng, J.C., Wagner, H. (1987). Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. **Science**. **236**: 709–712.
- Browne, R.W., Bloom, M.S., Schisterman, E.F., Hovey, K., Trevisan, M., Wu, C., Liu, A., Wactawski-Wende, J. (2008). Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. **Biomarkers**. **13(2)**:160-83.
- Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch Biochem Biophys**. **300**: 535–543.
- Burdge, G. C., Calder, P.C.(2005). "Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults." **Reprod Nutr Dev** **45(5)**: 581-97.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals DNA base damage. **Mutat. Res.** **424**: 9-21.
- Campagne, F. (2000). <http://www.caducee.net/Fiches-techniques/vitamines E>.
- Capella, P. (1989). Les produits de l'évolution des hydroperoxydes. **Rev. Fr. Corps Gras**. **36** : 313-323.
- Carriere, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M.C., Penicaud, L., Casteilla, L. (2006). Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. **Med. Sci.** **22**. 47-53.

- Carriere, F., Barrowman, J.A., Verger, R., Laugier. (1993). "Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans." **Gastroenterology** **105(3)**: 876- 88.
- Chan, A.C., Chow, C.K., Chiu, D. (1999). Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proc Soc Exp Biol Med.** **222**: 274-82.
- Chaves, CR., Elias, P.R., Cheng, W., Zaltman, C., Iglesias, A.C., Braulio, V.B. (2003). "Long chain fatty acid uptake by human intestinal mucosa in vitro: mechanisms of transport." **Digestion** **67(1-2)**: 32-6.
- Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. **Am. J. Clin. Nutr.** **71**: 621- 629.
- Clarkson, P.M. Thompson, H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition.** **72(2)**:637-646.
- Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B. (1998). DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. **Free Radical Biol. Med.** **25**: 373-377.
- Comhair, S.A., Erzurum, S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant mediated lung diseases. **Am. J. Physiol.** **283**: L 246- L 255.
- Csallany, A.S., Ayaz, K.L., Su, L. C. (1977). Effect of dietary vitamin E and aging on tissue lipofuscin pigment concentration in mice. **J. Nutr.** **107**: 1792-1799.
- Daugherty, A., Dunn, J.L., Rateri, D.L., Heinecke, J.W. (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **J. Clin. Invest.** **94**: 437-444.
- Dawson, E.B., Harris, W.A., Teter, M.C. and Powell, L.C. (1992) Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. **Fertil. Steril.** **58**: 1034 – 1039.
- De Groot, H., Noll, T., Tolle, T. (1985). Loss of latent activity of liver microsomal membrane enzymes evoked by lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta.** **815**: 91-96.
- Deisseroth, A., Dounce, A. (1970). Catalase: physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. **Physiol. Rev.** **50**: 319-375.
- Delattre, J., Bonnefont-Rousselot, D., Bordas-Fonfrede, M., Jaudon, M.C. (1999). Diabète sucré et stress oxydant. **Ann. Biol. Clin.** **57**: 437-444.
- Delattre, J., Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Espèces réactives de l’oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier, 2005 : 281-309.
- Desai, J.D. (1984) Vitamin E analysis method for animal tissues. **Methods in Enzymol.** **105** : 138 – 147.

- Di Mascio, P., Devasagayam, T.P., Kaiser, S., Sies, H. (1990). Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem Soc Trans.** **18**: 1054–1056.
- Di Silvestro, R.A. (2000). Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. **J Nutr.** **130**: 1509S-1511S.
- Dickens, B., Mak, I., Weiglicki, W. (1988). Lysosomal lipolytic enzymes, lipid peroxidation and injury. **Mol. Cell. Biochem.** **82**: 119-123.
- Dobarganes, M. C., Perez-Camino, (1988). Fatty acid composition : a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Rev. Fr. Corps Gras.** **2** : 67-70.
- Dogan, A., Erisir, M. (2011). Alterations of the oxidant / antioxidant equilibrium in liver, brain, kidney and heart tissues of offspring born from pregnant rats exposed to Aroclor 1254 alone or in combination with vitamin E. **Revue Med. Vet.** **162**: 364-370.
- Dorge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** **82**: 47-95.
- Draper, H. H., Squirese, J., Mahmoudi, H., Wu, J., Agarwal, S., Hadley, M. (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and Medicine.** **15**: 353-363.
- Drozdowski, B., Szukalska, E. (1987). A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. **J. Am. Oil Chem. Soc.** **64**: 1008-1011.
- Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M.A., Collins, A.R. (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Cancer Res.** **56**: 1291-1295.
- Echtay, K.S., Murphy, M.P., Smith, R.A., Talbot, D.A., Brand, M.D. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. **J. Biol. Chem.** **277**: 47129-47135.
- Eder, K., Flader, D., Hirche, F., Brandsch, C. (2002). Excess Dietary Vitamin E Lowers the Activities of Antioxidative Enzymes in Erythrocytes of Rats Fed Salmon Oil. **J. Nutr.** **132**: 3400–3404.
- El-Gendy, A.M. (2011). Amelioration of aluminium - intake oxidative stress by some antioxidants in male albino rats. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine.** **45**: 536 – 546.
- Favier, A. (1997). "Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur ". **Annales de Biologie Clinique** **55(1)**: 9-16.
- Feng, Z., Hu, W., Amin, S., Tang, M.S. (2003). Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair- proficient. **Human. Cells. Biochemistry.** **42**: 7848-7854.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. **Sports med** **36 (4)**: 327-58.

- Fridovitch, I. (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\circ-}$), superoxide dismutases, and related matters. **J. Biol. Chem.** **272**: 18515–18517.
- Fu, J., Zhang, Hang, W., Mai, K., Feng, X., Xu, W., Liu fu, Z., Ma, M., 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.
- Fujii, J., Taniguchi, N. (1999). Down regulation of superoxide dismutases and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radic Res.** **31**: 301–308.
- Gabe, M. (1968). Techniques histologiques. Paris: Masson 1113p.
- Garrido-Polonio, C., Garcia-Linares, M.C., Garcia- Arias, M.T., Lopez-Varela, S., Garcia-Fernandez, M.C., Terpstra, A.H.M. and Sanchez-Muniz, F.J. (2004) Thermally oxidized sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. **Brit. J. Nutr.** **92**: 257 – 265.
- Genot, C., Michalski, M. (2010). "Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments." **Innovations Agronomiques**. **10**: 43-67.
- Gere, A. (1984). Dégradation thermique de quelques corps gras hongrois. **Revue Française des Corps Gras**. **11** : 437-442.
- Gey, K.F., Puska, P., Jordan, P., Moser, U.K. (1991). Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. **Am J Clin Nutr.** **53**: 326S-34S.
- Gey, K.F. (1998). Vitamin E plus vitamin C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. **Biofactors**. **7**: 113-174.
- Giani, E., Masi, I., Carafoli, E. (1985). Heated fat, vitamin E and vascular eicosanoids. **Lipids**. **20**: 439-448.
- Giasson, B.I., Duba, J.E., Murray, I. V. J., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. **Science**. **290**: 985-989.
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., De la Torre, M.C. and Lopez-Sabater, M.C. (2000). Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** **881**: 251 – 254.
- Golestani, A., Rastegar, R., Shariftabrizi, A., Khaghani, S., Payabvash, S.M., Salmasi, A.H., Dehpour A.R., Pasalar, P. (2006). Paradoxical dose- and time-dependent regulation of superoxide dismutase and antioxidant capacity by vitamin E in rat. **Clin Chim Acta**. **365**: 153–159.
- Goodlick, L., Kane, A. (1986). Role of reactive oxygen metabolites in crocidolite asbestos toxicity to mouse macrophages. **Cancer Res.** **46**: 5558-5566.

Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T., Kanazawa, K. (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. **Free Radical Biology and Medicine**. **45**:1318–1325.

Grandgirard, A., Julliard, F. (1987). Influence de divers paramètres sur la dégradation des huiles végétales au cours du chauffage : Nature de l'huile, température et durée du chauffage. **Revue Française des Corps Gras**. **4**: 213-220.

Grandjean, D. (2001). "Le stress oxydatif cellulaire chez le chien: conséquences et prévention nutritionnelle." **Bull Acad Vet de France** **154**: 49-61.

Grimard, M. P., Lemarchal, P., Blond, J. P. (1984). Influence de régime riche en acides gras saturés sur le métabolisme des acides gras essentiels chez le rat. **Revue Française des Corps Gras**. **4-5** : 155-157.

Guillaumin, R. (1973). Détermination des espèces des chimiques nouvelles formées durant le chauffage des huiles. **Rev. Fr. Corps Gras**. **5** : 285-289.

Hajiani, M., Golestani, A., Sharifabrizi, 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 anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. **Redox Rep**. **13**: 60 – 66.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." **Arch Biochem Biophys** **280**: 1-8.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University press**.

Helbock, H.J., Beckman, K.B., Ames, B.N. (1999). 8-hydroxydesoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. **Methods. Enzymol. Mol.** **300**: 156-166.

Hildebrand, P., Beglinger, C., Gyr, K., Jansen, J.B, Rovati, L.C, Zuercher, M. (1990). "Effects of a cholecystokinin receptor antagonist on intestinal phase of pancreatic and biliary responses in man." **J Clin Invest**. **85(3)**: 640-6.

Hill, R.C., Armstrong, D., Browne, R.W., Lewis, D.D., Scott, K.C., Sundstrom, D., Harper, J. 2001. Chronic administration of high doses of vitamin E appear to slow racing greyhounds. **FASEB J**. **15**, **A990**: 756.7.

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.

Hoshino, E., Shariff, R., Gossum, A. (1990). Vitamin E suppresses increased lipid peroxidation in cigarette smokers. **J. Parent. Enter. Nutr.** **14**: 300-305.

Huang W, Chan P, Chen Y, Chen C, Liao S, Chin W, Cheng J. (1999) Changes of superoxide dismutase in cultured rat aortic smooth muscle cells (A7r5) by an incubation of vitamin E. **Pharmacology**. **59**: 275–282.

- Human, D. (2002). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. **Sci. Aging Knowl. Environ.** **37**: 14.
- Hussain, M. M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H., Bakillah, A. (1996). "Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors." **Biochim Biophys Acta** **1300(3)**: 151-70.
- Ingold, K. U., Bowry, V. W., Stocker, R., Walling, C.(1993). Medical Sciences Autoxidation of lipids and antioxidation by α -tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: Unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoprotein (atherosclerosis/ascorbate/superoxide/protein thiols). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **90**. 45-49.
- Izaki, Y., Yoshikawa, S., Uchiyawa, M. (1984). Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. **Lipids.** **19**: 324-331.
- Jaques, P. F., Halpner, A. D., Blumberg, J. B. (1995). Influence of combined antioxidant nutrient on their plasma concentrations in an elderly population. **Am J Clin Nutr**, **62** : 1228-33.
- Jungbluth, G. (2008). Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2008, n°14.
- Kanasawa, K., Kanasawa, E., Natake. (1985). Uptake of secondary autoxydation products of linoleic acid by the rat. **Lipids.** **20**: 412-419.
- Karelson, E., Bogdanovic, N., Garlind, A.(2006). The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer disease : noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. **Neurochem. Res.** **26**: 353-361.
- Kayden, H. J., Traber, M. G. 1993. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. **J Lipid Res.** **34**: 343-58.
- Kim, H.S., Kang, S.W., Rhee, S.G., Clerch, L.B. (2001). Rat lung peroxiredoxins I and II are differentially regulated during development and by hyperoxia. **Am. J. Physiol.** **280**: 1212-1217.
- Kimura, T., Iida, K., Takei, Y. (1984). Mechanisms of Adverse Effect of Air-Oxidized Soy Bean Oil-Feeding in Rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** **30**: 125-133.
- 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.
- Kirschvink, N., De Moffarts, B., Lekeux, P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **The Veterinary Journal.** **177**:178–191.
- Kok, T.S., Harris, P.G., Alexander, J.C. (1988). Heated canola oil and oxidative stress in rats. **Nutrition Research.** **8 (6)**: 673-684.

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.

Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Arunkumar, A., Vignesh, R.C., Aruldas, M.M., Arunakaran, J. (2007). Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. **Reproductive Toxicology.** **23** (2): 239-245.

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

Le Moel G., Saverot-Dauvergne A., Gousson, T. (1998). Le statut vitaminique. **France : Editions Médicales Internationales.** 550p.

Léger, C. (1992). Vitamine E, tocophérols, composés apparentés et structures membranaires. Paris, CL Léger éd., **Polytechnica.**

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. **Press Med.** **30**: 1076-1081.

Lenzi, F. (2011). Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. **Thèse Méd. Vét., Lyon.** pp 132.

Leong, X. F., Aishah, A., Nor Aini, U., Das, S., Jaarina, K. 2008. Heated Palm Oil Causes Rise in Blood Pressure and Cardiac Changes in Heart Muscle in Experimental Rats. **Archives of Medical Research.****39**: 567-572.

Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free. Radic. Biol. Med.** **32**: 790-796.

Liu, J. F., Huang, C. J. (1995). Tissue α -Tocopherol retention in male rats is by feeding diets containing oxidized frying oil. **J. Nutr.** **125**: 3071-3080.

Liu, J.F., Huang, C.J. (1996). Dietary Oxidized Frying Oil Enhances Tissue α -Tocopherol Depletion and Radioisotope Tracer Excretion in Vitamin E-Deficient Rats. **Nutr.** **126**: 2227-2235.

Liu, M., Wallmon A, Olsson-Mortlock C, Wallin R, Saldeen T. (2003). Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. **Am J Clin Nutr.** **77**: 700–706.

Lopez-Varela, S., Sanchez-Muniz, F.J., Cuesta, C. (1994). Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying. **Fd Chem Toxic.** **33**: 181-189.

Lowry, O. M., Rosenbrough, R. P., Williams, A. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **226**: 497-509.

Lyn Patrick, N.D. (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. **Altern Med Rev.** **11(2):**114-127.

Mac Laren, D. (2007). Advances in sports and exercise science series. **Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F.Elsevier.**

Magder, S. (2006). Reactives oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Crit. Care,** **10:** 208.

Mandelker, L. (2008). Introduction to oxidative and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin : Small Anim Practice. f. r. Oxidative stress: the role of mitochondria, and antioxidants. Elsevier Inc. 38:* 1-30.

March, B. E., Wong, E., Seier, L., Sim, J., Biely, J. (1973). Hypervitaminosis E in the chick. **J. Nutr. 103:** 371-377.

Margaritis, I., Palazzetti, S., Rousseau, A.S., Richard, M.J., Favier, A. (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise- induced response. **J Am Coll Nutr. 22(2):** 147-156.

Marklund, S. L., 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.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation- DNA damage by malondialdéhyde. **Mutat. Res. 424:** 83-95.

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

Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Nunez De Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and humain deseases. **Clin. Biochem. 32 :** 595-603.

McCuaig, L. W., Motzok, I. (1970). Excessive dietary vitamin E: Its alleviation of hypervitaminosis A and lack of toxicity. **Poultry Sci. 49:** 1050-1052.

McMichael, M. (2007). "Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats." **JAVMA 231(5):** 714-720.

Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E.(2000). Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. **Science. 289 :** 1567-1569.

Michelson, A. M. (1982). Oxygen radicals. **Agents. Actions. Suppl. 11:** 179-201.

Moore, S.A., Yoder, E., Spector, A.A. (1990). "Role of the blood-brain barrier in the formation of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids from essential fatty acid precursors." **Neurochem 55(2):** 391-402.

Moreau, H., Laugier, R., Gargouri, Y., Ferrato, F., Verger, R. (1988). "Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin." **Gastroenterology** **95(5)**: 1221-6.

Morel, Y., Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. **Biochem J.** **342**: 481-96.

Morris, C.D., Carson, S. (2003). Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. **Ann Intern Med.** **139**:56–70.

Mukai, K. (1993). Synthesis and kinetic study of antioxidant and prooxidant actions of vitamin E derivatives. In: Vitamin E in Health and Disease (Packer, L. & Fuchs, J., eds.), pp. 97–119. Marcel Dekker, New York, NY.

Nair, J., Barbin, A., Velic, I., Bartsch, H. (1999). Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. **Mutat. Res.** **424**: 59-69.

Nascimento, M. C. MO., Matsubara, B. B., Matsubara, L. S., Correa, C. R., Pereira, E. J., Moreira, P. L., Carvalho, F. A., Burini, C. H., Padovani, C. R., Yeum, K. J., Ferreira, A. L. A. (2010). Pharmacological dose of α -tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. **Human and Experimental Toxicology.** **30, (10)**: 1540–1548.

Needleman, P., Truk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., Lefkowitz, J. B. 1986. **Arachidonic Acid Metabolism.** Annual Review of Biochemistry. 55: 69-102.

Nielsen, H. K., Finot, P. A., Hurrell, R. F. (1985). Reactions of proteins with oxidizing lipids. **British Journal of Nutrition.** **53**: 75-86.

Niki, E., Yamamoto, Y., Takahashi, M., Yamamoto, K., Yamamoto, Y., Komuro, E., Miki, M., Yasuda, H., Mino, M. (1988). Free radical-mediation damage of blood and its inhibition by antioxidants. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology.** **34**: 507-512.

Nilsson, E., Mikaelsson, B., Atopy, S. (1985). Occupation and domestic work as risk factors for hand eczema in hospital workers. **Cont. Derm.** **13**:16-23.

Novikova, I.A., Zlotnikova, M.V. (2011). Lipid peroxidation and antioxidant defense in patients with severe herpetic infection. **Klin Lab Dagn:** 16-19.

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.

Oarada, M., Ito, E., Terao, K., Miyazawa, T., Fujimoto, K., Kaneda, T. (1988). The effect of dietary lipid hydroperoxide on lymphoid tissues in mice. **Biochimica et Biophysica Acta.** **960 (2)**: 229-235.

Osim, E. E., Owu, D. U., Isong, E. U., Umoh, I. B. 1994. Influence of chronic consumption of thermooxidized and fresh palm oil diets on basal metabolic rate, body weight and morphology of tissue in rats. **Discov Innov.** **6**:389-396.

Packer, L., Landvik, S. (1990). Vitamin E in biological systems. **Adv Exp Med Biol.** **264**: 93–103.

Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Cm. Med.** **70**:158-69.

Paquot, C., Cuvier, P. (1976). Autoxidation à température relativement élevée. **Rev. Fr. Corps Gras.** 13^{ème} congrès mondial. Section A : autoxydation et altération thermooxydative. 35-42.

Parsell, D. A., Lindquist, S. (1994). Heat shock Proteins and stress tolerance. **In Biology of heat shock proteins and molecular chaperones. (Morimoto, R. I. T. A Georgopoulos, C, ed)** pp 457-494, cold spring Harbor Laboratory press.

Perrin, J. L., Perfetti, P., Dimitriades, D., Naudet, M. (1981). Evaluation des huiles chauffées : Tests de moussage et de résistance thermique. **Rev. Fr. Corps Gras.** **5** : 209-213.

Perrin, J. L., Redero, F., Prevot, A. (1984). Dosage rapide des polymères de triglycérides par chromatographie d'exclusion. **Rev. Fr. Corps Gras.** **3** : 131-134.

Perrin, J. L., Perfetti, P., Dimitriades, D., Naudet, M. (1985). Etude analytique approfondie d'huiles chauffées : I techniques analytiques et essais préliminaires. **Rev. Fr. Corps Gras.** **4** : 151-158.

Petit, V., Niot, I., Poirier, H., Besnard, P. (2007). "Absorption intestinale des acides gras: faits et incertitudes." **Nutrition Clinique et Métabolisme** **21**: 38-45.

Poulin, J.E., Cover, C., Gustafson, M.R., Kay, M.B. (1996). Vitamin E prevents oxidative modification of brain and lymphocyte band 3 proteins during aging. **Proc Natl Acad Sci USA.** **93**: 5600-3.

Powers, S., Jackson, M. (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." **Physiol Rev** **88**: 1243-1276.

Powers, S.K., Smuder, A.J., Kavazis, A.N., Hudson, M.B. (2010). Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism.** **20**:2–14.

Pre, J. (1991). La lipoperoxydation. **Path. Biol.** **39** (7): 716-787.

Ramajayam, G., Sridhar, M., Karthikeyan, S., Lavanya, R., Veni, S., Vignesh, R.C., Ilangovan, R., Sitta Djody, S., Gopalakrishnan, V., Arunakaran, J., Srinivasan, N. (2007). Effects of Aroclor 1254 on femoral bone metabolism in adult male Wistar rats. **Toxicology.** **241**(3): 99-105.

- Rouaki, F., Mazari, A., Kanane, A., M.B. Errahmani, M. B., Ammouche, A. (2013). Cardiotoxicity induced by dietary oxidized sunflower oil in rats: Pro- and antioxidant effects of α -tocopherol. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** **83** (6): 367–376,
- Roubal, W.T., Tappel, A.L. (1966). Damage to proteins, enzymes and amino acids by peroxidizing lipids. **Archs Biochim. Biophys.** **III**: 5-8.
- Rysted, I. (1985). Work-related hand eczema in atopics. **Cont. Derm.** **12**: 164-171.
- Sachdev, S., Davies K.J.A. (2008). "Production, detection, and adaptative responses to free radicals in exercise." **Free Radical Biology and Medicine** **44**: 215-223.
- Sakamoto, W., Fujie, K., Handa, H., Ogihara, T., Mino, M. (1990). In vivo inhibition of superoxide production and protein kinase C activity in macrophages from vitamin E-treated rats. **Int J Vitam Nutr Res.** **60**: 338–342.
- Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A., Perry, G. (2005). Metal ions and oxidative eprotein modification in neurological disease. **Ann Ist Super Sanità.** **41**(2):143-164.
- Schultz, M., Leist, M., Petrzika, M., Gassmann, B., and Brigelius-Flohe, R. (1995) Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'- carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? **Am. J. Clin. Nutr.** **62** (Suppl.): 1527S–1534S.
- Senthil Kumar, J., Banudevi, S., Sharmila, M., Murugesan, P., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M., Arunakaran, J. Effects of vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. **Reproductive Toxicology.** **19** (2): 201-208.
- Sharma, N., Desigan, B., Ghosh, S., Ganguly, N.K., Majumdar, S. (1999). Effect of antioxidant vitamin E protective factor in experimental atherosclerosis in rhesus monkeys. **Annals of Nutrition and Metabolism.** **43**: 181-190.
- Shatos, M., Doherty, J., Marsh, J. (1987). Prevention of asbestos-induced cell death in rat lung fibroblastes and alveolar macrophages by scavengers of active oxygen species. **Environ. Res.** **44**: 103-116.
- Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J. (2006). Modern Nutrition in Health and Disease. **Tenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins.**
- Sinclair, A. J., Collins, F. D. (1968). Fatty livers in rats deficient in essential fatty acids. **Biochim. Biophys. Acta.** **152**: 498-510.
- Sies, H., Stall, W., Sundquist, A. R. (1992). Antioxidant functions of vitamins. Vitamin E anc C, beta-carotene and other caretonoids. **Ann NY Acad Sci USA.** **669**: 7-22.
- Singal, P.K., Kapur, N., Dhillon, K.S., Beamish, R.E. and Dhalla, N.S. (1983). Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. **Can. J. Physiol. Pharm.** **60** : 1390 – 1397.

- Smith, L., Shamsuddin, M., Sporn, P.H. (1997). Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma. **Free Radic. Biol. Med.** **22**: 1301-1307.
- 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.
- 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.
- Starkov, A.A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. **Ann. NY Acad. Sci.** **1147**: 37–52.
- Stevanovic, I.D., Jovanovic, M.D., Jelenkovic, A., Colic, M., Stojanovic, I., Ninkovic, M. (2008). The effect of 7-nitroindazole on aluminium toxicity in the rat brain. **Bulgarian. J. Veter. Med.** **11 (1)**: 37-47.
- Stevnsner, T., Thorslund, T., De Souza-Pinto, N.C., Bohr, V. A. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. **Exp. Gerontol.** **37**: 1189-1196.
- Stocker, R. (1999). The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. **TIBS.** **24**: 219.
- Stoyanovsky, D. A., Goldman, R., Darrow, R. M., Organisciak, D. T., 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.
- Stremmel, W., Strohmeyer, G., Stremmel, W., Strohmeyer, G., Borchard, F., Kochwa, S., Berk, P.D. (1985). "Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes." **Proc Natl Acad Sci U S A** **82(1)**: 4-8.
- Sugiyama, M., Tsuzuki, K., Hidad, K. (1991). Reduction of chromium (VI) in Chinese hamster V-79 cells. **Biol. Trace Elem. Res.** **30**: 1-8.
- Tessier, F., Marconnet P. (1995). "Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice." **Science & Sports** **10**: 1-13.
- Thomas, S. R., Neuzil, J. & 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. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** **16**: 687–696.
- Traber, M.G., Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology Medicine.** **43**:4–15.
- Trenam, C.W., Dabbagh, A.J., Blake, D.R. (1992). The role of iron in acute model of skin inflammation induced by reactive oxygen species. **Br. J. Dermatol.** **126**: 250-256.
- Trotter, P.J., Ho, S.H., Storch, J. (1996). "Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells." **J Lipid Res** **37(2)**: 336-46.

