

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS.
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire/ Biologie moléculaire des procaryotes

Thème

**Contribution à l'étude de l'effet protecteur de certains antioxydants
contre le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène.**

Présenté par :

- Boudjehem Meriem
- Tadjine Sarra

Devant le jury composé de :

Président : M^{me} L. Bendjeddou Dalila (Pr.)
Examineur : M^{me} S. Braik Asma (M.A.B.)
Promoteur : Mr. Benouareth Djamel Eddine (Pr.)

Juin 2011

Remerciements

Nous remercions DIEU pour nous avoir éclairé le chemin vers le savoir.

Nos remerciements vont au Pr. Benouareth D.E pour nous avoir encadré et donné de son temps ainsi qu'au Pr. Bendjeddou D. pour avoir accepté de présider notre jury et à Mme. Braïk A. pour avoir examiné notre travail.

Nos sincères remerciements à Mr. Djekoun M. pour sa disponibilité et ses constants encouragements, à Mr. Ghrieb L. pour sa présence et son soutien et à Mr. Houhamdi M. pour son aide.

Nos remerciements vont également au Dr. Benmarce H., médecin spécialiste en biochimie médicale ainsi qu'au Dr. Tabet A. pour leur aide.

Un très grand merci à notre amie SAWSEN pour sa présence et son soutien infailible.

Enfin, nous remercions nos collègues qui nous ont aidé lors de la réalisation de notre travail en l'occurrence : Nadir, Mehdi et Housseem.

Dédicaces

Je dédie ce travail ...

*A ceux qui m'ont donné la vie et qui n'ont ménagé aucun
effort pour ma réussite*

Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance.

*A mon frère qui a toujours été présent et qui m'a beaucoup
aidé lors de la réalisation de ce travail.*

A tous ceux que j'aime.

SARRA

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes parents,
Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout
au long de mes études*

A ma sœur et mes frères, que Dieu les bénisses

A ma nièce Tasnime et mon neveu Mouhamed

A tous mes collègues et mes amies

A tous ceux que j'aime

MERIEM

Produced with Scantopdf

Sommaire

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Le stress oxydant

Page

I-1. Définition

1

I-2. Les causes du stress oxydatif

2

I-3. Evaluation du Statut du Stress Oxydant (SSO)

3

I-3-1. Les antioxydants enzymatiques et de bas poids moléculaire

5

I-3-2. Les oligoéléments

6

I-3-3. Les marqueurs biologiques du stress oxydant

6

I-3-4. Le statut du fer

6

I-3-5. Le radical du monoxyde d'azote (NO°)

7

I-3-6. La résonance paramagnétique électronique (RPE)

7

I-3-7. Le glucose

7

Chapitre II : les oxydant

II-1. Définition

8

II-2. Les radicaux libres dans l'organisme

8

II-2-1. Les radicaux primaires

8

II-2-2. Les radicaux secondaire

8

II-2-3. D'autres espèces dérivant de l'oxygène

8

II-3. Les origines des radicaux libres

9

II-3-1. Les lipoxgénases

9

II-3-2.La xanthine-oxydase	10
II- 3-3. Les métaux	10
II-3-4.La fumée de cigarette	11
II-3-5.Les photosensibilisants	12
II-3-6.Les xénobiotiques	13
II-3-7.L'alcool	13
II-3-8.L'amiante	13
II-3-9.Les ultra-sons	14
II-4. Les caractéristiques des radicaux libres	14
II-5. Les molécules cibles	15
II-5-1.L'acide nucléique	15
II-5-2.Protéines	15
II-5-3.Lipides	15
II-6.Rôle physiologique des EOA	16
II-7.Le peroxyde d'hydrogène	16
II-7-1.Définition	16
II-7-2.Caractéristiques	16
II-7-3.Mécanisme d'action	17
Chapitre III : les antioxydants	
III-1. Définition	18
III-2.La cascade antioxydative	18
III-3.Les antioxydants de l'organisme	19
III-3-1.Le glutathion	19
III-3-2.Les acides lipoïques	19

III-3-3. Les glutathion-enzymes	19
III-3-4. Les superoxydes –dismutases	20
III-3-5. Les catalases	21
III-3-6. Les peroxydases	21
III-4. Les antioxydants exogènes	21
III-4-1. L'acide ascorbique	21
III-4-2. Les tocophérols	22
III-4-3. Les caroténoïdes	23
III-4-4. Le sélénium	23
III-4-5. Les antioxydants de source végétale	23
III-4-6. Les antioxydants obtenus par synthèse biologique	24
III-4-7. Le romarin	25
Chapitre IV : Conséquences du stress oxydant sur la santé	
IV-1. Le diabète	27
IV-1-1. Définition	27
IV-1-2. Les différents types de diabète	27
IV-1-3. Stress oxydatif et diabète	28
IV-1-4. Les sources des radicaux libres lors d'une hyperglycémie	30
IV-2. Le cancer	32
IV-2-1. Définition	32
IV-2-2. Les types de cancer	32
IV-2-3. Le développement du cancer	33
IV-2-4. Stress oxydant et cancer	33
Partie : Expérimentale	
I-Matériel et Méthodes	35

Liste des figures

Page

Figure 1 : Déséquilibre de la balance entre EOA et antioxydants	1
Figure 2 : Les différentes causes du stress oxydatif	2
Figure 3 : Oxydation en carbone 8 de la base guanine	15
Figure 4 : <i>Rosmarinus officinalis</i>	26
Figure 5 : Représentation schématique de différentes étapes de la cancérogénèse	32
Figure 6 : Matériel biologique (souris blanche)	35
Figure 7 : Gavage avec une épicroânienne	36
Figure 8 : Gavage au goutte à goutte	36
Figure 9 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental	37
Figure 10: Injection du peroxyde d'hydrogène	38
Figure 11: Sacrifice des souris	38
Figure 12: collecte du sang après sacrifice	39
Figure 13: Collecte du sang dans des tubes héparinés	39
Figure 14: Résultats du dosage de la glycémie	40
Figure 15: Résultats du dosage de l'urée sanguine	41
Figure 16: Résultats du dosage de la créatinine	42
Figure 17: Résultats du dosage du cholestérol	43
Figure 18: Résultats du dosage des triglycérides	44
Figure 19: Résultats du dosage de la LDL	45

Liste des abréviations

ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ATB	: Acide ThioBarbiturique
ATP	: Adinosine tri phosphate
CoQ10	: Ubiquinone
CoQ10H₂	: Ubiquinol-10
Cu	: Cuivre
DCFH-DA	: DichloroFluorescein-Diacetate Assay
DID	: Diabète insulino dépendant
DNID	: Diabète non insulino dépendant
EOA	: Espèces Oxygénées Activées
Fe⁺⁺	: Fer ferreux
FR	: Free Radical
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Potential
GLUT4	: Transporteur de Glucose
GSH	: Glutathion
GSSH	: Glutathion Oxydé
GPx	: Glutathion Peroxydase
H⁺	: Ion hydrogen
HAD	: Hormone Antidiurétique
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HETE	: HydroxyEicosaTetraEnoïque
HO₂^o	: Radical perhydroxyle
HOONO₂	: Peroxynitrique
INS-1	: Insuline Receptor Substrate-1
KG	: Kilogramme
LDL	: Low Density Lipoprotein
LPIC	: Lipid peroxidation Inhibition Capacity
MAP Kinases	: Mitogen Activated Proteins Kinases
MDA	: MalonDiAldéhyde
Mn	: Manganèse

NAD	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADP+	: Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NNK	: Méthylnitroso-pyridyl-butanone
NO	: Monoxyde d'Azote
NOS	: Monoxyde d'azote synthase
NO[•]	: Radical du monoxyde d'Azote
NO₂	: dioxyde d'azote
O₂^{•-}	: Anion superoxide
1/2 O₂	: Oxygène singlet
OH	: Hème Oxygénase
OH	: Hydroxyle
OH[•]	: Radical hydroxyle
ONOOH	: Nitroperoxyde
ONOO-	: Peroxynitrite
ORAC	: Oxygen Radical Absorbance Capacity
R[•]	: Radicale libre
RO[•]	: Radical alkoxyle
RO₂[•]	: Radical peroxyde
RPE	: Résonance Paramagnétique Electronique
-S-S-	: Fraction cystinique
SH	: Protéines à groupement thiol
SOD	: Superoxide Dismutase
SSO	: Statut du Stress Oxydant
TBARS	: Espèces réactives de l'acide thiobarbiturique
TEAC	: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TRAP	: Total Radical-trapping Antioxidant Potential
TRx	: Thiorédoxine
TRxR	: Thiorédoxine Réductase
UV	: Ultra Violet
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein
Zn	: Zinc

INTRODUCTION

Produced with ScanTOPDF

INTRODUCTION

L'oxygène est un élément indispensable à la vie qui produit, dans la mitochondrie, des espèces oxygénées activées (EOA) toxiques pour l'intégrité cellulaire, les EOA peuvent, également, être générées sous l'effet d'oxydants environnementaux tels que la pollution, l'exposition prolongée au soleil et le tabagisme qui sont des situations qui induisent la production d'EOA dans l'organisme ce qui conduit à un affaiblissement dans les défenses anti-oxydantes (vitamines et oligoéléments) de ce dernier et l'apparition de dégâts cellulaires.

Pour se protéger contre cet effet toxique, l'organisme a développé des systèmes de défense basés sur des composés antioxydants comme les vitamines A, C et E, d'oligoéléments et de protéines empêchant le fer de déclencher une production d'EOA) permettant de réguler la production des EOA, ceci en plus des antioxydants naturels nécessaires au contrôle des effets nocifs de l'oxygène et qui sont présents dans une alimentation saine et équilibrée.

Un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et des systèmes de défense conduit à un stress oxydant qui cause des dégâts, le plus souvent irréversibles, pour la cellule (1):

Dans ce travail, nous allons essayer de tester l'effet protecteur de certaines substances, connues comme antioxydantes, qui sont : la vitamine C, la vitamine E et le romarin contre le stress oxydant induit suite à l'administration de l'eau oxygénée chez la souris.

PARTIE :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Produced with Scantopdf

CHAPITRE I :

LE STRESS OXYDANT

Produced with ScanTOPDF

I-1. Définition :

Le stress oxydatif est une perturbation du statut oxydatif intracellulaire induite soit par production excessive de radicaux libres soit par la diminution de la capacité de défense anti-oxydante.

Cette agression (oxydation) dénature les lipides, les protéines, les oses et même l'ADN et par là les membranes cellulaires et les cellules elles même et ceci selon l'intensité et la durée de production des radicaux libres :

- Lorsque cette production est récurrente ou chronique (modérée dans l'intensité) la balance entre radicaux libres et système de détoxification de la cellule est perturbée de manière continue c'est le stress oxydatif. (fig.1)

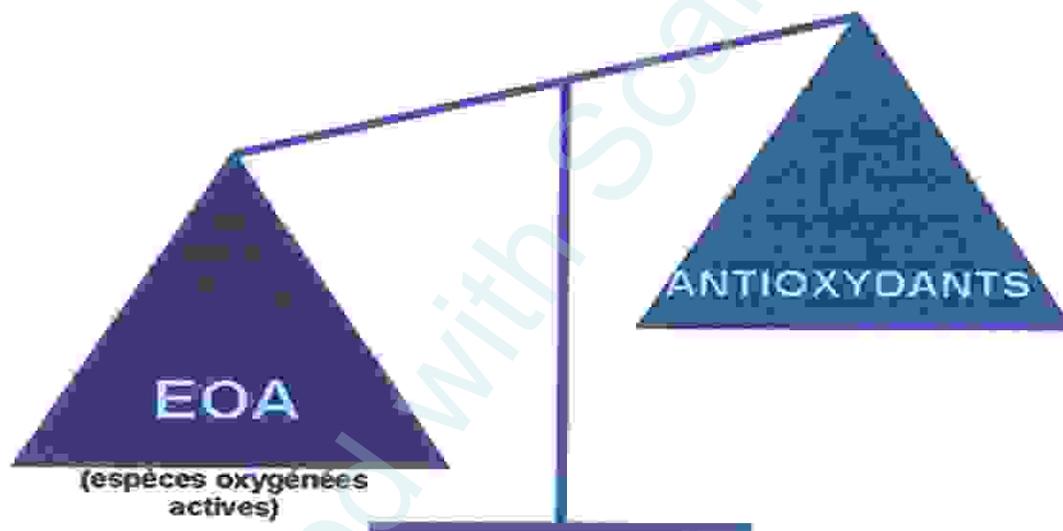


Figure 1 : Déséquilibre de la balance entre EOA et antioxydants (2).

- Si la production des radicaux libres est suffisamment importante pour altérer, de manière irréversible, des processus cellulaires vitaux ; elle déclenche l'apoptose car lorsque les radicaux libres sont générés en quantités massives ils entraînent la nécrose cellulaire (3).

I-2. Les causes du stress oxydatif :

In vivo, la production excessive d'EOA peut résulter de plusieurs systèmes biochimiques tels que l'altération de la chaîne de transport des électrons au sein de la

mitochondrie qui se produit lors du processus de vieillissement et en présence du phénomène d'ischémie-reperfusion.

En plus des deux phénomènes biologiques sus-cités, il existe beaucoup d'autres phénomènes qui conduisent à une surproduction d'EOA et qui sont : l'inflammation, l'activation de la xanthine oxydase, l'oxydation de l'hémoglobine, la libération de fer libre, le métabolisme accru des prostaglandines et enfin l'activation des cellules endothéliales.

Si les facteurs (augmentant le stress oxydant) précédemment cités sont strictement biologiques, il existe d'autres facteurs environnementaux et comportementaux qui favorisent considérablement le stress oxydatif et qui sont : l'ozonothérapie, le stress intellectuel, le stress thermique, la pollution, la consommation excessive d'alcool, la prise de certains médicaments, la pratique trop intense ou mal gérée d'un sport, le tabagisme, l'exposition aux radiations, l'exposition prolongée au soleil, le contact avec les substances cancérigènes, les agents infectieux et enfin une alimentation déséquilibrée. (fig.2)

Ces facteurs provoquent souvent une activation des globules blancs qui se traduit par une augmentation de 400% de la consommation en oxygène (1).



Figure 2 : Les différentes causes du stress oxydatif (4).

I-3. Evaluation du Statut du Stress Oxydant (SSO) :

La détermination du SSO nécessite une batterie d'analyses et est axée sur plusieurs grands axes (1):

I-3-1. Les antioxydants enzymatiques de bas poids moléculaire :

a) Les superoxydes dismutases (SOD) :

La superoxyde dismutase est une enzyme qui assure l'élimination de l'anion superoxyde et delà elle assure aussi la première ligne de défense contre le stress oxydant. Afin de bien fonctionner, cette enzyme a besoin d'oligoéléments tels que le Cu, le Zn et le Mn.

En présence de stress oxydatif, le taux de SOD variera. En effet, dans un premier temps (lors d'un stress oxydatif modéré) il y aura surexpression de la SOD mais si le stress oxydant perdure, l'organisme détruira cette SOD.

Une concentration trop élevée en SOD peut constituer un véritable danger pour l'organisme. [Levine SA and Kidd ., 1996] et [Mena *et al.*, 1991]

b) La glutathion peroxydase (GPx) :

C'est une enzyme qui élimine les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.

Tout comme la SOD, cette enzyme aura deux comportements selon le type de stress :

- ✓ Stress modéré : surexpression de l'enzyme
- ✓ Stress oxydant qui perdure : diminution de l'activité enzymatique (GPx) [Nève *et al.*, 1989].

c) Les thiorédoxines (TRx) et la thiorédoxine réductase (TRxR) :

Les thiorédoxines sont des enzymes (protéines à groupement thiol « SH ») à activité antioxydante intrinsèque en plus du rôle qu'elles jouent dans la régulation du système immunitaire. [Hattori *et al.*, 2003] et [Moran ., 2001] Dès son oxydation, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase qui intervient, également, dans la dégradation des

peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.

d) La hème oxygénase (HO) :

Dans l'organisme, la HO intervient dans la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer. Son effet protecteur contre le stress oxydatif est basé sur le fait que, après avoir été formée, la biliverdine se transforme en bilirubine qui est un puissant antioxydant. Aussi, le fer produit stimule la synthèse de la ferritine impliquée dans la réponse anti-oxydante à long terme [Ryter and Tyrrell., 2000].

e) Les protéines du stress thermique :

Elles interviennent lors de la réparation des dommages induits, au niveau des protéines, par le stress oxydatif. En effet, ces protéines permettent aux cellules de résister à un environnement hostile en prolongeant leur viabilité jusqu'à l'apparition de conditions plus favorables. L'augmentation de la synthèse de ces protéines doit donc être considérée comme une réponse d'adaptation au stress oxydant induit par différentes conditions : régulation thermique (hypothermie et hyperthermie), acidose, déplétion énergétique, phénomène d'ischémie – reperfusion, infection virale, exercice physique [Kregel., 2002].

f) Les caroténoïdes :

Après dégradation les caroténoïdes servent de précurseurs à la vitamine A. Ils interagissent avec l'oxygène singulet et empêchent, ainsi, l'oxydation de plusieurs substrats biologiques tels que les acides gras polyinsaturés [Gey *et al.*, 1993].

g) La vitamine C :

Excellent piègeur des EOA qui protège divers substrats biologiques de l'oxydation. En effet, l'acide ascorbique empêche l'oxydation des LDL et joue un très grand rôle dans la régénération de la vitamine E oxydée.

h) La vitamine E :

Son caractère hydrophobe lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la peroxydation lipidique causée par le stress oxydant.

Etant donné que la vitamine E est transportée par les lipides, sa concentration est toujours standardisée par rapport au cholestérol ou aux lipides totaux [El-Sohemy *et al.*, 2002].

i) Le glutathion (GSH) :

Tripeptide utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase et pouvant interagir, directement, avec les EOA ceci en plus du rôle qu'il joue dans l'expression des gènes qui codent pour des protéines pro/anti-oxydantes.

Le calcul du rapport GSH/GSSG (= glutathion/glutathion oxydé) donne une idée précise du stress oxydant enduré [Jones *et al.*, 2002].

j) Les protéines thiols :

Ces protéines possèdent un groupement thiol (SH) qui interagit avec les EOA. L'albumine possédant des groupements thiol peut être considérée comme un des principaux antioxydants du plasma. Ce Test est complémentaire au dosage du GSH.

k) L'acide urique :

C'est le produit terminal majeur du métabolisme des purines chez les primates et peut interagir avec les EOA.

Il augmente lors du stress oxydant particulièrement lors des phénomènes d'ischémie-perfusion.

l) Le coenzyme Q10 :

L'ubiquinone (CoQ10) sous sa forme réduite (ubiquinol-10 = CoQ10H₂) possède des propriétés anti-oxydantes car il peut inhiber la peroxydation lipidique [Ernster and Daliner., 1995] et [Alleva *et al.*, 1997].

Afin d'évaluer le rôle du CoQ10 dans la protection contre les EOA, on doit calculer le rapport CoQ10H₂/CoQ10 [Lagendijk *et al.*, 1996].

m) la capacité anti-oxydante globale :

Ce test consiste à évaluer la capacité du sang complet ou du plasma à inhiber la production d'EOA générées *in vitro*.

Cette méthode est la sommation des activités individuelles de chaque antioxydant présent dans ces milieux biologiques et il existe plusieurs tests qui se différencient selon le système producteur d'EOA, la cible biologique à oxyder et le système de détection [Ghiselli *et al.*, 2000]. Ces tests sont :

- Lipid Peroxidation Inhibition Capacity (LPIC)
- Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)
- Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP)
- Total Radical-trapping Antioxidant Potential (TRAP)
- Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)
- DiChloroFluorescein-Diacetate Assay (DCFH-DA) (1).

I-3-2. Les oligoéléments :

Le sélénium n'est pas un antioxydant à part entière mais un cofacteur de la glutathion peroxydase. Le cuivre est un métal de transition qui joue un rôle primordial dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation des EOA, néanmoins cet oligoélément est un cofacteur essentiel de la SOD. Pour ce qui est du zinc, c'est un cofacteur de la SOD et sa consommation conduit, à long terme, à l'induction des protéines antioxydantes et la protection des groupements thiol des protéines. De plus le zinc peut inhiber les réactions de formation des EOA induites par le fer et le cuivre (1).

I-3-3. Les marqueurs biologiques du stress oxydant :

Les EOA interagissent avec beaucoup de substrats biologiques comme les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (ADN).

La mise en évidence des dérivés de ces substrats sera considérée comme marqueur biologique du stress oxydant (1).

I-3-4. Le statut du fer :

Le fer libre est un catalyseur de la formation des EOA ce qui fait de l'analyse des protéines transporteuses de fer un élément important dans l'établissement de SSO.

La ferritine (protéine où est stocké le fer intracellulaire non métabolisé) joue un rôle très important dans la régulation de la disponibilité du fer libre qui est un catalyseur des

réactions de formation des EOA. L'augmentation du taux de ferritine constitue une réponse adaptative au stress oxydant (1).

I-3-5. Le radical du monoxyde d'azote (NO°) :

C'est un radical dérivé de l'azote et produit par les cellules endothéliales. Le NO° joue un très grand rôle dans la régulation de la pression sanguine.

Lors d'un stress oxydant, il y a excès de ce radical dû à un mauvais fonctionnement des cellules endothéliales. Ce radical interagira avec les radicaux libres oxygénés afin de former les peroxynitriques (HOONO) [Jourdeuil *et al.*, (2000), Morton *et al.*, (2002)].

I-3-6. La résonance paramagnétique électronique (RPE) :

Technique permettant la visualisation directe des radicaux libres caractérisés par la présence d'un électron libre qui, en tournant sur lui-même, induit un champ magnétique dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans l'échantillon biologique analysé. De ce fait, cette technique permet une mesure quantitative de la production de radicaux libres [Pietri *et al.*, 1994].

I-3-7. Le glucose :

Par auto-oxydation, le glucose produit de grandes quantités d'EOA et de glyoxal. Ce dernier se fixe sur le groupement amine des protéines avec comme conséquence l'apparition de résidus carboxyméthyl-lysine (protéines âgées) qui ont la capacité de fixer le cuivre et d'induire un processus de peroxydation lipidique, ce qui entraîne une augmentation de la production de glyoxal. Le glucose lui-même peut se combiner à l'hémoglobine pour donner l'hémoglobine glycosylée. Une augmentation de ces marqueurs se retrouve bien sûr chez des patients souffrant de diabète, pathologie clairement associée à une situation très importante de stress oxydant [Kalousova *et al.*, 2002].

CHAPITRE II :

LES OXYDANTS

Produced with ScanTOPDF

II-1. Définition :

Un radical libre est une molécule instable qui, si elle n'est pas neutralisée par des antioxydants (vitamines, enzymes ou minéraux) endommage, de manière irréversible, les principaux constituants de la cellule (membranes, protéines, et ADN) (5).

En effet cet élément, chimique, déstabilisé (possédant un électron libre sur son orbital externe) (6) peut-être à l'origine de rupture des liaisons entre les différents constituants de la cellule et c'est exactement ce qui rend les radicaux libres très toxiques pour la santé (7).