- Upston, J.M., Terentis, A.C., Stocker, R. (1999). Tocopherol-mediated peroxidation (TMP) of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. **FASEB J.** **13**: 977-994.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. B.** **39**: 44-84.
- Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrell, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F. (2004). Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. **Eur J Biochem.** **271**:3646–3656.
- Vilas, J. (1994). Contribution à l'étude des composés volatils au cours de l'oxydation thermique des matières grasses. **Revue Française des Corps Gras.** **6**: 155-157.
- Vilas, N. N., Bell, R. R., Draper, H. H. (1976). Influence of Dietary Peroxides, Selenium and Vitamin E on Glutathione Peroxidase of gastrointestinal tract. **J. Nutr.** **106**: 589-596.
- Wada, K., Saniabadi, A., Nakano, M. (1995). Direct measurement of superoxide-dependent chemiluminescence from rat skin following UV-dependent fluoroquinolone-induced dermatitis. **Free Radic. Biol. Med.** **18**: 923-927.
- Wagner, B.A., Buettner, G.R., Burns, C.P. (1996). Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. **Arch Biochem Biophys.** **334**: 261–267.
- Weil, J. H. (1979). *Biochimie Générale*. 3^{ème} éd, Paris.
- Westergaard, H., Dietschy, J.M. (1976). "The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell." **J Clin Invest** **58(1)**: 97-108.
- Wolinsky, I. (1998). *Nutrition in Exercise and Sport*. 3th edition. New York: CRC Press.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J., Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci.** **28**: 32-40.
- Xiang, S.Q., Cianflone, K., Kalant, D., Sniderman, A. (1999). "Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase." **J Lipid Res** **40(9)**: 1655-63.
- Xie, Y., Newberry, E.P., Young, S.G., Robine, S., Hamilton, R.L., Wong, J.S., Luo, J., Kennedy, S., Davidson, N.O. (2006). "Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency." **J Biol Chem** **281(7)**: 4075-86.
- Yamamoto, Y., Niki, E., Kamiya, Y. (1982). Oxidation of lipids: III oxidation of methyl linoléate in solution. **Lipids.** **17**: 870-878.
- Yang, N. Y. J., Desai, A. D. (1977). Effect of high levels of dietary vitamin E on hematological indices and biochemical parameters in rats. **J. Nutr.** **107**: 1410-1417.

Yatin, S. M., Varadarajan, S., Link, C. D., Butterfield, D. A. (1999). In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiol Aging*. 20 (3): 339-330.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD 2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free radical Biol. Med.** 33: 337-349.

Effect of Ingestion of Thermally Oxidized Sunflower Oil on the Fatty Acid Composition and Antioxidant Enzymes of Rat Liver and Brain in Development

A. Ammouche F. Rouaki A. Bitam M.M. Bellal

Institut National Agronomique, Département de Technologie alimentaire et de Nutrition Humaine, Alger, Algérie

Key Words

Oxidized oil · Glutathione peroxidase · Glutathione reductase · Catalase · Glucose-6-phosphate dehydrogenase · Brain · Liver

Abstract

Background: The current study was undertaken to assess the effects of oxidized sunflower oil ingestion (obtained by heating at 98°C with air insufflation during 48 h and incorporated at 5% in a fat-free diet) on liver and brain fatty acid composition, and some serum parameters and protective enzymes against peroxidation (glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase). **Results:** The main results show that the oxidized oil contains 262 mmol/kg of hydroperoxides, 5.7% of the esters are oxidized and 50.4% are polymerized. In the liver, we noticed that oxidized oil exercises a toxic effect as confirmed by the increase in the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration. In the same way, we noticed that vitamin E exercises a favorable effect in the preservation against free radicals and lipid peroxidation; however, it cannot ensure this protection alone. In the liver, only glutathione peroxidase and glutathione reductase activities

were positively correlated with the TBARS concentration. In the treated groups, we also noted changes in the fatty acid profiles of liver and brain homogenates, essentially by the appearance of *trans* fatty acid (18:1 *trans*) and an increase in arachidonic acid content.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

Introduction

The successive cycles of heating to which oils are submitted during their use in deep frying provoke important changes in the essential fatty acids, with regard to their unsaturations. They are especially susceptible to deterioration and rancidity, processes which are less important under normal conditions of storage or culinary use. Many derivatives are formed, some of which have known toxic properties. Most of them are present in small amounts, but monomeric, dimeric and polymeric compounds can accumulate in thermally oxidized oils. These compounds are able to disturb the main cellular structures and functions, and some of these reactions could contribute to the occurrence of degenerative diseases, cancers and the ageing process [1, 2].

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2002 S. Karger AG, Basel
0250-6807/02/0466-0268\$18.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/anm

A. Ammouche
Institut National Agronomique
Département de Technologie alimentaire et de Nutrition Humaine
16200 Algiers (Algeria)
Tel. +213 21 52 19 87/89, Fax +213 21 82 27 29, E-Mail Ammouche.Ali@yahoo.fr

Although the cell possesses various systems of defense against the propagation of peroxide, e.g. α -tocopherol, and enzymes (glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GRD), and glucose-6-phosphate (G-6-P) dehydrogenase), numerous studies on animals [3–6] showed reduced food intake, depressed growth, diarrhea, histopathological changes in various tissues and, in some cases, mortality. Alterations in enzyme activities should be sensitive criteria for assessing the mild toxicity of oxidized oils [7].

Therefore, to appreciate the activities of these protective enzymes in the presence of thermoxidized oils, we undertook this study in order to determine the effects of thermoxidized sunflower oil ingestion on the fatty acid composition, GPX system and catalase activities of the rat liver and brain in development.

Materials and Methods

All chemicals used were obtained from Sigma Chemical Co. All solvents were of analytical grade.

Oil Oxidation Method

The oxidative method for oil deterioration is that used in accelerated tests of oxidizability [8] and modified by Blanc-Gondardmary et al. [9]. The oil is heated at $98 \pm 2^\circ\text{C}$ with air insufflation (80 liters/h) during 48 h. Global evaluation of the changes in oxidized oil status was made using peroxide, iodine and acid values [10]. The polar and polymerized products were monitored according to Perrin et al. [11]. The weighable dosage of polar glycerides was achieved by absorption chromatography on a column of silica gel [12], and the polar and polymerized esters were analyzed by gas phase chromatography [13].

Animal Experiments

Experiments were performed on male weanling rats of the Wistar strain weighing 40 ± 5 g and purchased from the Pasteur Institute of Algeria. Animals were randomly divided into 3 groups of 34 each and maintained under controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) conditions and relative humidity (70%) with a 12-hour light-dark cycle. The animals were fed ad libitum from day 21 to 90 with a semisynthetic rat fat-free diet containing 5% fresh sunflower oil (FSO) or 5% oxidized sunflower oil (OSO) or 5% of vitamin E-deficient oxidized sunflower oil (EOSO), respectively. The composition of the diets and their linoleic acid contents are presented in tables 1 and 2. The composition (g/100 g) of the experimental diet was the same for all groups (FSO, OSO, EOSO). The main difference between them being: for the FSO group, we incorporated 5% of FSO; however, the OSO and EOSO groups received 5% of oxidized sunflower oil each. Thus, the EOSO group is vitamin E deficient.

Sample Collection

Animals were weighed and decapitated at 21 days and at the end of the experimentation period (90 days). After overnight fasting, animals were anesthetized by diethyl ether inhalation and immediately sacrificed. The liver and brain tissues were quickly removed, washed

Table 1. Composition (g/100 g) of the experimental diet

Ingredients	Diets		
	FSO	OSO	EOSO
Casein	20	20	20
<i>dl</i> -Methionine	0.16	0.16	0.16
Agar-agar	2	2	2
Corn starch	44.90	44.90	44.90
Sucrose	21.94	21.94	21.94
FSO	5	–	–
OSO	–	5	5
Mineral mixture ¹	4	4	4
Vitamin mixture ²	2	2	2 (without vit E)
Energy, kcal	392	392	392

FSO = Fresh sunflower oil; OSO = oxidized sunflower oil; EOSO = vitamin E-deficient oxidized sunflower oil.

¹ Mineral composition of the mixture (mg/100 g): KH_2PO_4 20.0; CaCO_3 34.6; CaHPO_4 26.55; NaCl 13.70; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.42; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.042; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.27; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.02; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.15; CoCO_3 0.0008, KI 0.0016.

² Composition of vitamin supplement per kilogram of diet: Vit A 19,800 UI; D₃ 2,500; 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 -tocopherol acetate) 170 mg; K₃ 40 mg; PP 100 mg; choline chloride 1,360 mg; folic acid 5 mg; AcPAB 50 mg; biotin 0.3 mg; feed units per rat = 210.

Table 2. Linoleic acid content in different diets

Linoleic acid	Fresh sunflower oil	Oxidized sunflower oil
% of total fatty acids	66.2	17.2
g/100 g of food	3.0	0.8
% energy	6.0	1.6

and minced finely with scissors and homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer (500 rpm for 1 min) with 10 vol of a buffer containing 0.32 M sucrose, 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 1 mM MgCl_2 at 4°C in a Potter-Elvehjem Teflon-glass homogenizer.

Serum Analysis

The lipid peroxidation, expressed as thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), was determined by the method of Draper et al. [14]. The method of Lowry et al. [15], with bovine serum albumin as standard, was used to determine the protein contents.

The dosage of serum total lipids is based on the colorimetric reaction of Zollner as cited by Devaux [16]. The triglyceride concentration of serum was determined using the Technicon-SMAC system (Technicon, Tarrytown, N.Y.) according to the method of Bucolo and David [17]. Serum cholesterol was determined with the Technicon-SMAC system according to the method of Lie et al. [18].

Table 3. Characteristics of oils (values are the mean of 3 determinations)

	Fresh oil	Oxidized oil
Aspect	Liquid, yellow	Thick, clear green, faded flavor
Peroxide value, mmol/kg	1	262
Hydroperoxides, mmol/kg	9	235
Specific absorbance E, 1% 1 cm	1	34
Secondary products, DO 268 nm (ethylenic diketones)	0.6	1.6
Iodine value	131	79
Acid value, KOH mg/g	0.3	2.5
Non-modified triglycerides, %	100	28.3
Polar triglycerides, %		71.7
Normal esters, %		71.7
Normal esters, %		49.3
Polar esters, %		50.7
Polymerized esters, %		50.4
Polar esters/polar glycerides		70.7
Polymerized esters/polar esters		99.0

Table 4. Fatty acid composition of fresh and oxidized sunflower oils (expressed as a percent of the total identified fatty acids)

	Fresh sunflower oil	Oxidized sunflower oil
Polar esters	0.0	50.5
Normal fatty acids	100	49.5
14:0	0.1	0.1
16:0	6.2	6.2
18:0	3.7	3.8
18:1 ω 9	23.5	18.6
18:2 ω 6	66.2	17.2
18:3 ω 3	0.2	0.1
20:0	0.1	0.3
20:1 ω 9	–	0.2
22:0	–	1.3
24:0	–	0.2
No identified FA, %	–	1.5
Σ UFA	89.9	36.1

FA = Fatty acids; Σ UFA = sum of unsaturated fatty acids.

Table 5. Body weights (g) and organ weights (g/100 g body weight) of rats fed different dietary fats (n = 6)

Age days	FSO			OSO			EOSO		
	body weight	liver weight	brain weight	body weight	liver weight	brain weight	body weight	liver weight	brain weight
21	46.0 \pm 9.8	5.9 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2	46.0 \pm 9.8	5.9 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2	46.0 \pm 9.8	5.9 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2
90	246.9 \pm 3.6 ^a	4.1 \pm 0.3 ^a	0.7 \pm 0.1	165.7 \pm 0.3 ^b	5.3 \pm 0.3 ^b	0.8 \pm 0.0	247.3 \pm 9.5 ^{a,c}	5.2 \pm 0.5 ^{a,b}	0.7 \pm 0.0

FSO = Fresh sunflower oil; OSO = oxidized sunflower oil; EOSO = vitamin E-deficient oxidized sunflower oil.

Values (means \pm SD) not bearing the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. If no superscript appears, values are not significantly different.

Table 6. Serum parameter assessment according to age and diets

Age, days	FSO		OSO		EOSO	
	21	90	21	90	21	90
Triglycerides, mmol/l	1.54 \pm 0.08	1.56 \pm 0.06 ^a	1.55 \pm 0.08	0.82 \pm 0.02 ^b	1.54 \pm 0.10	0.50 \pm 0.01 ^c
Cholesterol, mmol/l	1.00 \pm 0.05	1.47 \pm 0.10	1.02 \pm 0.07	1.13 \pm 0.06	1.04 \pm 0.02	1.05 \pm 0.01
Proteins, g/l	57.33 \pm 0.14	66.00 \pm 0.29	57.00 \pm 0.77	64.00 \pm 1.15	57.30 \pm 0.09	64.50 \pm 0.08
Total lipids, mmol/l	4.01 \pm 0.10	4.80 \pm 0.01 ^a	4.00 \pm 0.22	3.50 \pm 0.00 ^b	4.00 \pm 0.09	3.30 \pm 0.02 ^b

FSO = Fresh sunflower oil; OSO = oxidized sunflower oil; EOSO = vitamin E-deficient oxidized sunflower oil.

Values (means \pm SD) not bearing the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. If no superscript appears, values are not significantly different.

Tissues

Lipids were extracted from aliquots of liver and brain tissues of each group by the method of Folch et al. [19]. The lipid extracts were then interesterified [20]. After extraction with hexane, the fatty acid methyl esters were analyzed by gas phase chromatography using a Carlo Erba chromatograph with an automatic on-column injector, a flame ionization detector and capillary-type Carbowax CP Wax 52 CB column (25 m length, 0.32 mm diameter). The data were processed using a microcomputer, and fatty acid concentrations are reported as the percent of the total fatty acid content.

Enzyme Activity Assays

GPX activity was determined using a modification of the method of Paglia and Valentine [21]. The rate of t-butyl hydroperoxide oxidation was measured indirectly by monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm.

GRD activity was assayed by the Goldberg and Spooner [22] method while measuring the disappearance of NADPH to 339 nm.

Catalase activity was determined by a procedure proposed by Chance and Herbert and cited by Bergmeyer [23] in which the rapid decomposition of the H₂O₂ substrate was followed directly by the decrease in absorbance at 240 nm.

G-6-P dehydrogenase catalyzes the conversion of G-6-P to 6-phosphogluconate. The activity was measured by following the appearance of NADPH at 339 nm [24].

Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm SD. Statistical differences were determined by a one-way analysis of variance and a Student-Neuman-Keuls test. Estimation of the correlation coefficient was determined by the regression test.

Results

Oxidized Sunflower Oil Status

The chemical features of oxidized oils are presented in table 3. The fatty acid composition of fresh and oxidized oil are given in table 4.

The mean body weights of rats fed oxidized sunflower oil (OSO and EOSO) were significantly lower than those of the corresponding control animals (FSO; table 5). In the EOSO groups no significant differences were found compared to the control group (FSO). Brain weight, expressed as a percentage of body weight, was not significantly different between the rats of the 3 groups, but the liver weights tended to be higher in the OSO and EOSO groups compared to controls (FSO).

Study of Some Serum Parameters

At the end of the experiment, we observed an important reduction in serum triglycerides in the OSO and EOSO groups compared to the FSO group (table 6). No significant difference is noted in the cholesterol and total lipid content between the 3 groups.

Table 7. Fatty acid composition of liver homogenates of rats fed different dietary fats

Fatty acids	FSO	OSO	EOSO
14:0	0.8 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1
16:0	22.9 \pm 0.5	21.4 \pm 0.9	20.7 \pm 0.2
16:1 ω 9	0.2 \pm 0.0 ^a	3.6 \pm 0.1 ^b	3.4 \pm 0.2 ^{b,c}
16:1 ω 7	2.9 \pm 0.1	2.3 \pm 0.2	2.3 \pm 0.0
17:0	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1
18:0	18.6 \pm 0.5	19.8 \pm 0.2	19.9 \pm 2.0
18:1 ω 9	13.3 \pm 1.0	10.7 \pm 0.6	9.6 \pm 0.4
18:1 trans	ND	1.1 \pm 0.0	2.0 \pm 0.1
18:1 ω 7	2.4 \pm 0.2	3.4 \pm 0.3	3.9 \pm 0.1
18:2 ω 6	8.5 \pm 0.7 ^a	4.8 \pm 0.2 ^b	5.0 \pm 0.2 ^{b,c}
18:3 ω 3	0.8 \pm 0.1 ^a	0.5 \pm 0.1 ^b	0.3 \pm 0.0 ^{b,c}
20:0	0.8 \pm 0.1	ND	ND
20:1 ω 9	0.7 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1
20:1 ω 7	1.6 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
20:4 ω 6	10.2 \pm 0.9 ^a	15.1 \pm 0.5 ^b	17.7 \pm 2.3 ^{b,c}
20:5 ω 3	3.7 \pm 0.1	3.0 \pm 0.2	2.7 \pm 0.3
22:0	0.7 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1
22:1 ω 9	0.9 \pm 0.0 ^a	1.4 \pm 0.1 ^b	1.5 \pm 0.0 ^{b,c}
22:4 ω 6	0.7 \pm 0.1	ND	ND
22:5 ω 6	0.3 \pm 0.0	ND	ND
22:6 ω 3	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.0
24:0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2
24:1 ω 9	6.5 \pm 0.1 ^a	4.7 \pm 0.1 ^{a,b}	2.4 \pm 0.1 ^c
24:1 ω 7	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.0
24:4 ω 6	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1
Σ SFA	44.7 \pm 1.5	45.0 \pm 0.7	44.0 \pm 2.2
Σ MUFA	29.5 \pm 2.0	28.7 \pm 0.9	27.2 \pm 1.1
Σ PUFA	25.8 \pm 1.0	25.0 \pm 0.7	27.3 \pm 0.5

FSO = Fresh sunflower oil; OSO = oxidized sunflower oil; EOSO = vitamin E-deficient oxidized sunflower oil; Σ SFA = sum of saturated fatty acids; Σ MUFA = sum of monounsaturated fatty acids; Σ PUFA = sum of polyunsaturated fatty acids; ND = Not detectable.

Values (in area percentages, mean \pm SD of 6 rats) not bearing the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. If no superscript appears, values are not significantly different.

Fatty Acid Composition of Rat Liver and Brain Homogenates

The fatty acid composition of liver homogenates from rats aged 3 months is shown in table 7. Profiles show partial destruction of the essential fatty acids by thermoxidation of the sunflower oil. The linoleic acid (18:2 ω 6) content was 8.5, 4.5 and 5% for the FSO, OSO and EOSO groups, respectively. On the contrary, the arachidonic acid (20:4 ω 6) content increases mainly in treated groups with regard to the control group, indeed it passes from

Table 8. Total lipid fatty acid composition of brain homogenates of rats fed different dietary fats

Fatty acids	FSO	OSO	EOSO
14:0	0.2±0.0	1.0±0.2	0.8±0.1
16:0	21.5±0.7	21.4±1.0	20.7±0.4
16:1ω9	0.3±0.0 ^a	3.6±0.2 ^b	3.4±0.1 ^{b,c}
16:1ω7	1.4±0.1	2.3±0.1	2.3±0.1
17:0	0.9±0.1	0.4±0.0	0.6±0.1
18:0	24.7±1.5	19.8±0.6	19.9±2.2
18:1ω9	15.9±1.2	10.7±0.3	9.6±0.3
18:1ω7	2.1±0.1	2.4±0.3	2.9±0.1
18:1 trans	ND	1.8±0.1	2.0±0.2
18:2ω6	1.3±0.0 ^a	0.9±0.2 ^b	0.8±0.1 ^{b,c}
18:3ω3	0.9±0.1 ^a	0.3±0.1 ^b	–
20:0	0.4±0.1	0.6±0.2	0.5±0.2
20:1ω9	0.2±0.0	0.3±0.1	0.4±0.1
20:1ω7	0.4±0.2	0.4±0.1	0.4±0.1
20:4ω6	6.6±0.9 ^a	7.0±0.5 ^b	7.2±2.3 ^{b,c}
20:5ω3	0.7±0.1	0.2±0.2	0.3±0.3
22:0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.5±0.1
22:1ω9	0.7±0.0 ^a	0.5±0.1 ^b	0.3±0.0 ^{b,c}
22:4ω6	3.0±0.1	3.3±0.4	3.1±0.3
22:5ω6	0.7±0.0	0.5±0.0	0.7±0.2
22:6ω3	12±0.2	11.4±0.1	11.9±0.0
24:0	0.8±0.0	0.9±0.1	0.8±0.2
24:1ω9	3.4±0.1 ^a	3.7±0.1 ^{a,b}	3.9±0.1 ^c
24:1ω7	0.6±0.2	0.3±0.2	0.6±0.0
24:4ω6	0.5±0.1	–	–
ΣSFA	49.3±1.2	50.8±1.0	50.1±0.8
ΣMUFA	25.0±0.3	25.0±0.5	25.2±1.0
ΣPUFA	25.7±0.5	23.8±0.5	23.8±0.2

FSO = Fresh sunflower oil; OSO = oxidized sunflower oil; EOSO = vitamin E-deficient oxidized sunflower oil; ΣSFA = sum of saturated fatty acids; ΣMUFA = sum of monounsaturated fatty acids; ΣPUFA = sum of polyunsaturated fatty acids; ND = not detectable.

Values (in area percentages, mean ± SD of 6 rats) not bearing the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. If no superscript appears, values are not significantly different.

9.5% for the FSO group to 15.1 and 17.7% in the OSO and EOSO groups, respectively.

The fatty acid composition of the brain homogenates does not present an important variation compared to the liver (table 8). The brain tends to maintain its fatty acid composition to a much greater extent than the liver. It is of course very probable that this reflects the 'protective' effect of the blood-brain barrier. However, we observed a reduction in the linoleic acid content 18:2ω6 that passes from 1.3% in the FSO group to 0.9 and 0.8% for the OSO and EOSO groups, whereas the linolenic acid content passes from 0.9% in the FSO group to 0.3% for the OSO

group and is not detectable in the EOSO group. We also noted the presence of *trans* oleic acid, approximately 1.8 and 2%, in the OSO and EOSO groups, respectively.

Evolution of Rat Liver and Brain Enzyme Activities

The evolution of GPX, GRD, G-6-P dehydrogenase and the catalase activities are shown in table 9. GPX can use lipid peroxides as a substrate as shown in the rat liver [25, 26]. Its importance is recognized in that it protects cellular components from oxidative deterioration. It increases with age and it is particularly more elevated in the hepatic tissue of the treated groups than in the brain.

The activity of GRD was similarly affected by variation in dietary fats. In the same way, the activity of G-6-P dehydrogenase, the key enzyme in the hexose monophosphate shunt, was enhanced with the presence of oxidized oil. G-6-P dehydrogenase activity probably owes its importance to the fact that it is implied in lipogenesis metabolism other than GSH regeneration [27].

Liver catalase activity was increased solely in the treated groups, whereas the brain does not seem to be affected. However, catalase may be more important than the glutathione redox cycle in controlling peroxide levels in the liver [28].

Evolution of the Malonaldehyde Concentration

According to Diet and Age

A significant increase in the malonaldehyde concentration in the EOSO group was observed in both brain and liver tissues compared with the control group (table 10). This implies that vitamin E plays a crucial role in the neutralization of oxidized hydroperoxide oils. Otherwise, a strong positive relationship was noted between the malonaldehyde concentration with GPX and GRD activities (0.94 and 0.90, respectively) in liver tissue during the treatment period in the EOSO group.

Discussion

On the basis of these results, we conclude that the oil was deeply altered in spite of the percentage (50.7%) of polar esters. Otherwise, the decrease in body weight in the OSO group confirms that the diets given to rats produced a typical essential fatty acid-deficient status during a period of 3 months. Hiroaki et al. [29] and Lopez-Varela et al. [30] observed liver hypertrophy in rats fed oxidized sunflower oil, showing a degenerated central region. Hepatocytes increased in height and formed enriched vacuolar cells surrounding other regenerated ones. At the same

Table 9. Liver and brain enzyme activities

	Liver						Brain					
	FSO		OSO		EOSO		FSO		OSO		EOSO	
	21 days	90 days	21 days	90 days	21 days	90 days	21 days	90 days	21 days	90 days	21 days	90 days
Glutathione peroxidase ¹	16.2±2.3	26.0±1.1 ^a	16.2±2.3	35.8±3.7 ^b	16.2±2.3	29.7±4.2 ^a	21.6±2.3	21.9±3.3 ^a	21.6±2.3	29.1±3.0 ^b	21.6±2.3	30.7±1.2 ^b
Glutathione reductase ¹	21.0±1.9	25.0±2.8 ^a	21.0±1.9	35.0±1.5 ^b	21.0±1.9	31.4±2.0 ^b	20.1±0.8	21.2±1.5 ^a	20.1±0.8	7.5±1.5 ^b	20.1±0.8	27.5±2.2 ^b
G-6-P dehydrogenase ²	1.10±0.5	1.20±0.2	1.10±0.05	1.93±1.0	1.10±0.05	1.75±0.06	0.22±0.01	0.31±0.06	0.22±0.01	0.35±0.0	0.22±0.01	0.38±0.1
Catalase ³	64.3±3.9	44.3±2.2 ^a	64.3±3.0	75.4±6.5 ^b	64.3±5.5	83.4±9.1 ^b	1.21±0.02	1.13±0.0	1.21±0.02	1.24±0.1	1.21±0.02	1.35±0.2

FSO = Fresh sunflower oil; OSO = oxidized sunflower oil; EOSO = vitamin E-deficient oxidized sunflower oil.

Values (mean ± SD) not bearing the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

If no superscript appears, values are not significantly different.

¹ nmol NADPH oxidized/min/mg protein.

² nmol NADP⁺ reduced/min/mg protein.

³ μ mol H₂O₂ decomposed/min/mg protein.