II-2. Les radicaux libres dans l'organisme :

On distingue trois groupes d'espèces radicalaires dans l'organisme

II-2-1. Les radicaux primaires :

Sont constitués d'un ensemble de composés radicalaires qui dérive de l'oxygène par la réduction à un électron tel que l'anion superoxydé ($O_2^{\bullet-}$) et l'hydroxyle (OH) [Darley-Usmar *et al.*, 1995].

II-2-2. Les radicaux secondaires :

Les radicaux libres « secondaires », sont issus de l'interaction des radicaux libres primaires avec des composés biochimiques cellulaires (acides gras polyinsaturés, glucides, acides aminés ou protéines) [Pournaras., 2008].

II-2-3. D'autres espèces dérivant de l'oxygène :

Ces espèces ne sont pas des radicaux libres, mais peuvent être des précurseurs de certains radicaux libres tels que l'oxygène singlet $1/2 O_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)... etc. [Delattre., 2005]. (Tab. I)

Tableau I : liste de quelques radicaux libres et leurs dérivés [Delattre., 2005].

<i>Radicaux libres primaires</i>	<i>Dérivés oxygénés non radicalaires</i>
$O_2^{\circ -}$ = Radical superoxyde.	$1/2O_2$ = Oxygène singulet
HO_2° = Radical perhydroxyle	H_2O_2 = Peroxyde d'hydrogène.
$^{\circ}OH$ = Radical hydroxyle	$ONOOH$ = Nitroperoxyde
RO_2° = Radical peroxyde	$ONOO^-$ = Peroxynitrite
RO° = Radical alkoxyde.	
NO° = monoxyde d'azote	

II-3. Les origines des radicaux libres :

La principale origine des radicaux libres, *in vitro*, c'est les radiations solaires qui activent l'oxygène de l'air provoquant ainsi la formation de l'oxygène singulet (qui est un radical libre) responsable de la phase départ de l'oxydation des matières grasses.

Dans l'organisme (*in vivo*) l'origine des radicaux libres sont des promoteurs ou des catalyseurs des réactions autrement dit des enzymes (complexes comprenant des protéines souvent combinées à des métaux) qui provoquent l'oxydation des chaînes grasses de l'organisme et qui sont : les lipoxygénases et la xanthine-oxydase [Morelle., 2003].

II-3-1. Les lipoxygénases :

Enzymes responsables de l'oxydation des lipides très répandus dans la nature (tant chez les végétaux que chez les animaux).

Ce sont des promoteurs d'oxydation dont l'activité, selon certains Auteurs, augmente avec l'âge.

Ces enzymes sont responsables de l'oxydation de l'acide arachidonique des membranes cellulaires en générant de nouvelles structures riches en oxygène actif (libre) déterminantes sur l'état de santé.

La dégradation oxydative de l'acide arachidonique conduit, selon l'emplacement des oxygènes dans la molécule, à une série de combinaisons dénommées acide HydroxyEicosaTetraEnoïque (HETE).

Chez les végétaux, ces enzymes conduisent à des acides gras qui véhiculent l'oxygène agressif. Les lipoxygénases végétales produisent, comme chez les animaux, du MalonDiAldéhyde (MDA). Il est à noter que l'activité des lipoxygénases est inhibée par le chauffage [Morelle., 2003].

II-3-2. La xanthine-oxydase :

C'est une enzyme oxydante extraite principalement du lait et du beurre et se trouvant dans tous les tissus et pouvant être une source importante de radical superoxyde.

C'est une enzyme très puissante car elle dégrade les acides polyinsaturés conduisant ainsi à de dangereuses structures aldéhydiques dont le MDA.

La teneur de la xanthine-oxydase serait relativement élevée dans les tumeurs cérébrales.

Cette enzyme, omniprésente, dans les tissus, est une importante source d'oxygène actif dont l'activité est réduite grâce aux antioxydants naturels (tels que le glutathion) ainsi que ceux qui proviennent de l'alimentation [Morelle., 2003].

En plus des promoteurs naturels (les enzymes) des radicaux libres, il y a beaucoup d'autres promoteurs dont :

II- 3-3. Les métaux :

Il est bien connu de nos jours que le fer , comme l'oxygène , est un agent double c'est-à-dire que d'un côté il joue un très grand rôle comme catalyseur de peroxydation des lipides cellulaires et d'un autre côté lorsqu'il est combiné à des protéines , il joue un rôle protecteur .

En effet, *in vitro*, des traces de ce métal introduites dans un homogénéisant de cerveau provoquent très vite la réaction colorée avec l'Acide ThioBarbiturique (ATB) montrant la formation de MDA.

En plus de l'hémoglobine, il existe dans le sang d'autres complexe protéiniques, tels que la lactoferrine générée par les macrophages (caractérisant le lait humain et absente dans le lait de vaches). Il y a aussi la transferrine (intervenant dans la synthèse de l'hémoglobine) la ferritine (riches en fer et dotées de capacités antioxydantes temporaires, disparaissant en cas

d'excès de fer), la déferoxamine (métalloprotéine protégeant le cerveau des dommages que peut lui causer l'augmentation des radicaux libres) [Morelle., 2003].

II-3-4. La fumée de cigarette :

Cette fumée comporte plusieurs substances toxiques : dioxyde d'azote, peroxydes, radicaux libres, ... etc., ainsi qu'une substance cancérigène détectée dans l'urine des fumeurs en 1997 et dénommée : Méthylnitroso-pyridyl-butanone (NNK).

Il a été prouvé que les radicaux libres jouent un rôle très important dans la toxicité des fumées, à titre d'exemple, il a été constaté que chez les victimes d'incendies le taux de MDA augmente significativement dans leur sang.

Les chercheurs ont, curieusement, trouvé que la présence du MDA est moins importante dans la fumée de cigarette sans filtre qu'avec filtre. Ainsi pour des cigarettes avec filtre, les chercheurs ont trouvé pour 1 KG de cigarettes brûlées entre 15 et 45 mg de MDA, tandis que pour les cigarettes sans filtre la fumée n'en contient que 2 à 25 mg.

Il a été, également, observé que les fumeurs de cigarettes présentent un nombre nettement supérieur de leucocytes, par rapport aux non fumeurs, les radicaux libres étant impliqués dans ce dysfonctionnement caractérisé, de plus, par une diminution du bêta-carotène (antioxydants de la carotte).

Les composantes de la fumée de cigarettes provoquant, systématiquement, une diminution des antioxydants du plasma sanguin. En effet, un fumeur consomme trois à quatre fois plus de vitamine C. Une diminution de la concentration de la vitamine C entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes et leur mobilité et c'est ainsi que la consommation de tabac peut avoir une conséquence sur la fécondité masculine.

Des auteurs ont, également, indiqué que les érythrocytes des fumeurs montraient une augmentation du glutathion réduit (SH) et de la catalase (enzyme antioxydante) qui correspondrait à une activation des macrophages producteurs de radicaux libres.

Selon des études, conduites par des chercheurs japonais, réalisées sur des collégiens, les fumeurs présenteraient d'une part, des tests de culture physique inférieurs à ceux des non fumeurs (les résultats étaient fonction du nombre de cigarettes consommées) et d'autre part des perturbations au niveau des protéines sanguines et du cholestérol accompagnées

d'oxydation des lipoprotéines légères (responsables, entre autre, des maladies cardio-vasculaires) [Morelle., 2003].

II-3-5. Les photosensibilisants :

La photosensibilisation concerne la peau rendue sensible aux radiations solaires par application externe ou par absorption de molécules capables de stocker de l'énergie générant des combinaisons chimiques qui conduisent à une réaction phototoxique immédiate.

En 1913, des chercheurs ont démontré l'existence de substances issues de la dégradation de la chlorophylle par perte de magnésium. Vingt ans après, des phénomènes de photosensibilisation chez les moutons et les bovins ont été constatés.

Ces phénomènes étaient dus à la dégradation de la chlorophylle. Par la suite ces mêmes phénomènes furent constatés chez des rats nourris avec du maïs déshydraté et il a été démontré que la phéoforbide (substance provenant de l'altération de la chlorophylle) été responsable de cette photosensibilisation.

Des chercheurs japonais ont fait état de dermatoses provoquées par des tablettes de chlorella (algue) dont l'ingestion provoquait une réaction importante du sang à l'ATB.

De plus, lorsque la phéoforbide était injectée à l'animal, il était observé une chute importante de l'acide arachidonique dans les membranes cellulaires, signifiant une action oxydative.

Dans l'organisme, il existe des pigments capables d'intervenir dans la photosensibilisation. C'est le cas des porphyrines (photosensibilisants endogènes) responsables de certaines photodermatoses, telles que la porphyrie cutanée, par production d'un radical libre très actif qui est l'oxygène singulet.

Il existe dans la nature des géoporphyrines ou métalloporphyrines qui sont des structures qui sont toujours associées à des métaux et qui sont : le bitume, le charbon, et le pétrole.

Parmi les photosensibilisants exogènes figurent les furocoumarines appelées aussi les psoralènes.

Utilisés dans la préparation des compositions antisolaires et dont l'agressivité a donné lieu à un grand nombre d'études dans lesquelles il a été démontré que sous l'influence des radiations solaires, les psoralènes peuvent conduire à des manifestations cancéreuses.

Les furocoumarines sont des composés présents dans de nombreuses plantes (légumes, fruits et herbes) mais surtout dans la bergomate, utilisée dans la fabrication des eaux de Cologne et qui sous l'effet du soleil, provoquent des taches pigmentaires ce qui a amené les chercheurs à les proposer, il y a une quarantaine d'année, comme traitement du vitiligo [Morelle., 2003].

II-3-6. Les xénobiotiques :

Ce sont des substances non peroxydantes par elles-mêmes mais qui peuvent, au cours de leur transformation métabolique, générer des radicaux libres. Les xénobiotiques les plus étudiés sont : l'alcool et le tétrachlorure de carbone. Ainsi, tous les dérivés chlorés comme le trichloréthylène, utilisé comme détachant, sont toxiques pour le foie et les reins.

En effet, il a été constaté qu'un gramme/kg de ce solvant, dans de l'huile, administré dans la nourriture du rat, provoquait six heures après, une diminution importante du glutathion SH, une augmentation du MDA et l'exhalation d'éthane.

On sait aujourd'hui que la toxicité de ces produits est due à leurs effets de stimulation du système d'oxydation des lipides hépatiques produisant du MDA et l'exhalation de l'hexane et du pentane. Cette toxicité peut être réduite par la vitamine E [Morelle., 2003].

II-3-7. L'alcool :

La toxicité de l'alcool est due aux lipides peroxydés. L'intoxication chronique conduit à des dommages au niveau des mitochondries hépatiques. Tandis que l'intoxication aiguë provoque l'apparition de radicaux libres issus de la transformation de l'alcool en acétaldéhyde, principalement au niveau du cerveau, formant un nouveau radical spécifique à la dégradation oxydative de l'alcool. L'activité oxydante des dérivés de l'alcool est démontrée par l'exhalation d'éthane et la formation de MDA [Morelle., 2003].

II-3-8. L'amiante :

L'amiante est un minéral appelé aussi « asbeste » et qui existe sous deux formes : la crocidolite et la chrysolite.

En raison de sa toxicité pulmonaire et de son action cancérigène, l'amiante a fait l'objet de nombreuses études qui ont prouvé que les fibres d'amiante seules ne sont pas mutagènes mais qu'elles le deviennent sous l'influence de la lumière.

La toxicité de l'asbeste est due à l'intervention des radicaux libres générés par les macrophages qui en présence de chrysolite produisent des peroxydes et du MDA.