Table 10. Liver and brain concentrations of malonaldehyde (nmol/g proteins)

	FSO		OSO		EOSO	
	21 days	90 days	21 days	90 days	21 days	90 days
Liver	31.8±3.7	26.5±2.2 ^a	31.8±3.7	28.0±3.0 ^a	31.8±3.7	37.1±1.9 ^b
Brain	91.0±7.8	72.5±5.0 ^a	91.0±7.8	95.3±10.1 ^b	91.0±7.8	113.1±6.1 ^c

FSO = Fresh sunflower oil; OSO = oxidized sunflower oil; EOSO = vitamin E-deficient oxidized sunflower oil.

Values (means ± SD) not bearing the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$. If no superscript appears, values are not significantly different.

time they observed a relative diminution in liver weight according to age, similar to that of the control group.

We conclude that there may be an adaptive mechanism, but the damage caused is often irreversible after chronic ingestion of altered oil. In return, the brain remains highly protected by the blood-brain barrier.

The decrease in triglyceride and cholesterol contents, reflecting a decrease in the total lipid content of the experimental groups, can be interpreted as a reduction in lipid absorption owing to the presence of a high rate of oxidized esters formed during oil oxidation and to a disturbance in constitution and commencement of micelles [31]. The diminishing serum cholesterol concentration can be due to a reduction in cholesterol biosynthesis in the liver resulting in the decrease in the lecithin cholesterol acyltransferase activity, and probably a reduction in the biosynthesis and secretion of hepatic VLDL. Other authors

[32] explain that the decrease in cholesterol content is only the activation of α -hydroxylase, an enzyme responsible for the transformation of cholesterol in biliary acids. It should also be noted that vitamin C acts as a powerful antioxidant on biologic hydrophobic compartments and represents an important antioxidant in plasma. Therefore, this vitamin should have intervened in the detoxification process and should have attenuated the effect of vitamin E-deficient oxidized oil.

The substantial decline in the relative amounts of linoleic and linolenic acids in the liver and brain fat reflects the lower levels in the heated dietary fat, and also indicates that the oxidative influences of unstable derivatives at the cellular level promote loss of these essential nutrients. These results are in good agreement with those reported by many authors [3, 33, 34]. The increase in arachidonic acid content accompanied by the linoleic acid

reduction may be the consequence of cellular protection with a view to maintaining a normal physiological state. In another hypothesis by Blanc-Gondardmary [9], it is expressed by a toxic effect acting as a byproduct of the oxidized oil on the system of arachidonic acid use. Also the increase in arachidonic acid content could be the consequence of a defect in its utilization, following clamping of eicosanoide synthesis enzymes by the oxidized esters ingested. Giani et al. [34] observed an increase in platelet thromboxanes (TBX2) after ingestion of frying oil containing 13% polar compounds with an altered triglyceride/no altered triglyceride ratio of 0.63.

Otherwise, the statistical study showed the existence of a positive relationship in the liver between the malonaldehyde concentration with GPX and GRD activities during treatment of the EOSO group. These results corroborate those of many authors [35, 36]. They show that the activity of the GPX in plasma decreases when rats are fed a vitamin E-deficient diet, but increases when the diet contains oxidized oil. In the same way, they observed that the GPX activity of the control group was significantly higher than the vitamin E-deficient group over a period of 6 months. They suggested that this weak activity of GPX can be induced by the defaulting vitamin E. Our results support the observations of Barga et al. [37] who have shown a significant increase in liver lipoperoxides in rats fed a vitamin E-deficient diet. In the same way Csallany et al. [38] observed an increase in hepatic lipofuscin in rats fed a vitamin E-deficient diet for 8 weeks.

From these results it appears that the oxidized oil really has a toxic effect, which is confirmed by the increase in the liver malonaldehyde concentration and also by a disturbance in enzymatic activities, implying a detoxication mechanism with changes in the metabolic regulation system of the fatty acid synthesis.

According to some authors [39, 40], the effects of *trans* fatty acids in lipid tissues can induce trouble in membrane fluidity which provokes enzymatic and reactional disorders in cells.

The degraded sunflower oil given to rats was more or less tolerated in spite of its considerable alteration. The decrease in serum triglycerides and the hepatic hypertrophy reflected an effect on the VLDL synthesis resulting in an alteration in lipid metabolism that is the consequence of oxidized ester toxicity.

The important variation in the reactive product content with the thiobarbituric acid in the liver tissue reflects the presence of these compounds in the oxidized oil, which is more marked in the treated OSO and EOSO groups, thus proving the protective role of vitamin E

against lipid peroxides. Thus, the role of peroxidation in various physiological and pathological mechanisms appears more and more suspicious, indeed it has been established that the slowing of LDL purification leads to progressive oxidization of their lipids. Among other mechanisms this oxidation could result in a prolonged contact of LDL with smooth muscular and endothelial cells. The TBARS and/or the 4-OH nonenal formed react with some amino acids (lysine) of Apo-B. It prevents the recognition and therefore the purification of these receptor molecules that would have preserved their structural and functional integrity, which is an important factor of hypercholesterolemia.

From the issue of this work, several questions remain and various orientations can be envisaged.

Among the protective enzymes, superoxide dismutase activity needs to be studied under the same conditions, with regard to the fact that it largely intervenes in free radical detoxification.

The hepatic mixed-function oxidase system must be assessed owing to its important function in the metabolism of various xenobiotics and endogenous substrate.

It seems to us that a lot of work must be done on the real impact of *trans* fatty acids before we can know exactly the physiopathologic effects of these compounds. Long-term epidemiologic studies in man might bring further information to this field.

References

- 1 Harman D: The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7124-7128.
- 2 Naudet M: Etude sur les huiles chauffées: constitution chimique des produits d'altération thermo-oxydative. *Rev Fr Corps Gras* 1977;10:489-492.
- 3 Alexander JC: Chemical and biological properties related to toxicity of heated fats. *J Toxicol Environ Health* 1981;7:125-138.
- 4 Causeret J: Chauffage des corps gras et risques de toxicité. *Cah Nutr Diet* 1982;17:19-33.
- 5 Hochgraph E, Mokady S, Cogan U: Dietary oxidized linoleic acid enhances liver cholesterol biosynthesis and secretion in rats. *J Nutr Biochem* 2000;11:176-180.
- 6 Sanchez-Muniz FJ, Varela LS, Polonio GCM, Cuesta C: Dietary effect on growth, liver peroxides and serum and lipoprotein lipids in rats fed a thermoxidized and polymerized sunflower oil. *J Sci Agric* 1998;76:364-372.
- 7 Izaki Y, Yoshikawa S, Ychiyama M: Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats. *Lipids* 1984;19:324-331.
- 8 Drozdowski D, Szukalska E: A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. *JAOCS* 1984;64:7-10.
- 9 Blanc-Gondardmary P, Revol A, Pacheco H: Chronical ingestion of oxidized oil in young rat: Effect on lipid composition and cytidyl transferase activity; in *Biomembranes et nutrition, colloque INSERM, Paris, 1989*. Ed. INSERM vol 195, pp 481-482.
- 10 Afnor T (ed): *Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés*. 1978, pp 88-163.
- 11 Perrin JL, Perfetti P, Naudet M: Etude analytique approfondie d'huiles chauffées. II. Etude comparative de corps gras différents amenés à des états d'altérations comparables. *Rev Fr Corps Gras* 1985;5:205-214.
- 12 Gere A: Dégradation thermique de quelques corps gras Hongrois. *Rev Fr Corps Gras* 1984;11:437-442.
- 13 Grandgirard A, Julliard F: Influence de divers paramètres sur la dégradation d'huiles végétales au cours de chauffage: nature de l'huile, température et durée du chauffage. *Rev Fr Corps Gras* 1987;4:213-220.
- 14 Drapper HH, Squirese J, Mahmoudi H, Wu J, Agawal S, Hadley MA: Comparative evaluations of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biologic materials. *Free Radic Biol Med* 1993;15:353-363.
- 15 Lowry OH, Rosenbrough NL, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 16 Devaux G: *Choix de techniques de biochimie clinique*. Paris, Gauthier-Villars, 1974.
- 17 Bucolo G, David H: Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 1973;19:475-484.
- 18 Lie RF, Schmitz JM, Pierre KJ, Gochman N: Cholesterol oxidase-based determination by continuous-flow analysis, of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem* 1976;22:1627-1633.
- 19 Folch J, Lees M, Slone Stanley EH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Biol Chem* 1957;226:497-502.
- 20 Morrison WR, Smith LM: Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl-acetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 1964;5:600-608.
- 21 Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-169.
- 22 Goldberg DM, Spooner RJ: Glutathione reductase; in Bergmeyer HU (ed): *Method of Enzymatic Analysis*, ed 2. New York, Academic Press, 1984, pp 258-265.
- 23 Bergmeyer HU: *Methods of Enzymatic Analysis*, ed 3. Weinheim, Verlag Chemie, 1963, pp 273-286.
- 24 Deutsch J: Glucose-6-phosphate dehydrogenase; in Bergmeyer HU (ed): *Method of Enzymatic Analysis*, ed 2. New York, Academic Press, 1984, pp 190-197.
- 25 Little C, O'Brien PJ: An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 1968;31:145-150.
- 26 Christophersen BO: Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1969;176:463-470.
- 27 Ibrahim W, Lee US, Yeh C, Szabo J, Bruckner GJ: Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: Effects of dietary lipid, vitamin E-deficient rats. *J Nutr* 1997;127:1401-1406.
- 28 Crane D, Masters C: On the role of catalase in the oxidation of tissue fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 1984;229:104-111.
- 29 Hiroaki O, Yamashita K, Sasaki S, Horio F, Yoshida A: Long term effects of dietary polychlorinated biphenyl and high level of vitamin E on ascorbic acid and lipid metabolism in rat. *Int J Nutr* 1987;117:1217-1223.
- 30 Lopez-Varela S, Sanchez-Muniz FJ, Cuesta C: Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying. *Food Chem Toxicol* 1995;33:181-189.
- 31 Liu JF, Lee TM: Vitamin C supplementation restores the impaired vitamin E status of guinea pigs fed oxidized frying oil. *J Nutr* 1998;128:116-122.
- 32 Holloway DE, Rivers JM: Influence of chronic ascorbic acid deficiency acid intake on bile acid metabolism and bile composition in the guinea pigs. *J Nutr* 1981;112:416-425.
- 33 Cortesi R, Privetto O: Toxicity of fatty ozonides and peroxides. *Lipids* 1972;7:715-721.
- 34 Giani E, Masi I, Galli C: Heated fat, vitamin E and vascular eicosanoids. *Lipids* 1985;20:439-448.
- 35 Vilas NN, Bell RR, Draper HH: Influence of dietary peroxides, selenium and vitamin E on glutathione peroxidase of the gastrointestinal tract. *J Nutr* 1976;106:589-596.
- 36 Jensen GE, Clausen J: Glutathione peroxidase activity in vitamin E and essential fatty acid-deficient rats. *Ann Nutr Metab* 1981;25:27-37.
- 37 Barga G, Cadena S, Rojas C, Perez C, Lopez-Torres M, Prat J, Pamplonar R: Effect of dietary vitamin E levels on fatty acid profiles and nonenzymatic lipid peroxidation in the guinea pig liver. *Lipids* 1996;31:963-970.
- 38 Csallany SA, Lund Ayaz K, Le-Chu S: Effect of dietary vitamin E and aging on tissue lipofuscin pigment concentration in mice. *J Nutr* 1984;107:1792-1799.
- 39 Entressangles B: Isomères trans d'acides gras insaturés: aspects métaboliques et nutritionnels. *OCL* 1995;3:162-169.
- 40 Wolff RL, Combe N, Entressangles B: Incorporation et élimination de l'acide élaïdique dans les différents phospholipides des mitochondries ou de leurs membranes chez le rat. Incidence de l'organe et de l'âge. *Rev Fr Corps Gras* 1984;31:161-170.

International Journal for Vitamin and Nutrition Research

6/13

www.verlag-hanshuber.com/IJVNR

Editor-in-Chief

T. Bohn

Associate Editors

C. André · A. Alkerwi · M. Eggersdorfer

M. Reddy · A. Ströhle · C. Vögele

HUBER



International Journal for Vitamin and Nutrition Research

Volume 83, Number 6

Contents

Original Communications	Fabre A., Caspar-Bauguil S., Gaudart J., Mancini J., Garcia J., Mittaine M., Rittié J.-L., Brémont F., Mas E.: Antioxidant Potential is Correlated to $\omega 6/\omega 3$ Ratio and Brasfield Score in Cystic Fibrosis Children	325
	Abbaspour N., Wegmueller R., Kelishadi R., Schulin R., Hurrell R. F.: Zinc Status as Compared to Zinc Intake and Iron Status: a Case Study of Iranian Populations from Isfahan Province	335
	Hammouda S. A. I., Abd Al-Halim O. A. F., Mohamadin A. M.: Serum Levels of Some Micronutrients and Congenital Malformations: A Prospective Cohort Study in Healthy Saudi-Arabian First-Trimester Pregnant Women.	346
	Grosso G., Marventano S., Nolfo F., Rametta S., Bandini L., Ferranti R., Bonomo M. C., Matalone M., Galvano F., Mistretta A.: Personal Eating, Lifestyle, and Family-Related Behaviors Correlate with Fruit and Vegetable Consumption in Adolescents Living in Sicily, Southern Italy.	355
	Rouaki F., Mazari A., Kanane A., Errahmani M. B., Ammouche A.: Cardiotoxicity Induced by Dietary Oxidized Sunflower Oil in Rats: Pro- and Antioxidant Effects of α -Tocopherol	367
Research Article	Choi M.-K., Song H. J., Paek Y.-J., Lee H.-J.: Gender Differences in the Relationship between Vitamin C and Abdominal Obesity	377

International Journal for **Vitamin and Nutrition Research**

Your article has appeared in a journal published by Hans Huber Publishers.

This e-offprint is provided exclusively for the personal use of the authors.

It may not be posted on a personal or institutional website or to an
institutional or disciplinary repository.

If you wish to post the article to your personal or institutional website or to
archive it in an institutional or disciplinary repository, please use either a pre-
print or a post-print of your manuscript in accordance with the publication
release for your article and our “Online Rights for Journal Articles”
(<http://www.verlag-hanshuber.com/informationen>).

Original Communication

Cardiotoxicity Induced by Dietary Oxidized Sunflower Oil in Rats: Pro- and Antioxidant Effects of α -Tocopherol

Fayrouz Rouaki^{1,4}, Azzedine Mazari², Amel Kanane¹, Mohamed Brahim Errahmani^{1,3}, and Ali Ammouche⁴

¹Department of Biology, Faculty Life and Natural Sciences, Blida 1 University, Blida, Algeria

²Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), Department/Unit: Food Technology, Algiers, Algeria

³Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Blida 1 University, Blida, Algeria

⁴Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Food Technology Department, El Harrach, Algiers, Algeria

Received: October 30, 2013; Accepted: April 25, 2014

Abstract: This study highlighted the pro-oxidative functions of α -tocopherol (α T) on the heart antioxidant system and tissue histopathology of oxidized sunflower oil (OSO)-exposed rats.

Four groups of male Wistar rats were fed with different diets: 1) control diet containing FSO (fresh sunflower oil); 2) diet containing 5 % OSO; 3) diet containing 5 % OSO, supplemented with 600 mg α T kg⁻¹; and 4) diet containing 5 % OSO, supplemented with 1200 mg α T kg⁻¹. The hearts were then isolated, and the antioxidant enzymatic activities were assessed. Body weight and catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) activities significantly decreased in groups fed with OSO, while the lipid peroxidation (LPO) level significantly increased. Administration of OSO with α T (600 mg · kg⁻¹) returned the body weight values and LPO levels to similar values as the control group. The CAT and GPx activities increased but remained significantly lower compared to the control group. In the OSO group with α T (1200 mg · kg⁻¹), the CAT and GPx activities also decreased, while LPO significantly increased. Heart tissue sections obtained from the groups revealed the presence of large areas of necrosis. This study suggested that OSO induced oxidative stress and that administration of a moderate dose of α T restored the antioxidant balance, but that high levels of α T supplementation result in a pro-oxidant effect.

Key words: oxidized sunflower oil, toxicity, heart, rat, α -tocopherol, histopathology

Introduction

Sunflower oil contains a relatively high concentration of polyunsaturated fatty acids. Due to the high levels of unsaturation, these lipids are highly susceptible to

free radical oxidative reactions, which result in lipid peroxidation (LPO).

Excessive reactive oxygen species (ROS) generation results in oxidative stress and damage to cellular macromolecules (proteins, lipids, and nucleic acids),

which have been hypothesized to be a major contributor to the aging process and many diseases, such as cardiovascular diseases and cancers [1, 2]. In particular, LPO is considered a major phenomenon by which ROS can cause tissue damage, resulting in impaired cellular function and alterations in the physicochemical properties of cell membranes, which can disrupt vital functions [3]. Antioxidant enzymes are an important protective mechanism against ROS, and similar to many other biochemical systems, their effectiveness may vary with the stage of development and other physiological aspects of the organism [4]. The most important antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). The incidence of LPO may be dependent on both the levels of antioxidant enzymes and fatty acid composition in organisms, the latter of which may also be dependent on the animal's physiology, including development, age, and sex.

Vitamin E is an essential nutrient for all animal species. As a fat-soluble vitamin, it is the most effective chain-breaking, lipid-soluble antioxidant in biological membranes, where it contributes to membrane stability. Vitamin E protects critical cellular structures against damage from oxygen free radicals and reactive products of LPO. Vitamin E occurs in several natural forms; among them, α T exhibits the highest biological activity [5]. A number of studies have demonstrated the potential effects of vitamin E on the activities of antioxidant enzymes, fatty acid composition, and LPO [6, 7]. However, the ability of α T to act as a pro-oxidant and to increase the peroxidation of lipids is well known *in vitro* [8]. Increased DNA damage, attributed to α -tocopherol, in cultured cells has been reported following an insult capable of generating ROS [9]. Moreover, a meta-analysis suggested an increased risk of all-cause mortality from vitamin E supplementation [10]. Thus, the present study was performed to investigate (1) cardiotoxicity induced by oxidized sunflower oil (OSO) administered *via* the diet in male Wistar rats, (2) the protective role of α T in alleviating the negative effects of OSO in the heart, and (3) the effect of high α T supplementation on myocardial oxidative stress markers and associated histopathological changes in rats.

Materials and methods

Chemicals

Compounds used for diet formulations were obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. Vita-

min (AIN-76) mix, mineral (AIN-76) mix, and micro-pulverized vitamin-free casein were purchased from ICN Biomedicals; other chemicals and reagents were purchased from Boehringer Mannheim (Germany) and Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-filtered water was used for all biochemical assays.

Animals and diets

Fresh sunflower oil (FSO) was obtained from NCF(National Company of Fat, Algeria). It was continuously heated at 98 ± 2 °C for 46 hours with air insufflations ($40 \text{ L} \cdot \text{hour}^{-1}$); acceleration of oxidation was achieved by vigorous mixing of the heated sample with oxygen at atmospheric pressure [11]. The heated oil was stored at 4 °C in the dark until it was used in the diet preparations. Forty male Wistar rats weighing between 65 and 75 g were obtained from the Pasteur Institute of Algeria. The rats were divided into four groups, and over the course of 12 weeks, they were administered the formulated diets illustrated in Table I: first treatment (control), diet containing 5 % weight/weight FSO; second treatment, diet containing 5 % sunflower oil heated as previously described (OSO); third treatment, diet containing 5 % heated sunflower oil supplemented with α T ($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, OSOE₁); and fourth treatment, diet containing 5 % heated sunflower oil supplemented with α T ($1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, OSOE₂). The animals were placed in individual cages under controlled conditions of light (12 hours light-12 hours dark) and temperature (25 ± 1 °C). All rats had free access to food and water throughout the experiment. Body weight (BW) was determined weekly. At the end of the experiment, the rats were fasted overnight, anesthetized with 10 % chloral hydrate ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ BW), and then euthanized with overdose. Next, the hearts were removed, washed with ice-cold normal saline, and dipped in liquid nitrogen and stored at -70 °C for estimation of oxidative stress markers and histological examination. All animals used in this study were treated with humane care according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and its updated issue [12, 13].

Analysis of oil

Lipid oxidation and α -tocopherol content of tested oils

Lipid oxidation products, including conjugated dienes and peroxides, iodine and acid values, ethylenic diketones, and α T were measured in FSO and OSO. Conjugated dienes were assessed at 234 nm in a hexane so-

Table I: Composition of each experimental diet.

Ingredients	Diet			
	FSO	OSO	OSOE ₁	OSOE ₂
	(g · kg ⁻¹ diet)			
Casein	200	200	200	200
<i>dl</i> -Methionine	1.6	1.6	1.6	1.6
Agar-agar	20	20	20	20
Corn	449	449	449	449
Sucrose	219.4	219.4	219.4	219.4
FSO	50	/	/	/
OSO	/	50	50	50
Mineral mixture ^a	40	40	40	40
Vitamin mixture ^b	20	20	20	20
Energy (kcal)	3920	3920	3920	3920

FSO, fresh sunflower oil; OSO, oxidized sunflower oil; OSOE₁, OSO diet supplemented with α T (600 mg · kg⁻¹); OSOE₂, OSO diet supplemented with α T (1200 mg · kg⁻¹).

^aMineral content per 100 g of mineral mixture: KH₂PO₄ 20.0 mg; CaCO₃ 34.6 mg; CaHPO₄ 26.55 mg; NaCl 13.70 mg; MgSO₄ 7H₂O 3.42 mg; CuSO₄ 5H₂O 0.042 mg; MnSO₄ H₂O 0.27 mg; FeSO₄ 7H₂O 1.02 mg; ZnSO₄ H₂O 0.15 mg; CaCO₃ 0.0008 mg; KI 0.0016 mg.

^bVitamin content per kilogram of diet: Vit A 19.800 IU; 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 -tocopherol acetate) 170 mg; K₃ 40 mg; PP 100 mg; choline chloride 1.360 mg; folic acid 5 mg; AcPAB 50 mg; biotin 0.3 mg; feed units per rat = 210.

lution of the oils, and the molar absorption coefficient for conjugated dienes (29500 L · mol⁻¹ · cm⁻¹) was used to calculate the diene content (μ mol · kg⁻¹). The peroxides, iodine, and acid values were determined according to AFNOR [14]. The α T content of the tested oils was measured using reverse-phase high-performance liquid chromatography as previously described [15].

Fatty acid determination

Analysis of fatty acids was performed using gas chromatography. Oil samples were saponified for 30 minutes at 60 °C with 40 mL · g⁻¹ 0.5 M NaOH in methanol and then methylated with the boron trifluoride-methanol complex to achieve a complete conversion to methyl esters. Tricosanoic acid was employed as an internal standard. The esters were extracted into hexane, freed of moisture over anhydrous sodium sulfate, and dried under nitrogen. The fatty acid content of the oil was analyzed in a Hewlett–Packard 5890 Series II gas chromatograph (Palo Alto, CA) equipped with a flame ionization detector and a 50 m, i.d. 0.22-mm capillary column (BPX70) with 0.25-mm film thickness (SGE, Austin, Texas, USA). Three samples obtained from fresh and heated oil were analyzed. The total altered fatty acid content in oil was calculated taking into account the amount of chromatographed fatty acids [16].

In vivo study

Lipid peroxidation assay

The extent of LPO in the heart was determined using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay and expressed as the quantity of malondialdehyde (MDA) production [17]. The samples were suspended in phosphate-buffered saline (pH 7.4), mixed with butylated hydroxytoluene BHT-TCA solution (1 % w/v BHT dissolved in 20 % TCA), and centrifuged at 1000 × g for 10 minutes. The supernatant was subsequently mixed with 0.5 N HCl and 120 mM 2-thiobarbituric acid (TBA) in 26 mM Tris and heated in a water bath at 80 °C for 15 minutes. After cooling, the absorbance of the resulting chromospheres was determined at 532 nm using a BIORAD UV-visible spectrophotometer (Smart Spec 3000), and MDA production was determined using an extinction coefficient of 1.56 · 10⁵ M⁻¹ · cm⁻¹ and expressed in nmol MDA · mg⁻¹ of protein.

Measurement of enzymatic antioxidant activity

GPx (E.C.1.11.1.9) level assessment in the heart was based on the method of Paglia and Valentine [18]. After the addition of cumene hydroperoxide, NADPH was converted to NADP⁺ by glutathione

reductase (GR) and the generated oxidized glutathione was continuously monitored spectrophotometrically at 340 nm for 2 minutes. GPx activity was expressed in nanomoles of GSH oxidized per minute and per milligram of protein. SOD (E.C.1.15.1.1) activity, expressed as units per milligram of protein, is based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol [19]. SOD activity was determined by measuring the velocity of oxidized pyrogallol formation. The reaction medium contained Tris buffer (50 mmol · L⁻¹, pH 8.2), pyrogallol (24 mmol · L⁻¹), and CAT (30 mmol · L⁻¹). The absorbance changes were observed at 420 nm for 2 minutes. CAT (E.C.1.11.1.6) activity was assayed using the method described by Aebi [20], which is based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm. One unit of enzyme is defined as 1 μmol of hydrogen peroxide consumed per minute, and the specific activity was reported as micromoles of H₂O₂ decomposed per mg of protein. GR (E.C.1.6.4.2) activity was assayed at 37 °C and 340 nm according to the oxidation of NADPH by glutathione disulfide (GSSG) [21]. One EU was defined as the enzyme oxidation of 1 mole of NADPH per minute at 25 °C and at optimal pH (pH 8.0). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (E.C.1.1.1.49) catalyzes the conversion of G-6-P to 6-phosphogluconate. Its activity was assayed by measuring the rate of formation of NADH, which was examined spectrophotometrically at 340 nm [22].