Il a été démontré qu'en plus de se loger dans les poumons, les poussières d'amiante migraient dans le sang et le foie.

Les fibres de plus de 10 μm sont désactivées soit par les antioxydants tels que la SOD soit par certains produits tels que le mannitol alors que l'action des fibres plus petites (2 μm) ne peut être neutralisée par les piègeurs de radicaux libres et l'action cancérigène de l'amiante n'est plus à démontrer [Morelle., 2003].

II-3-9. Les ultra-sons :

Aucune molécule ne reste inerte à l'action des ultra-sons, même l'eau fournit un radical libre. En effet, les ultra-sons sont capables de dégrader de nombreuses substances provoquant ainsi la formation de peroxydes.

Des études ont montré que la sonolyse pouvait conduire à des radicaux libres dégradant l'ADN, et que les ultra-sons provoquaient des lipoperoxydes et du MDA. En plus les ultra-sons inactivent les enzymes qui protègent l'organisme de l'action des radicaux libres [Morelle., 2003].

II-4. Les caractéristiques des radicaux libres :

- Ils sont représentés par R° , du fait de leur grande réactivité, les radicaux libres ont une durée de vie très courte, (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-6} secondes) (6).
- Leur formation est assurée soit par rupture de liaison homolytique soit par transfert d'électron par apport d'énergie (8).
- La stabilité diffère d'un radical à un autre, les molécules très instables vont vite réagir avec les molécules voisines tandis que les molécules qui ont une instabilité modérée auront tendance à agir loin du site de production et à propager le stress oxydant (6) et [Lentender., 2009].

II-5. Les molécules cibles:

Toutes les molécules cellulaires sont des cibles potentielles des EOA [Barouki.,2006].

II-5-1.L'acide nucléique :

Les bases nucléiques sont susceptibles d'être oxydées telle que « la guanine », conduisant ainsi à la formation de 8-oxo-guanine (fig.3) capable d'induire des mutations spécifiques entraînant ainsi le développement d'un cancer [Pincemail *et al.*,1999 a].

Certains radicaux libres peuvent aussi agir sur les oses et donner lieu à des coupures double ou simple brin (la formation de sites abasiques), et lorsque ces dommages sont très importants, la cellule peut entrer en sénescence ou en apoptose [Lentender.,2009].

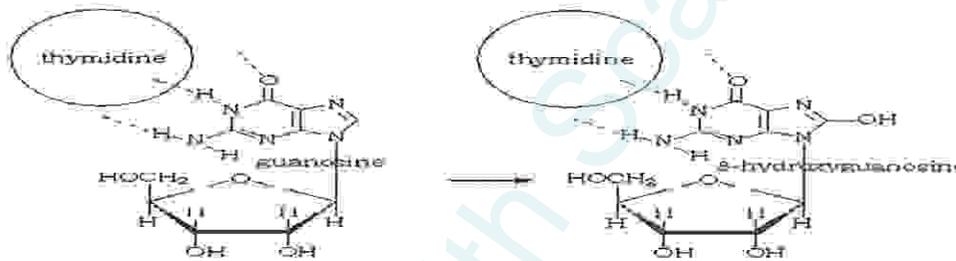


Figure 3 : Oxydation en carbone 8 de la base guanine (9).

II-5-2.Protéines :

Les protéines sont également ciblées par les EOA en particulier les acides aminés : cystéine, méthionine et tyrosine. La fragmentation et l'oxydation de ces acides aminés causent des modifications des structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines entraînant une altération de leurs fonctions et formant des dérivés protéiques carbonylés. [Pincemail *et al.* ,(1999) a , Lentender. ,(2009)].

En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux libres sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif [Gardès-Albert.,2003].

II-5-3.Lipides :

La peroxydation des lipides par les EOA est responsable de la propagation du stress oxydant et la formation des radicaux pyroxyles. Ces derniers oxydent de proche en proche les

autres lipides insaturés, qui peuvent eux même oxydés et inactivés d'autres molécules voisines tels que les protéines membranaires [Letender.,2009].

II-6. Rôle physiologique des EOA :

Il serait erroné de ne voir les EOA que sous l'angle de leur toxicité. Ces espèces dont les « Radicaux libres » jouent un rôle irremplaçable dans la phagocytose, comme l'un des systèmes microbicide significatif, ou dans plusieurs réactions biochimiques (l'hydroxylation, la réaction de carboxylation etc...).

A l'heure actuelle, les FR (Free Radicals=radicaux libres) sont supposés avoir des activités bio-modulatrices importantes et une capacité de réglementation dans les processus de transduction des signaux au cours de la transduction d'information intercellulaire. Puisque dans des conditions physiologiques, un certain niveau de FR est requis, la suppression complète de formation FR ne serait pas bénéfique [Durackova., 2010].

II-7. Le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) :

II-7-1. Définition :

Le peroxyde d'hydrogène, également appelé « perhydrol » est un liquide incolore, miscible à l'eau en toutes proportions, soluble dans l'oxyde de diéthyle, et décomposé par de nombreux solvants organiques. Le peroxyde d'hydrogène se trouve, le plus souvent sous forme de solutions variant entre 3% et 90% (10).

Il existe naturellement chez les êtres vivants, comme sous produit de la respiration cellulaire, et sa dismutation chez les organismes aérobies est catalysée par les peroxydes (11).

II-7-2. Caractéristiques :

- *Couleur* : incolore
- *Odeur* : légèrement piquante.
- *pH* : 2 – 4
- *Température de fusion* : - 26°C
- *Température d'ébullition* : ≈106°C

Autour de l'ambiguïté entre danger et nécessité de l'oxygène et des radicaux libres, la cellule a développé des systèmes de défense antioxydants qui permettent de maîtriser et de contrôler le plus précisément ce métabolisme [Leverve., 2009].

III-1. Définition :

Un antioxydant est une substance capable d'empêcher d'autres substances, sensibles à l'action de l'oxygène, de former des structures peroxydées [Morelle., 2003].

Un composé est considéré comme antioxydant lorsqu'il requière les propriétés suivantes :

- Avoir une demi-vie assez longue afin de pouvoir interagir avec l'oxydant lors de sa pénétration.
- Être présent dans l'organisme en quantité et concentrations précises.
- Les produits du métabolisme des antioxydants et le produit de sa réaction avec l'oxydant ne doit pas être plus toxique que l'oxydant lui-même.
- Avoir comme cible les EOA [boumaza., 2009].

III-2. La cascade antioxydative :

La protection de l'organisme contre l'effet toxique des radicaux libres est organisée sur trois niveaux:

- Systèmes empêchant la formation des radicaux libre, tels que les inhibiteurs des enzymes catalysant FR. exemple : la xanthine oxydase produit le superoxyde, qui peut être inhibée par allopurinol, ou les chélateurs piégeant des ions de métaux de transition en éliminant leur activité catalytique durant la production de FR.
- Lorsque ces systèmes de protection primaires sont insuffisants et que les radicaux libre ont été déjà formé, les scavengers et trappeurs de FR entrent en action en éliminant la forte réactivité de FR et en les transformant en métabolites modérés et non toxiques.
- Si la protection de l'organisme échoue a ce niveau, alors les systèmes de réparation identifient les molécules altérées et les décomposent, les protéinases dans le cas des protéines oxydatives modifiées, les lipases dans le cas des systèmes oxydatifs

endommagés des lipides ou réparation d'ADN (les base modifiées).
[Durackova., 2010].

III-3. Les antioxydants de l'organisme:

III-3-1. Le glutathion:

Le glutathion réduit, joue un rôle protecteur considérable dans l'oxydation des protéines, car il « encaisse » le choc oxydatif dont la conséquence est la transformation de sa fraction cystéine (SH) en fraction cystinique (-S-S-) et l'oxygène attaquant en eau (H₂O).

Dans l'organisme le glutathion réduit (GSH) se trouve à des teneurs variables, par exemple la teneur du GSH est dix (10) fois plus élevée dans le cristallin que dans le muscle.

Le glutathion réagit avec certains acides aminés comme la lysine, activant un système de détoxification [Morelle., 2003].

III-3-2. Les acides lipoïques (acides thioctiques) :

Ces acides possèdent deux fonctions SH (ce qui leur confère une double action antioxydante par rapport au glutathion).

Ils sont solubles aussi bien dans l'eau que dans les matières grasses et ont pour origine la cystéine.

Les acides thioctiques correspondent à une chaîne hydrocarbonée comportant huit (8) carbones, deux fonctions SH pouvant se trouver à différents sites de la molécule.

Selon certains auteurs, ces acides activeraient la croissance des neurones et amélioreraient la mémoire. On trouve les acides lipoïques dans les extraits de foie et de reins.

Les acides thioctiques sont considérés, du fait de leur puissance antioxydante, comme neurotropes et anti-âge [Morelle., 2003].

III-3-3. Les glutathion-enzymes :

a/ La glutathion-peroxydase :

Enzyme, spécifique du glutathion, qui comporte du sélénium à la place du soufre. Cette enzyme possède une activité anti-cancérogène.

La glutathion-peroxydase inhibe la formation du MDA issu de la dégradation de l'acide arachidonique des membranes cellulaires. Son taux est particulièrement élevé dans les érythrocytes des fumeurs et des alcooliques [Morelle., 2003].

b/ La glutathion-réductase :

Enzyme protectrice du glutathion, cette enzyme transforme le glutathion oxydé (S-S) en glutathion réduit (SH).

La glutathion-réductase joue un rôle dans la diminution de l'accumulation de la lipofuscine.

c/ La glutathion-transférase :

Enzyme ne contenant pas de sélénium, elle joue un très grand rôle dans la protection de l'ADN contre l'action des peroxydases et des radiations ionisantes.

Elle est très active au niveau des reins, de l'intestin, et des testicules [Morelle., 2003].

III-3-4. Les superoxydes –dismutases (SOD) :

Ce sont des métalloprotéines qui, selon leurs structures, contiennent du cuivre, du zinc, du manganèse ou du fer.

Les SOD suppriment le radical superoxyde ; Elles sont extraites d'une variété d'organe d'animaux et de végétaux.

La SOD manganèse a été trouvée dans le foie humain ainsi que dans plusieurs microorganismes, tandis que la SOD fer a été récemment trouvée dans le café.

Les SOD sont radio-protectrices, en effet, elles protègent des dommages qui peuvent être causés par les radiations gamma responsables de l'inactivation de la cystéine ainsi que de la méthionine (qui est un acide aminé promoteur de la cystéine).

Les SOD sont également dotées de propriétés anti-inflammatoires par inhibition du radical superoxyde produit par la migration des globules blancs.

Il a été récemment démontré que la SOD pouvait inhiber l'action peroxydante du radical peroxynitrique résultant de l'oxydation de l'oxyde d'azote par le radical superoxyde (qui lui-même est responsable de la destruction des neurones) [Morelle., 2003].

III-3-5. Les catalases :

Ces enzymes, destructrices du peroxyde d'hydrogène, ont été découvertes en 1948 dans un caillot sanguin.

Elles sont très répandues dans les tissus animaux tels que le foie, les reins, ainsi que dans les érythrocytes, le sperme, et le liquide séminal.

La spécificité des catalases c'est leur capacité à détruire l'eau oxygénée produite en excès par les macrophages [Morelle., 2003].

III-3-6. Les peroxydases :

Ce sont des enzymes qui catalysent l'oxydation (nécessaire aux métabolismes) et non la peroxydation.

La peroxydase du raifort est la plus connue et la plus étudiée, elle se trouve dans le kiwi, l'avocat, le citron, le blé...etc. Et aussi dans les glandes salivaires de (l'homme et de l'animal) [Morelle., 2003].