Protein determination

The protein content of supernatants was spectrophotometrically estimated according to the method described by Lowry using bovine serum albumin as a standard [23]. The αT level was estimated as previously described [24] and expressed as μg · mg⁻¹ of protein.

Histopathological studies

The isolated hearts were washed immediately with saline and then stored in 10 % buffered formalin. The hearts were embedded in paraffin, sectioned into 5-μm tissue sections and stained with haematoxylin and eosin (H&E). These sections were then examined using light microscopy for histological changes.

Statistical analysis

The normality of the data distributions and homogeneity of variances were tested using the Kolmogorov-

Smirnov and Levene tests, respectively. The mean parameters of the different groups were compared to those of the control group using Student's *t*-tests. In addition, when assumptions of normality or homogeneity of variances were violated, Mann-Whitney *U*-tests were performed. The results are expressed as the mean ± SE and were considered significant at *p* < 0.05. Statistical analyses were established using Statistica 7.0, Statsoft Inc. (Tulsa, USA).

Results

Fresh and oxidized oil status

The chemical features of fresh and oxidized oil are presented in Tables II and III. Heating FSO caused its alteration as observed by the depletion of αT and the increase in peroxide and hydroperoxide values (Table II). The fatty acid composition was also affected by heating, where the polyunsaturated fraction (mainly C18:2) was oxidized and its proportion was reduced by two-thirds. Polar esters appeared in the OSO (Table III).

Body and heart weights

The effects of OSO and αT on the body and heart weights are summarized in Figures 1 A and 1B. Compared to the FSO group, the body weight of the OSO group decreased significantly (*p* = 0.0009). At either a low or high dose, αT supplementation restored the body weight of OSO-fed rats. Thus, increasing the amount of supplemented αT to 1200 mg · kg⁻¹ did not improve rat heart growth.

No significant decrease in heart weight was observed for the OSO-fed group, and there was no effect on heart weight with αT supplementation.

Table II: Lipid oxidation markers and αT content of tested oils.

Parameters	FO	OO
Iodine value	130	82
Acid value (KOH mg · g ⁻¹)	0.1	4.2
Peroxides value (mmol · kg ⁻¹)	1	258
Hydroperoxides (mmol · kg ⁻¹)	10	232
Ethylenic diketones	0.6	2.8
α-tocopherol (μg · mL ⁻¹)	2	0

FO: Fresh oil; OO: Oxidized oil

Table III: Fatty acids composition of tested oils expressed as the percentage of total fatty acids content.

Parameters	FO	OO
Polar esters (%)	0.0	43.3
Non-altered fatty acids (%)	100.0	56.7
14:00	0.05	nd
16:00	5.62	5.62
18:00	3.57	4.32
18:1 ω9	27.48	25.52
18:2 ω6	61.56	19.85
18:3 ω3	0.19	0.25
20:00	0.23	0.11
Saturated fatty acids	9.48	10.05
Monounsaturated fatty acids	27.48	25.52
Polyunsaturated fatty acids	61.76	20.09

FO: Fresh oil; OO: Oxidized oil
nd: not detected

Vitamin E, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activities

Vitamin E

The level of α T was significantly reduced in the heart tissue of OSO and OSOE₂ rats compared to the control group ($p=0.0015$ and $p=0.0004$, respectively, Figure 2), whereas no significant difference was observed between the FSO and OSOE₁ groups. However, supplementation with α T ($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in the diet maintained the levels of this antioxidant comparable to those of the control group.

Lipid peroxidation

Compared to control rats (FSO), the level of LPO was significantly higher in rats fed with OSO ($p=0.019$; Figure 3). Supplementation with α T (OSOE₁ group) provided protection against OSO-induced LPO in the rat heart, as demonstrated by the significant decrease in LPO formation. Increasing the concentration of α T to $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (OSOE₂ group) did not enhance the protection against LPO; in contrast, the level of LPO increased significantly ($p=0.027$) and returned to the level of the oxidized group (OSO).

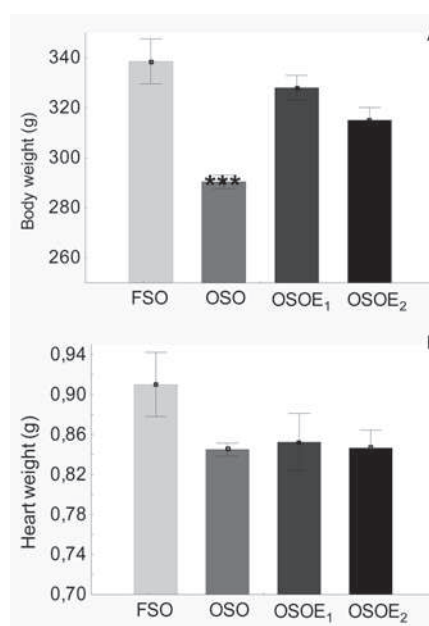


Figure 1: Effect of supplementation of α T on OSO induced changes in the body and heart weight of adult male rats. Each value represents mean \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between control and treatment groups).

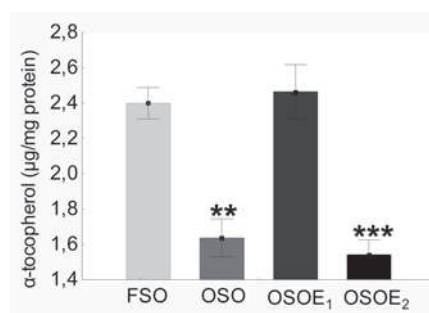


Figure 2: Effect of supplementation of α T (600 and $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in diet on its level in the heart of OSO-treated rats. Each value represents mean \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between control and treatment groups).

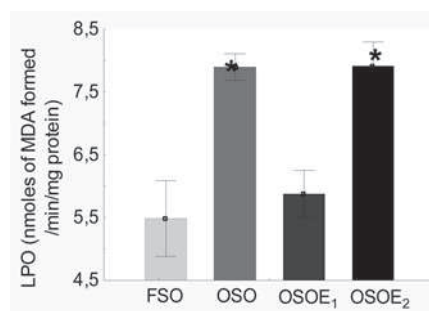


Figure 3: Effect of supplementation of α T (600 and $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in diet on the generation of LPO in the heart of OSO-treated rats. Each value represents mean \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between control and treatment groups).

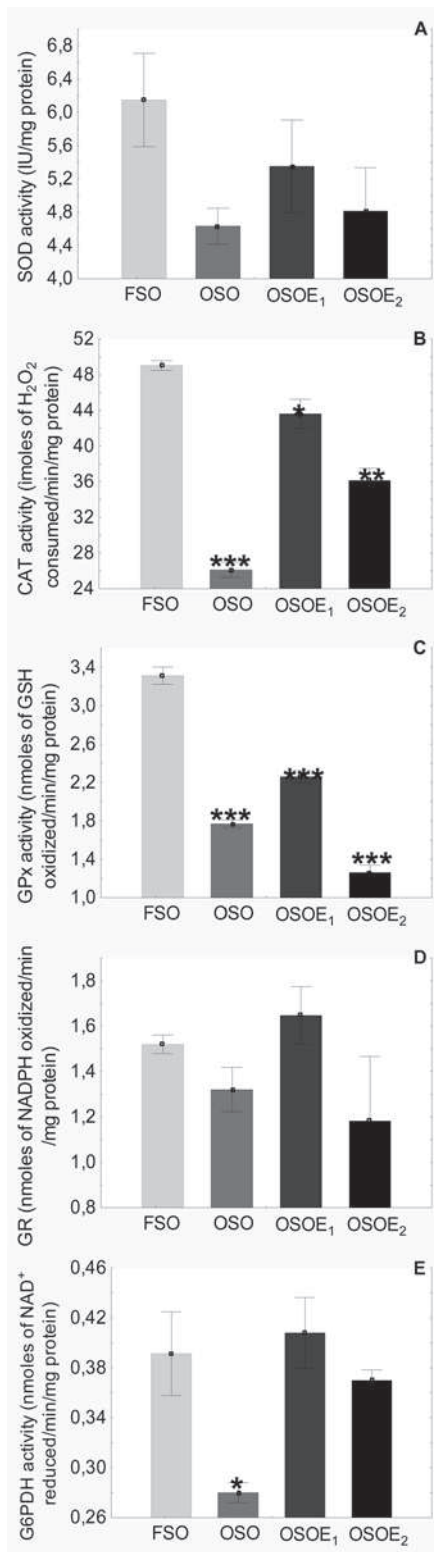


Figure 4: Effect of supplementation of α T (600 and 1200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in diet on the enzymatic antioxidant activities in the heart of OSO-treated rats. Each value represents mean \pm SE (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between control and treatment groups).

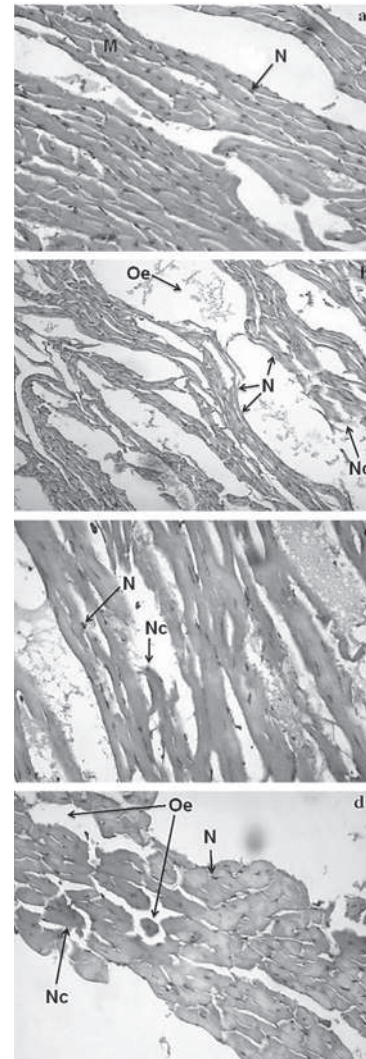


Figure 5: Light micrograph of rat heart (10 \times , H&E) showing: (a) normal architecture in FSO group, (b) myocardial edema in OSO group, (c) no evidence of myocardial edema in OSOE₁ group (α T at 600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), (d) myocardial edema in OSOE₂ group (α T at 1200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). N: nucleus, M: cardiac muscle, Nc: necrotic cells, Oe: edema.

Antioxidant enzyme activities

The evolution of antioxidant enzyme activities, namely SOD, CAT, GPx, GR, and G6PDH, in the hearts of experimental animals are shown in Figure 4 (A to E). No significant decrease in the activity of SOD but highly significant increases in the activities of CAT and GPx were observed for the OSO-fed rats compared to the control group ($p < 0.0001$ for CAT and GPx). Upon simultaneous administration of OSO and α T (600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), the activities of the antioxidant enzymes CAT and GPx increased (very highly for CAT) but remained significantly lower compared to those

of the control group ($p=0.033$ and $p=0.0007$, respectively).

Next, with treatment of OSO and αT ($1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), the activities of CAT and GPx significantly decreased ($p=0.001$ and $p<0.0001$, respectively). The activity of SOD decreased, but no significant difference was observed in the OSOE₁ group.

The GR activity (Figure 4D) was slightly decreased for the OSO group, and the OSOE₂ group exhibited less activity for this enzyme among all of the experimental groups, although these differences were not statistically significant.

The G6PDH activity (Figure 4E) was significantly reduced in the OSO group ($p=0.032$) and was significantly increased in rats fed with the OSO diet supplemented with αT , reaching levels that were comparable to that of the control group (FSO).

Histopathological changes

A light micrograph of a heart from an FSO group rat with normal architecture is shown in Figure 5a, but the OSO group revealed extensive myofibrillar degeneration, which was related to infiltration and interstitial edema (Figure 5b). Nevertheless, hearts from rats fed OSO supplemented with αT ($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) retained their normal histology, demonstrating normal myofibrillar structure with a branched appearance and continuity with adjacent myofibrils (Figure 5c). Heart sections from rats receiving the highest dose of αT ($1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) demonstrated changes in cellular morphology, with the presence of large areas of necrosis with interstitial edema (Figure 5d).

Discussion

One of the major causes of ischemic heart disease and heart failure is an imbalance between oxidants and antioxidant defenses. Thus, it is possible to limit oxidative stress-induced tissue damage by favoring the balance towards lower oxidative stress [25]. Indeed, vitamins directly scavenge ROS and regulate the activities of antioxidant enzymes. Among these vitamins, vitamin E has been recognized as one of the most important antioxidants [26]. However, it may still be associated with adverse effects [27], including pro-oxidant effects at high doses [28, 29], which may work against the plausible benefits of antioxidants. In the present study, 5 % OSO was incorporated into the

diet of Wistar rats over 12 weeks, which resulted in a significant decrease in their body weight. This weight loss may be due to the cellular damage caused by the elevated levels of LPO. It has been reported that rats fed thermally oxidized oil had significantly lower gains in body weight [30]. However, administration of αT ($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) with OSO prevented weight loss by protecting the organs against damage caused by free radicals and reactive products of LPO. Furthermore, αT inhibits the peroxidation of membrane lipids by scavenging lipid peroxyl radicals and is converted to α -tocopheroxyl radical as a consequence [31]. No additional improvements in rat body growth with higher amounts of supplemented αT ($1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were observed, which confirmed findings that no difference occurred in the weight gain of fish fed diets containing either fish oil or swine fat and supplemented with 500 or 1500 mg α -tocopheryl acetate per kg of diet [7].