III-4. Les antioxydants exogènes :

III-4-1. L'acide ascorbique:

L'acide ascorbique ainsi que ses dérivés (les ascorbates) ne peuvent pas être considérés comme de véritables antioxydants car en présence du fer et de l'oxygène ils produisent facilement un radical libre qui est le radical ascorbyl qui est relativement stable, par rapport aux radicaux libres qui interagissent avec la vitamine C [Sebastian J et al ., 2003] c'est pourquoi leur utilisation comme antioxydant est limitée.

Quelques auteurs ont indiqué que la combinaison de l'acide ascorbique avec un acide gras comme l'acide palmitique conduit à une bonne protection des huiles végétales contenant des tocophérols, tandis qu'avec les graisses et les huiles animales la protection est nulle.

La vitamine C est oxydée par les peroxydases comme la lactoperoxydase du lait [Morelle., 2003].

III-4-2. Les tocophérols (vitamine E):

In vitro, ces antioxydants sont relativement peu actifs. Ils proviennent essentiellement des végétaux.

Il a été démontré que les tocophérols n'ont pas tous la même activité antioxydante.

En effet, si la structure gamma réduit le dioxyde d'azote (NO₂) en monoxyde d'azote (NO), la structure alpha réagit avec le NO conduisant ainsi à la formation d'un radical libre qui est le tocophéryl.

De multiples publications montrent l'activité protectrice de la vitamine E : dans l'intoxication alcoolique, contre l'action oxydative de la fumée du tabac ainsi que dans le contrôle du métabolisme de l'acide arachidonique par inhibition des lipoxgénases.

La capacité antioxydante des tocophénols est liée à leur protection par les SH du glutathion et les acides lipoiques [Morelle., 2003].

Il est nécessaire d'identifier la position de la vitamine E parmi les mécanismes de défense contre les EOA. Le chercheur Kirschvink (2001) a proposé une classification en 3 groupes :

- la prévention des phénomènes oxydants (transferrine, ferritine, etc);
- l'inactivation des EOA par:
 - Transformation des EOA en éléments stables (catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase) ;
 - Inactivation des EOA par captation de l'électron radicalaire : éléments hydrophiles (acide ascorbique, Glutathion, etc) et éléments hydrophobes (vitamine E, caroténoïdes, flavonoïdes, ubiquinol, bilirubine, mélatonine).
- La réparation des lésions induites par les EOA (endonucléases, glycosylases, etc)

[Cuvelier *et al.*, 2003].

III-4-3. Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des pigments présents chez presque tous les êtres vivants mais ne sont synthétisés que par les végétaux tandis que les animaux ne font que les accumuler et les transférer.

Le bêta-carotène est la principale structure qui effectue la synthèse du rétinol. Il a été démontré que ce pigment jouait un rôle pro-oxydant à la lumière et antioxydant à l'obscurité.

D'après une enquête Finlandaise menée entre 1994 à 1995 auprès de 29000 fumeurs ainsi qu'une étude américaine similaire conduite en 1996 sur 18000 volontaires, les scientifiques pensaient que les fumeurs ayant reçu du bêta-carotène présenteraient moins de cancer du poumon que ceux qui n'ayant pas reçu or les résultats de l'expérience ont débouchés sur le contraire ce qui les a obligés à abandonner leurs recherches [Morelle., 2003].

III-4-4. Le sélénium :

On a découvert que la déficience de ce métalloïde dans l'organisme conduit à des maladies comme le cancer et les maladies cardio-vasculaires et ceci notamment dans les pays dont les terrains sont pauvre en sélénium on peut citer par exemple : les pays scandinaves, la nouvelle Zélande, l'ex Yougoslavie et quelques régions de la Chine.

Des chercheurs chinois ont démontré qu'il existe un rapport entre la déficience en sélénium et l'augmentation des lipoperoxydases dans le sérum et le myocarde. Il a été également prouvé que quelques uns de ses dérivés inhibent les radicaux libres et possèdent une activité anticancéreuse.

Les principales sources de sélénium sont des sources alimentaires (eau minérale, lait, fraises, tomates) et la concentration de ce métalloïde dans les érythrocytes augmente avec l'âge [Morelle., 2003].

III-4-4. Les antioxydants de source végétale:

Les végétaux comportent un nombre extraordinaire de substances très variées dont une infime partie, seulement, semble avoir été étudiée.

Depuis des millénaires les chinois s'intéressent aux plantes et ils ont construit une pharmacopée basée sur des observations empiriques. C'est le cas de plusieurs plantes dont on cite deux exemples :

* Le ginseng, utilisé depuis plus de 2000 ans dans la médecine traditionnelle surtout asiatique. Son activité anti-vieillesse est due à ses propriétés antioxydantes. En effet, il a été prouvé que certains extraits du ginseng augmentent l'activité antioxydante de la catalase et de la glutathion-peroxydase alors qu'ils n'auraient aucune influence sur la SOD.

* Les feuilles de ginkgo biloba dont l'étude pharmacologique a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux sur le vieillissement des neurones ainsi que sur les troubles de la vision et de la circulation sanguine.

En effet, quelques extraits de cette plante possèdent une capacité de destruction du MDA de l'ordre de 70% à 80% et une capacité d'inhibition de la xanthine-oxydase.

Cependant, il est à noter qu'un végétal peut avoir aussi bien des propriétés antioxydantes que pro-oxydantes.

Afin d'être avantageusement utilisé comme antioxydant, un extrait végétal doit avoir une capacité antiradicalaire qui empêche la continuité du processus oxydatif, et une capacité antilipoperoxyde démontrant le captage des oxygènes.

Les scientifiques attribuent à certains polyphénols, du fait de leurs propriétés antiradicalaires, des activités anticancéreuses, c'est le cas du thé qui possède des propriétés connues dans la médecine traditionnelle asiatique depuis plusieurs siècles.

Des travaux récents ont démontré que le thé vert (et non le thé noir) possède une activité anticancéreuse due à l'épigallocatechine (constituant du thé vert) qui inhiberait l'activité de l'urokinase (enzyme présente dans les cellules cancéreuses et impliquée dans la prolifération cancéreuse et la formation de métastases) [Morelle., (2003), (13)].

III-4-5. Les antioxydants obtenus par synthèse biologique :

La combinaison d'un acide gras avec un acide aminé réalisée par voie chimique est appelée : une opération de synthèse conduisant à une substance à caractère biologique dénommée « Lipoaminoacide ».

Il a été constaté que l'acide oléique (principal acide de l'huile d'olive et qui est très oxydable) combiné avec la lysine (important acide aminé des protéines) inhibe, dans certaines mesures, la poursuite du processus d'oxydation. En effet, l'acide oléique neutralisé par la lysine devient antiradicalaire.

En laissant, sous une lampe à UV pendant 18 heures et à une température de 50°C, une émulsion témoin comportant 10% d'huile d'olive peroxydable non protégée et une émulsion contenant l'oléate de lysine on constate que l'émulsion témoin accuse 550µg d'oxygène actif tandis que l'émulsion contenant l'oléate de lysine n'en accuse que 200µg soit environ 70% de réduction. Ceci montre bien que la lysine est un facteur important dans le processus biologique antiradicalaire.

Mis à part la cystéine (à cause de son SH) tous les acides aminés qui entrent dans la structure des protéines n'ont aucune activité antioxydante.

Cependant lorsqu'ils sont combinés à un acide gras ils acquièrent une capacité antioxydante variable entre 25% et 50% sauf pour la cystéine qui a une capacité de protection située entre 75% et 90% due à son SH.

La capacité antiradicalaire des lipoaminoacides augmente lorsqu'ils sont combinés à la lysine et peut atteindre, selon les huiles, 90% à 95% de protection.

Les recherches effectuées sur une cinquantaine de structures synthétisées montrent que le plus puissant antiradicalaire est la combinaison de l'acide oléique à la méthionine dont la protection atteint les 95%.

Les auteurs qui ont participé au 6^{ème} Congrès International de Cosmétologie de NEW YORK en 1990 ont décrit que le complexe : lysine-acides gras-méthionine protège à 90% de la peroxydation des lipides membranaires soumis à un puissant peroxydant. Ils sont arrivés à la conclusion suivante :

a/ que ce lipoaminoacide de lysine possède une activité 500 fois plus élevée que les tocophérols.

b/ que « l'utilisation de ces petites molécules d'un haut pouvoir antiradicalaire est un moyen souhaitable pour la protection biologique des systèmes radicalaires exogènes et endogènes. » [Morelle., 2003].

III-4-6. Le romarin :

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est un arbrisseau de la famille des lamiacées poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen et sur un sol calcaire.

Rosmarinus officinalis (fig.4) contient des antioxydants très puissants qui sont : l'acide rosmarinique et l'acide ursolique. Plusieurs études ont corrélié les propriétés antioxydantes des plantes de la famille des Lamiacées avec la présence d'acide rosmarinique qui inhiberait la production d'oxyde nitrique (NO) ainsi que d'autres EOA et de l'azote dans les macrophages , ce qui éviterait des dommages importants causés par le stress oxydatif et le vieillissement cellulaire.

L'activité antioxydante de l'acide rosmarinique aurait, également, un effet sur le cancer [Larousse des plantes médicinales, 2001].



Figure 4 : *Rosmarinus officinalis* [Larousse des plantes médicinales, 2001].

CHAPITRE IV :

***CONSEQUENCE DU
STRESS OXYDANT SUR LA
SANTÉ***

Produced with Scantopdf

Le stress oxydatif est à l'origine de beaucoup de maladies, il est impliqué soit comme facteur déclenchant soit comme associé à l'évolution des complications.

La plupart des maladies induites par le stress apparaissent avec l'âge cela est dû à la diminution des défenses antioxydantes par le vieillissement qui, en parallèle, augmente la production mitochondriale des radicaux libres [ferrari., 2001].

Parmi les maladies dans lesquelles le stress oxydatif est impliqué nous citerons le diabète, le cancer, les maladies cardio-vasculaires, et nous nous étalerons sur le diabète de type II (dit aussi diabète gras ou diabète non insulino-dépendant DNID) et le cancer.

IV-1. Le diabète :

IV-1-1. Définition :

Le diabète est un terme générique recouvrant plusieurs maladies qui ont en commun l'augmentation du volume des urines avec présence de sucre dans ces dernières. [Larousse dictionnaire médical., 1981].

IV-1-2. Les différents types de diabète :

Il existe trois types de diabète :

- **Le diabète insipide (endocrinien) :** c'est une affection endocrinienne caractérisée par un syndrome polyuro- polydipsique (boire beaucoup et uriner beaucoup) provoqué par une lésion organique du système hypothalamo-hypophysaire entraînant une carence en hormone antidiurétique (HAD) [Blaque-Belair., 1981].
- **Le diabète rénal :** c'est une atteinte génétique familiale du rein, qui entraîne l'impossibilité pour le rein de réabsorber, normalement, le glucose. Ce diabète est caractérisé par une glycosurie (présence de glucose dans les urines) sans augmentation du glucose sanguin (absence d'hyperglycémie) [Larousse dictionnaire médical ., 1981].
- **Le diabète sucré (pancréatique) :** ce diabète regroupe deux types selon le taux d'insuline, soit l'insuline est totalement absente dans le sang est c'est le diabète maigre appelé aussi diabète de type I ou diabète insulino-dépendant DID, soit que l'insuline est présent dans le sang mais en quantité insuffisante est c'est le diabète gras appelé aussi diabète de type II ou diabète non insulino-dépendant DNID.

Chez la souris, dans les îlots de Langerhans, ces radicaux libres provoquent une hyperpolarisation membranaire par activation des canaux potassiques dépendants de l'ATP, et ceci par un mécanisme qui semble impliquer une diminution de la concentration en ATP sans modification du taux de calcium intracellulaire.

Il a été proposé que le stress oxydant puisse représenter un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave le dysfonctionnement des cellules bêta dans le diabète gras. C'est l'hypothèse dite : hypothèse de glucotoxicité (14).

***Effets du stress oxydant sur l'insulino-sensibilité :**

Les radicaux libres pourraient être impliqués dans l'insulinorésistance liée à l'âge [Paolisso *et al.*, 1999].

In vitro, plusieurs études démontrent que le stress oxydatif inhibe la transduction du signal de l'insuline. En effet, des concentrations en micromolaires d'eau oxygénée inhibent l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline, la phosphorylation de l'insuline Receptor Substrate-1 (IRS-1) et les événements en aval de la phosphorylation d'IRS-1 : activation de la phosphatidylinositol 3-Kinase, le transport du glucose, et l'activation des Mitogen Activated Proteins Kinases (MAP Kinases) [Hansen *et al.*, 1999].

Le stress oxydatif inhibe la translocation du transporteur de glucose GLUT4 stimulée par l'insuline dans les cellules adipeuses. Ces effets sont bloqués en présence d'un antioxydant.

Chez le rat Zucker obèse et résistant à l'insuline, les marqueurs de stress oxydatif sont élevés et diminuent avec l'administration de vitamine E qui corrige (en partie) l'hyperinsulinémie.

A l'inverse, chez les rats Zucker traités par des pro-oxydants deviennent diabétiques.

Chez les rats insulinorésistants, l'administration de metformine améliore la sensibilité à l'insuline ainsi que les défenses antioxydantes (14).

***Stress oxydatif et diabète gras humain :**

Beaucoup d'études montrent une augmentation des marqueurs dans le diabète gras, ainsi qu'une diminution des mécanismes de défenses vis-à-vis des radicaux libres associée à une diminution du taux de l'acide urique et de l'acide ascorbique circulant.

Sont observée également une diminution du peroxyde dismutase et de la catalase chez les patients présentant une malabsorption glucidique ainsi qu'une diminution de l'acide ascorbique et du glutathion réduit.

L'existence d'une corrélation **positive** entre les radicaux libres plasmatiques et l'insulinémie à jeun, ainsi qu'une corrélation **négative** avec l'utilisation du glucose ont été observées par Paolisso et al (14).

Plusieurs publications montrent qu'un traitement antioxydant améliore la sensibilité des tissus à l'insuline dans le diabète gras.

IV-1-4. Les sources des radicaux libres lors d'une hyperglycémie :

De nos jours quatre hypothèses sont avancées :

- **1^{ère} Hypothèse c'est l'augmentation de la voie des polyols :**

Dans un état d'hyperglycémie, le métabolisme du glucose se fait moins bien et ceci à cause de la saturation de l'héxokinase, qui permet la phosphorylation du glucose, conduisant ainsi à l'accumulation de ce dernier (glucose) dans les différents tissus insulino-indépendants et l'activation de la voie polyols (voie du métabolisme glucidique) faisant ainsi intervenir l'aldose réductase et le sorbitol déshydrogénase [Boumaza., 2009].

L'activation de la voie de polyols a des conséquences impliquées, directement, dans la production des EOA et l'inhibition de certains antioxydants.

Ces conséquences sont :

*L'accumulation du sorbitol [Boumaza., 2009].

*L'accumulation du fructose qui stimule la glycosylation non enzymatique des protéines [Boumaza., 2009].

*La diminution du rapport $NADPH, H^+/NADP^+$ et NAD^+/H^+ , NADH.

Ce qui affecte la régénération du GSH aboutissant ainsi à un stress oxydant [Bravi et al ., 1997] et limitant certaines réactions enzymatiques telles que la formation du NO par la NO synthase [Boumaza., 2009].

- **2^{ème} Hypothèse C'est la formation des protéines glyquées :**

L'hyperglycémie est une cause essentielle de la glycosylation non enzymatique ou la glycation des protéines qui donne naissance à des produits nommés : « Amadori » possédant un groupement céto, qui en présence des métaux de transition, forme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) [Boumaza., 2009].

La glycation des protéines peut avoir comme conséquences ce qui suit

- Lors de la glycation des protéines extracellulaires, celles du collagène aboutissent à une modification des propriétés élastiques de la matrice extracellulaire et l'albumine et cela en diminuant la capacité d'épuration des radicaux libres et de la chélation des métaux de transition [Rees., 2008].

- La glycation des lipoprotéines notamment les LDL et les VLDL augmente leur durée de vie plasmatique et par conséquent leur susceptibilité à l'oxydation qui se traduit par de fortes concentrations en TBARS [Gallou *et al.*, (1994), Willems *et al.*, (1998)]

- La glycation des protéines intracellulaires notamment les enzymes ayant une activité antioxydante telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase [Atmaca *et al.*, 2008].

- **3^{ème} Hypothèse c'est l'activation de l'angiotensine :**

L'angiotensine II est un vasoconstricteur dont l'activité augmente lors d'une hyperglycémie. Il est considéré comme l'un des plus importants stimuli endogènes pour la génération de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) via la NADPH oxydase endogène [Beaudeau *et al.*, 2005].

- **4^{ème} Hypothèse c'est la production des radicaux libres par la mitochondrie :**

La principale source de radicaux libres au cours des états d'hyperglycémie est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire.

En effet, le taux élevé de glucose favorise un gradient électrochimique au niveau de la membrane interne mitochondriale suite à une activation des donneurs d'électrons du cycle des acides tricarboxyliques, induisant ainsi une forte production de l'anion superoxyde [Beaudeau *et al.*, (2005), Derubertis *et al.*, 2005].

La mitochondrie produit 90% des EOA cellulaires et les deux sites de production des EOA sont : les complexes I et III [Turrens., (1997), Cadenas *et al.*, (2000), Andreyev., (2005)].

IV-2. Le cancer :

IV-2-1. Définition :

Le cancer est une tumeur formée d'une masse cellulaire. Il est à l'origine d'une série de transformations pouvant se dérouler sur une période de plusieurs années.

La cancérogenèse qui est un procédé complexe multi-séquentiel, consiste à mener une cellule de son état normal, donc sain, à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (fig.5) [Princemail *et al.*, 1999 b]. Ces cellules ont la capacité d'envahir et de détruire les tissus sains et de se disséminer dans l'organisme (15).



Figure 5: Représentation schématique de différentes étapes de la cancérogenèse (16).

IV-2-2. Les types de cancer :

Il existe trois types de cancer :

- **Les carcinomes** : sont des cancers qui se développent à partir d'un tissu épithélial (toutes les formes de cellules cancéreuses se forment dans l'épithélium).
- **Les sarcomes** : sont des cancers qui se développent à partir du tissu de soutien (tissus de support) présent dans l'organisme tels que les os.
- **Les cancers hématopoïétiques** : sont des cancers qui se développent à partir des cellules sanguines (la leucémie est le plus connu) (15).

IV-2-3. Le développement du cancer :

L'évolution du cancer suit trois grandes étapes : L'initiation, la promotion et la progression

a / L'initiation :

L'étape d'initiation débute lorsque des agents chimiques cancérigènes se fixent sur l'acide désoxyribonucléique générant ainsi chez lui des lésions. Ces lésions peuvent se produire également sous l'effet de radiations ionisantes ou de rayonnements ultraviolets [Princemail *et al.*, 1999 b].

b / La promotion :

La promotion qui est un processus prolongé pendant plusieurs décades au cours duquel la cellule initiée se transforme en cellule pré-néoplasique. Elle se produit spontanément ou sous induction d'un promoteur tumoral comme les lipides alimentaires, les hormones ou même une inflammation (une source importante de production d'EOA) [Princemail *et al.*, 1999 b].

c/ La progression:

Au cours de cette dernière phase, les cellules pré-néoplasiques se transforment en cellules néoplasiques (cancéreuses) c'est l'emballement du processus tumoral.

Cela est dû à l'incapacité de l'organisme à reconnaître comme anormale les cellules cancéreuses. Une fois formées, les tumeurs malignes constituées d'un nombre considérable de cellules peuvent envahir les tissus avoisinants ou essaimer vers d'autres organes et former des tumeurs secondaires appelées métastases [Princemail *et al.*, 1999 b].

IV-2-4. Stress oxydant et cancer :

L'excès de radicaux libres crée, en oxydant certaines bases, des mutations et des cassures dans les brins d'ADN, initiant ainsi la cancérogénèse. Le groupe de « **stress et cancer** » (F. Mehta *et al.*), qui s'est intéressé à l'impact d'un stress oxydatif chronique sur le développement tumoral, a démontré que les oxydants (EOA) présentent deux mécanismes d'action complémentaires : d'abord, ils favorisent la croissance des cellules tumorales (agissant comme messagers secondaires en transactivant des gènes cibles) et par la suite, ils modifient globalement le micro-environnement tumoral incluant les cellules de natures variées (fibroblastes, cellules immunes) entourant les cellules néoplasiques. Cette altération des composantes externes de la tumeur favorise la dissémination métastatique.

Le lien stress oxydatif et métastases dans les nodules lymphatiques a été mis en évidence dans un sous-type histologique particulier de cancer du sein, les tumeurs dites **HER2** sur-exprimant l'oncogène **ErbB2** (Toullec, A. *EMBO Molecular Medicine*, 2010) [Mechta-Grigoriou., 2010].

Egalement, le fer favorise la carcinogenèse par de nombreux mécanismes liés au stress oxydant, les uns directs par oxydation des lipides et de l'ADN, les autres indirects par activation de gènes ou d'enzymes antioxydantes [Levesque., 2006].

Produced with ScanTOPDF

Nous avons réalisé notre travail expérimental au niveau du laboratoire de biochimie du département de biologie à l'université de Guelma.

Matériel et Méthode

I-1. Produits chimiques :

- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 10 V
- Acide ascorbique (vitamine C) à 1g
- Vitamine E (Tropophénol) à 100 mg
- Eau distillée
- Extrait de Romarin

I-2. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé sont des souris blanches de sexe féminin (fig.6) provenant du CHU de Constantine pesant entre 22g et 30g et âgées de quatre (4) semaines.

La souris blanche est la race albinos de la souris domestique *Mus musculus*. Une souris blanche a une longueur qui peut atteindre 10cm sans la queue qui elle-même peut être aussi longue, son poids varie entre 20g et 30g. Le rythme respiratoire de la souris blanche va de 136 à 216 ventilations pulmonaires/ minute et son rythme cardiaque varie de 520 à 780 pulsations/minute (17).

Les souris sont placées dans des cages en polypropylène propres (nettoyées un jour sur deux), dans une pièce bien aérée à température ambiante (entre 20 et 25°C) et une photopériode de 12^h d'obscurité sur 24^h. Les souris sont nourries avec du pain rassis et de l'eau.

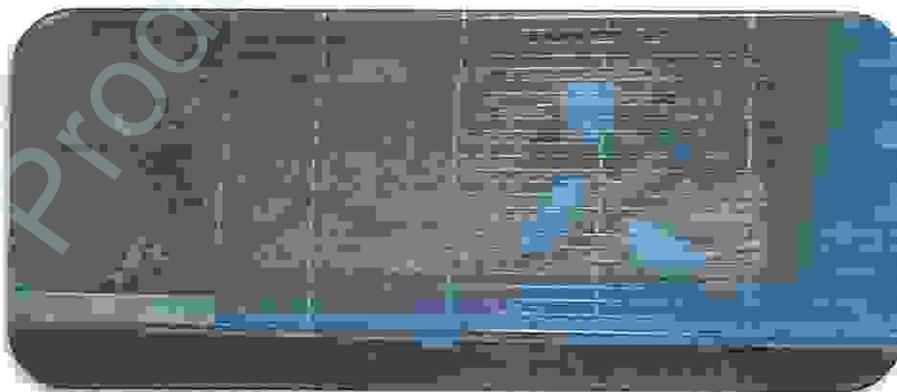


Figure (6) : Matériel biologique (souris blanches)

I-3. Méthode :

Les souris sont divisées en neuf (09) lots constitués chacun de deux individus. Ceci en plus de deux (02) individus non traités (témoins) et de deux (02) autres individus traités uniquement avec du peroxyde d'hydrogène. Le traitement se fait par voie orale (gavage) pour les antioxydants : vitamine C, vitamine E et Romarin de doses 1g/Kg, 1g/Kg et 2ml/Kg respectivement et par voie intraveineuse pour le peroxyde d'hydrogène de dose toxique 3.7g/Kg (10).