The OSO group also showed no significant decrease in heart weight. A reduction in organ weights, including the heart, was observed in rats fed oxidized palm oil [32]. This decrease in heart weight persisted after αT supplementation and remained nonsignificant compared to the control group.

Antioxidant markers (GPx, SOD, CAT, GR, and α -tocopherol) and LPO were assessed to evaluate the extent of oxidative stress. In this study, LPO, which has been suggested to be due to enhanced oxidative stress (Figure 3), significantly increased in the OSO group. This result was associated with a significant reduction of αT levels, an altered membrane structure (Figure 5b), and enzyme inactivation (Figure 4). Moreover, it is an indication of the severity of OSO-induced necrotic damage of the heart. LPO, *in vivo*, has been identified as one of the basic deteriorative reactions in cellular mechanisms during myocardial ischemia [33]. The decrease in αT may be due to the participation of αT in the scavenging of ROS formed by oxidized oil and could result in the reduction of αT levels [34, 35], as observed in the testes and ventral prostate.

Histopathologically stained heart sections from rats that received OSO revealed the presence of large areas of necrosis (Figure 5b), suggesting that oxidized sunflower oil caused extensive damage to the heart.

The primary site of free radical damage in the heart cell is in the mitochondria. Indeed, extensive free radical attack contributes to DNA damage in the mitochondria, which cannot perform well, thus causing the cells to die [36]. GPx activity was significantly reduced in the heart tissue of OSO rats compared to the control group (Figure 4C). This reduction might be due to a decreased availability of its substrate, glutathione.

Inhibition of this enzyme results in the accumulation of these oxidants and makes myocardial cell membranes more susceptible to oxidative damage [37].

The activities of SOD and CAT decreased in the heart tissue of rats fed an OSO diet compared to the untreated group, although there was no significant change for SOD (Figures 4 A and 4B).

The reduction in CAT activity may reflect an inability of heart cells to eliminate hydrogen peroxide production stimulated by OSO ingestion, or a failure in the enzyme defense system caused by excess ROS production in heart cells.

Reciprocally, SOD protects CAT against inhibition by superoxide anion [30]. GR activity (Figure 4D) slightly decreased, suggesting inadequate levels of reducing equivalents (NADPH), and the significantly reduced activity of G6PDH (Figure 4E) indicates a failure to maintain GSH levels. The decrease in enzyme activity suggests potential damage to the heart as a consequence of free radical-mediated oxidative stress [31].

Supplementation with α T (600 mg · kg⁻¹, OSOE₁ group) increased the activities of antioxidant enzymes and α T levels and significantly reduced LPO, demonstrating the stress-stabilizing activity of α T in the rat heart when administered at a moderate concentration. α T increased the antioxidant enzymes' availability and was actively involved in the free radical scavenging mechanism. However, heart sections obtained from animals fed with FSO and OSO supplemented with α T (600 mg · kg⁻¹) retained their normal histology, showing normal myofibrillar structure with branched appearance and continuity with adjacent myofibrils (Figures 5a and 5c) and suggesting non-toxic properties of OSO if a moderate dose of α T was incorporated into the diet. It was assumed in this study that α T (600 mg · kg⁻¹) incorporated in the diet protected the rats against the deleterious effects of OSO. The main function of α T was to prevent the peroxidation of membrane phospholipids and to prevent cell membrane damage via antioxidant activity [30]. Thus, the antioxidant activity of vitamin E has the ability to prevent chronic diseases, particularly those believed to have an oxidative stress component, such as cardiovascular diseases, atherosclerosis, and cancer [38, 39].

Furthermore, supplementation of the OSO group with α T (1200 mg · kg⁻¹, OSOE₂ group) induced a significant increase in LPO and nearly always resulted in a nonsignificant decrease in SOD that was significant for α T, CAT, and GPx activities. Higher doses of α T for longer periods of time increased the level of LPO and attenuated the activity of antioxidant enzymes [40]. Upon encountering ROS, α T within lipids becomes oxidized, forming a tocopherol radical. If

the tocopherol radical is not eliminated, then there is an increase in LPO, a process known as tocopherol-mediated peroxidation [41].

The significant decrease in α -tocopherol can also be explained by 2,5,7,8-tetramethyl-2(29-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (α -CEHC), which is another metabolite of α -tocopherol. Its excretion increased when a specific plasma level of *RRR*- α -tocopherol was exceeded. The intact chromatin structure of this metabolite indicated that α -CEHC is derived from α -tocopherol, which does *not* react as an antioxidant. Thus, excretion of α -CEHC may be used as an indicator of an adequate or excess α -tocopherol supply [42]. Importantly, when the administered dose increases, the rate of α -tocopherol degradation decreases [43, 44], and absorption is a function of the ingested dose, with a decrease in the efficiency of absorption of higher intakes in humans and rats.

Although, supplementation with α T (1200 mg · kg⁻¹) resulted in more severe morphological changes than OSO alone, it caused significant changes in the nucleus and cellular morphology.

In this study, supplementation with α T (1200 mg · kg⁻¹) corrupted the heart tissue structure, although the cell changes and nuclear damage suggest a pro-oxidant effect of α -tocopherol.

Vitamin E, as any redox-active compound, may exert anti- and pro-oxidative effects depending on the reaction partners present in the environment. *In vitro* studies have shown that vitamin E may have pro-oxidant effects at high doses [28]. In *in vitro* models, the pro-oxidant effect of vitamin E on low-density lipoprotein (LDL) was correlated with the production of the α -tocopheroxyl radical [45]. Pro-oxidative functions of α T have been demonstrated in LDL isolated from healthy volunteers and from a patient with a defect in the α -tocopherol transfer protein (α -TTP) gene [35]. Kiron [7] demonstrated that high levels of vitamin E (1000 mg · kg⁻¹ tocopheryl acetate) no longer served as an antioxidant but as a pro-oxidant in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown under a mild oxidative stress.

In conclusion, OSO ingestion increased LPO and decreased the specific activities of antioxidant enzymes in rat heart cells, indicating an imbalance of the pro-oxidant/antioxidant system, resulting in oxidative stress that is efficiently reversed by α T supplementation. Thus, a moderate dose of dietary α T restored the activities of antioxidant enzymes under oxidative stress. However, increasing the amount of dietary α T reversed its activity, resulting in a pro-oxidant effect. Taken together, these results demonstrate that high vitamin E supplementation is a risk factor for the heart.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mr. Benabdessalem, Director of the Pasteur Institute (Algiers, Algeria), Mr. M.N. Menoueri of Blida 1 University (Algeria), and Mr. Ait Kaci of the Anatomical Pathology Service (Mustapha Hospital, Algiers, Algeria) for facilities and materials support.

References

- Drew, B. and Leeuwenburgh, C. (2002) Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959, 66–81.
- Srivastava, S., Singh, M., George, J., Bhui, K., Saxena, A.M. and Shukla, Y. (2010) Genotoxic and carcinogenic risks associated with the dietary consumption of repeatedly heated coconut oil. *Brit. J. Nutr.* 104, 1343–1352.
- Rikans, L.E. and Hornbrook, K.R. (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1362, 116–127.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Lee, M.H. and Shiau, S.Y. (2004) Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. *Fish Shellfish Immun.* 16, 475–485.
- Ammouche, A., Rouaki, F., Bitam, A. and Bellal, M.M. (2002) Effect of ingestion of thermally OSO on the fatty acid composition and antioxidant enzymes of rat liver and brain in development. *Ann. Nutr. Metab.* 46, 268–275.
- 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.
- 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.
- Blasiak, J., Gloc, E., Wozniak, K., Mlynarski, W., Stolarska, M., Skorski, T. and Majsterek, I. (2002) Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine. *Chem. Biol. Interact.* 140, 1–18.
- Miller, E.R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D. and Riemersma, R.A. Appel, L.J. and Guallar, E. (2005) Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Ann. Intern. Med.* 142, 37–46.
- Drozdowski, B. and Szukalska, E. (1987) A rapid instrumental method for evaluation of the stability of fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 1008–1011.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) National Academy Press, Washington, D.C.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2001) Eighth edition, The National Academies Press, Washington D.C.
- Association Française de Normalisation (1978) *Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés*, pp. 88–163, AFNOR.
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., De la Torre, M.C. and López-Sabater, M.C. (2000) Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 881, 251–254.
- Cuesta, C., Romero, A. and Sánchez-Muniz, F.J. (2001) Fatty acid changes in high oleic acid sunflower oil during successive deep-fat frying of frozen foods. *Food Sci. Technol. Int.* 7, 317–324.
- Buege, J.A. and Aust, S.D. (1976) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymol.* 52, 302–310.
- Paglia, D.E. and Valentine, W. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Marklund, S.L. (1985) Pyrogallol autoxidation. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Greenwald, R.A., ed.), pp. 243–547, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymol.* 105, 121–126.
- Beutler, E. (1984) *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*, 3rd ed., pp. 105–106, Grune and Startton, New York.
- Bergmeyer, H.U. (1963) *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 744–751 and 875–879, Academic Press, New York.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randaith, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–267.
- Desai, J.D. (1984) Vitamin E analysis method for animal tissues. *Methods in Enzymol.* 105, 138–147.

25. Bast, A., Haenen, G.R., Doelman, C.J. (1991) Oxidants and antioxidants: state of the art. *American Journal of Medicine*. 30, 2S–13S.
26. Topinka, J., Bincova, B., Sram, R.J. and Erin, A.N. (1989) The influence of alpha-tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 22,131–136.
27. Roberts, H.J.(1981) Perspective on vitamin E as therapy. *JAMA* 246, 129–31.
28. 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. *Journal of the American Chemical Society* 115, 6029–44.
29. Abudu, N., Miller, J.J., Attaelmannan, M. and Levinson, S.S. (2004) Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin. Chim. Acta* 339, 11–25.
30. 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.
31. Garrido-Polonio, C., Garc'a-Linares, M.C., Garc'a-Arias, M.T., L'opez-Varela, S., Garc'a-Fern'andez, M.C., Terpstra, A.H.M. and S'anchez-Muniz, F.J. (2004) Thermally oxidized sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Brit. J. Nutr.* 92, 257–265.
32. Dawson, E.B., Harris, W.A., Teter, M.C. and Powell, L.C. (1992) Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil. Steril.* 58, 1034–1039.
33. Venkataraman, P., Sridhar, M., Dhanammal, S., Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Srinivasan, N. and Arunakaran, J. (2004) Effects of vitamin supplementation on PCB (Aroclor1254)-induced changes in ventral prostatic androgen and estrogen receptors. *Endocr. Res.* 30, 469–480.
34. Murugesan, P., Muthusamy, T., Balasubramanian, K. and Arunakaran, J. (2005) Studies on the protective role of vitamin C and vitamin E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)-induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radic. Res.* 39, 1259–1272.
35. 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.
36. Singal, P.K., Kapur, N., Dhillon, K.S., Beamish, R.E. and Dhalla, N.S. (1983) Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can. J. Physiol. Pharm.* 60, 1390–1397.
37. Nwanguma, B.C., Achebe, A.C., Ezeanyika, L.U. and Eze, L.C. (1999) 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.
38. 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.
39. Rimm, E.R., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G.A. and Willett, W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.* 328, 1450–1456.
40. 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 anti-oxidant enzymes by vitamin E in the rat. *Redox Rep.* 13, 60–66.
41. Stocker, R. (1999) The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 24, 219–223.
42. Schultz, M., Leist, M., Petrzika, M., Gassmann, B., and Brigelius-Floh'e, R. (1995) Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (Suppl.) 1527S–1534S
43. Traber, M.G., Kayden, H.J., Green, J.B. and Green, M.H. (1986) Absorption of water-miscible forms of vitamin E in a patient with cholestasis and in thoracic duct-cannulated rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 914–923.
44. Rock, C.L., Thornquist, M.D., Kristal, A.R., Patterson, R.E., Cooper, D.A., Neuhouser, M.L., Neumark-Sztainer, D. and Cheskin L.J. (1999) Demographic, dietary and lifestyle factors differentially explain variability in serum carotenoids and fat-soluble vitamins: baseline results from the sentinel site of the Olestra Post-Marketing Surveillance Study. *J. Nutr.* 129, 855–864.
45. Bowry, V.W., Mohr, D., Cleary, J. and Stocker, R. (1995) Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 270, 5756–5763.

Fayrouz Rouaki

Department of Biology
Faculty of Life and Natural Sciences,
Blida 1 University
B.P. 270, Blida
Algeria