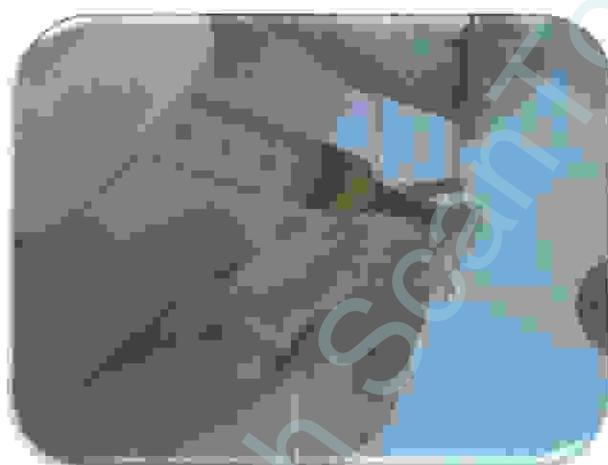


Figure 7 : Gavage avec une épicroñienne.



Figure 8 : Gavage au goutte à goutte

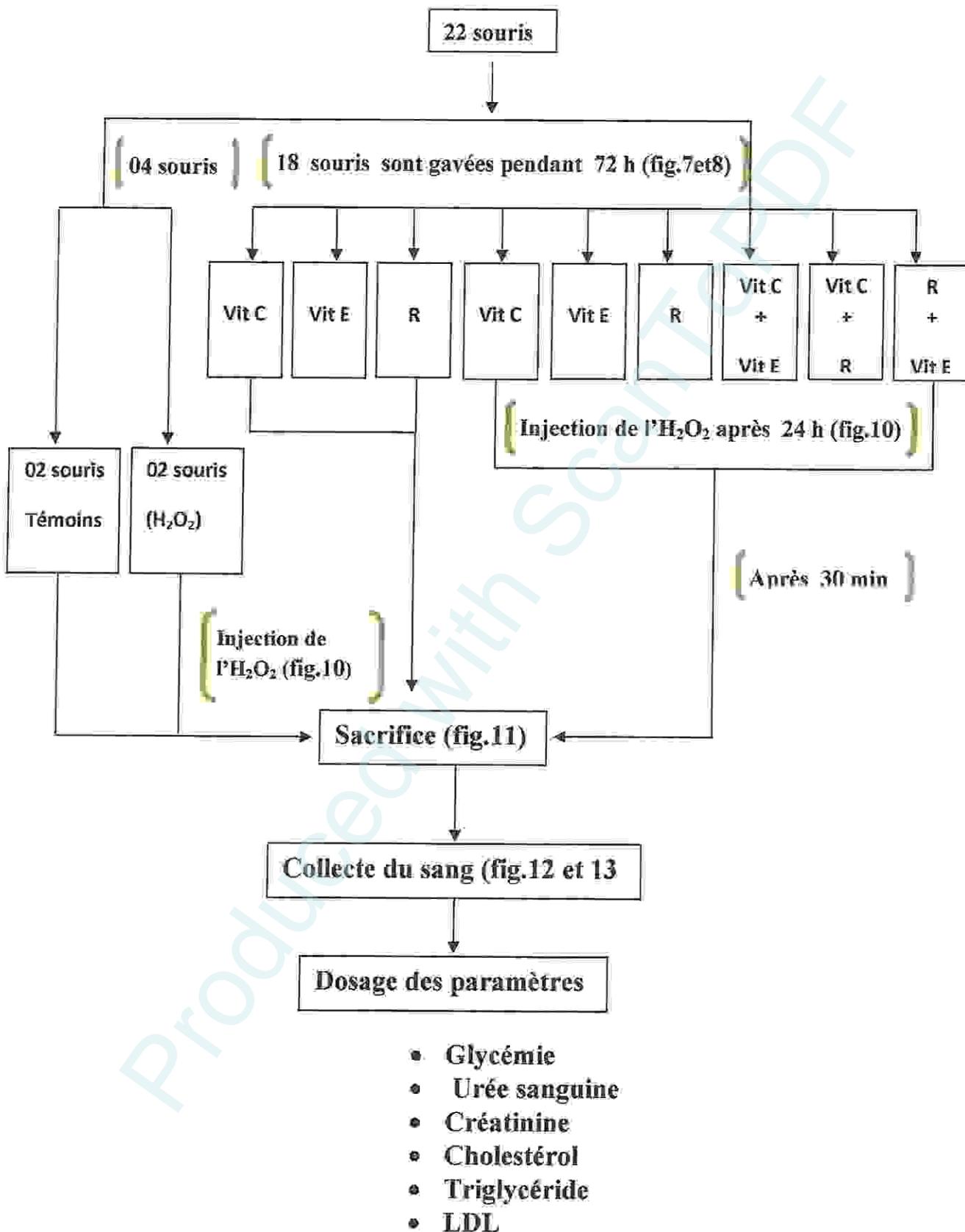
Protocole expérimental

Figure 9: Schéma récapitulatif du protocole expérimentale

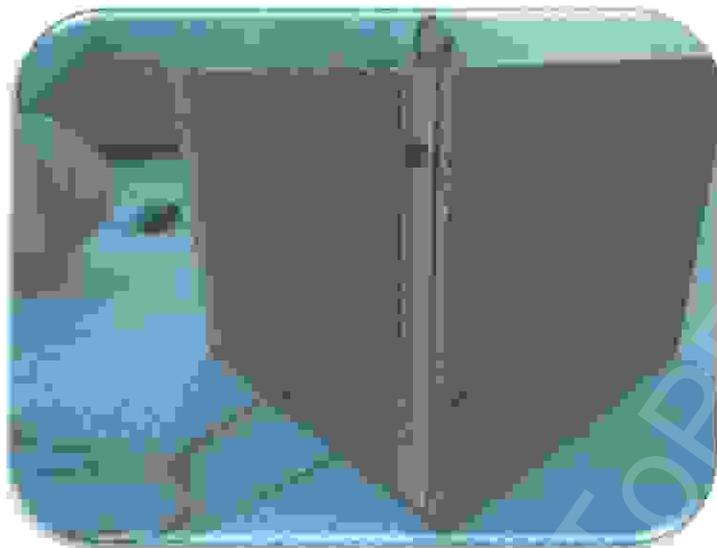


Figure 10 : Injection du peroxyde d'hydrogène



Figure 11 : Sacrifice des souris

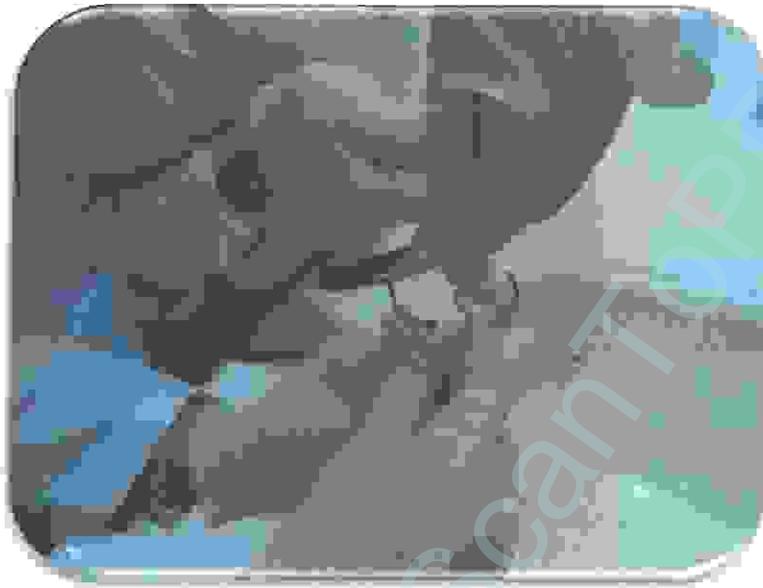


Figure 12 : collecte du sang après sacrifice



Figure 13: Collecte du sang dans des tubes héparinés

Résultats et Discussion

Les dosages (analyses) des différents paramètres ont donné les résultats suivants :

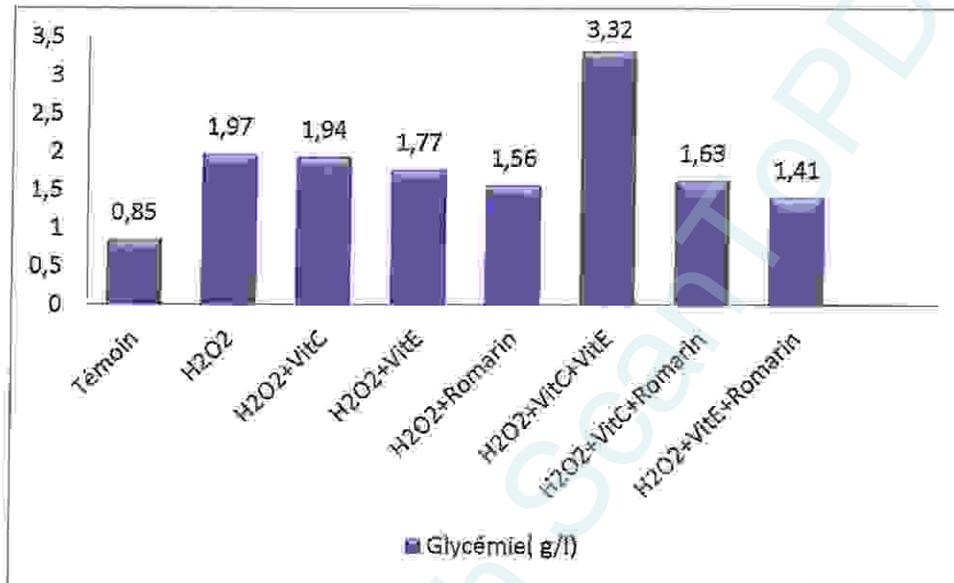


Figure14 : Résultats du dosage de la glycémie.

La glycémie est la quantité (le taux) de glucose présente dans le sang. [Larousse dictionnaire médical.,1981]

L'augmentation du taux de glucose dans le sang appelée **hyperglycémie** est due à plusieurs facteurs comme le surplus alimentaire, le manque d'activité physique, l'insuffisance d'insuline, la prise de certains médicaments ou encore le stress (physique et psychologique) [Tremblay.,2001].

En comparant le témoin avec l'individu traité uniquement avec du H₂O₂, on remarque que la glycémie augmente après l'administration du peroxyde d'hydrogène. Cette hyperglycémie serait due à une altération des cellules β de Langerhans qui sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif en raison de leur pauvreté en superoxyde dismutase, en catalase et en glutathion peroxydase et de leur faible contenu en glutathion réduit. De plus les radicaux libres inhibent la sécrétion d'insuline en interférant avec

différentes étapes du couplage stimuli-sécrétion et ceci en provoquant une hyperpolarisation membranaire des canaux potassiques dépendants de l'ATP (14).

On remarque, également, que le taux de glycémie des individus traités avec chaque antioxydant à part (en plus du H_2O_2) ainsi que celui des individus traités avec les mélanges « vitamine C-romarin » et « vitamine E-romarin » diminue par rapport à celui de l'individu traité uniquement avec le peroxyde d'hydrogène ce qui démontre que les antioxydants freinent l'action du H_2O_2 .

L'individu traité avec le mélange « vitamine C- vitamine E » présente un taux de glycémie très élevé de, supérieur à l'individu traité avec le H_2O_2 seul, et ceux des individus ayant reçu un traitement antioxydant à base soit de vitamine C soit de vitamine E ce qui serait dû, probablement, au fait que la vitamine C et la vitamine E ensemble amplifient l'action du peroxyde d'hydrogène.

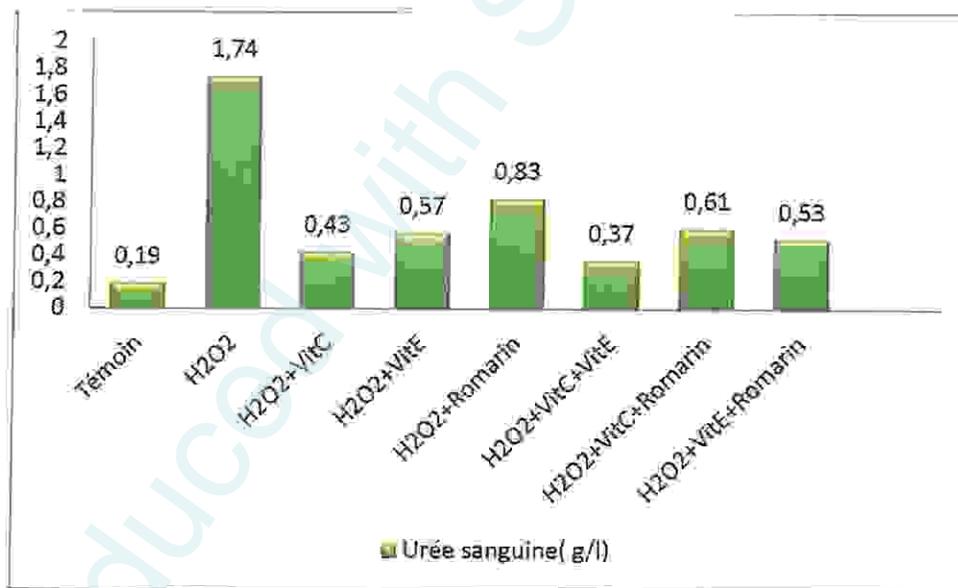


Figure 15 : Résultats du dosage de l'urée sanguine.

L'urée est le produit final de la dégradation des protéines (catabolisme azoté) elle est de formule $CO(NH_2)_2$.

L'urée est synthétisée au niveau du foie à partir de l'azote qui lui parvient via l'acide glutamique.

Dans notre histogramme on remarque que :

*Le taux d'urée augmente de façon considérable chez l'individu traité uniquement avec du H_2O_2 par rapport au taux que présente le témoin ce qui peut être dû à une insuffisance rénale causée par les EOA et majorée par une déshydratation.

*Pour les individus traités chacun avec du H_2O_2 et un antioxydant ainsi que ceux traités avec les mélanges d'antioxydants, on remarque que le taux d'urée sanguine diminue par rapport à celui de l'individu traité uniquement avec le peroxyde d'hydrogène ce qui démontre que les antioxydants diminuent l'effet du peroxyde d'hydrogène.

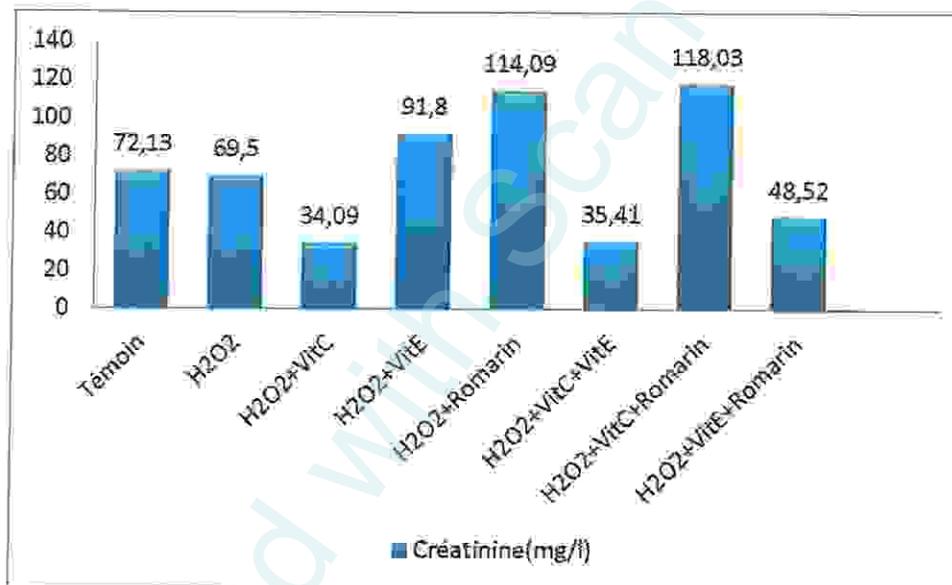


Figure16 : Résultats du dosage de la créatinine.

La créatinine est le produit de la dégradation de la créatine présente dans le muscle (18) et est le reflet de la masse musculaire globale. Son élimination est exclusivement rénale c'est pourquoi elle reflète la fonction rénale.

En comparant le taux de créatinine du témoin avec celui de l'individu traité uniquement avec le H_2O_2 , on remarque, qu'après administration du peroxyde d'hydrogène, le taux de créatinine reste presque constant.

On observe une augmentation du taux de créatinine chez les individus traités avec la vitamine E et le romarin (en plus du H_2O_2) alors que l'individu traité avec le H_2O_2 et la

vitamine C présente une diminution considérable du taux de créatinine sanguine ce qui démontre que la vitamine C freine l'effet oxydant du H_2O_2 tandis que la vitamine E et le romarin amplifient l'action du peroxyde d'hydrogène.

Les individus traités avec les mélanges « vitamine C- vitamine E » et « vitamine E-romarin » ont un taux de créatinine sanguine inférieur à celui de l'individu traité avec le H_2O_2 seul ce qui prouve l'effet antioxydant des deux mélanges. Tandis que le taux de créatinine chez l'individu traité avec le mélange « vitamine C- romarin » est très élevé et ce serait dû au fait que le romarin amplifierait l'action du peroxyde d'hydrogène sans que la vitamine C ne puisse freiner ce processus.

Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans l'augmentation du taux de créatinine sanguine tels que : l'âge, la leucémie, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale et l'atteinte traumatique (19).

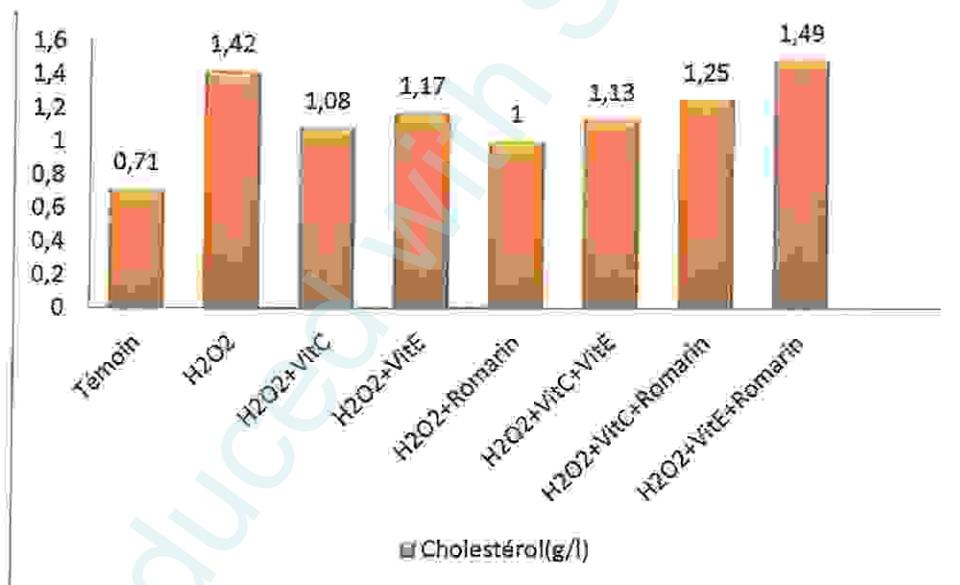


Figure 17 : Résultats du dosage du cholestérol.

On désigne par le terme cholestérol un lipide complexe élaboré essentiellement par le foie à partir d'acétate puis estérifié avant de passer dans le plasma sanguin. Le cholestérol est constitué d'un noyau sur lequel sont fixés une fonction alcool et une chaîne latérale. Il est insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques.

En observant nos histogrammes, on note que :

*Le taux de cholestérol augmente considérablement, il double de valeur, chez l'individu traité avec du H_2O_2 seul.

*Les taux de cholestérol chez les trois individus traités avec les antioxydants (en plus du H_2O_2) sont inférieurs à celui du traité avec du peroxyde d'hydrogène seul mais restent tout de même élevés par rapport au témoin.

*Les individus traités avec les mélanges d'antioxydants présentent des taux de cholestérol supérieurs à ceux des individus traités avec chaque antioxydant à part notamment pour le mélange vitamine E- romarin qui présente un taux de cholestérol supérieur, même, à celui de l'individu traité avec le H_2O_2 seul.

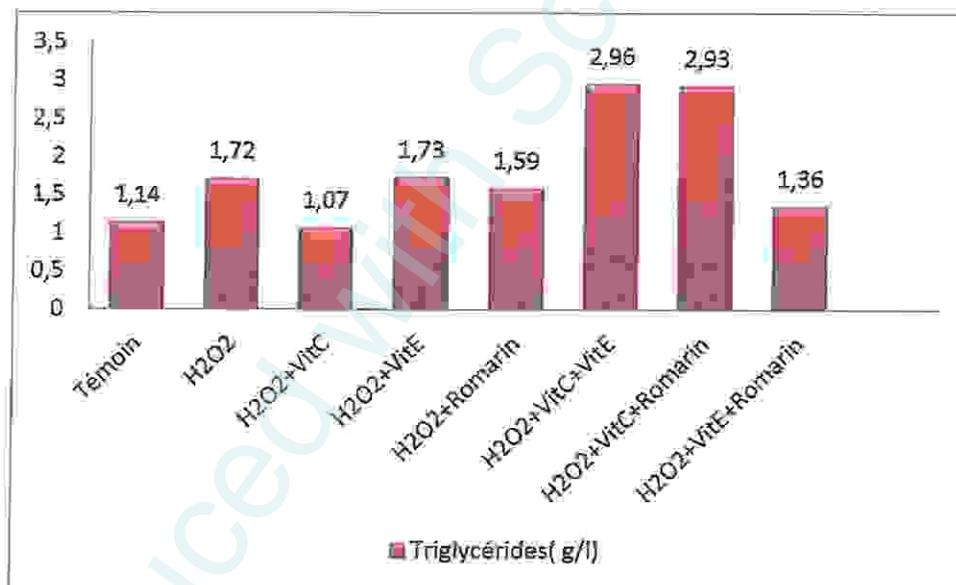


Figure 18 : Résultats du dosage des triglycérides.

Les triglycérides sont des glycérides dans lesquels les trois groupements hydroxyle du glycérol sont estérifiés par des acides gras. Ce sont les principaux constituants des huiles végétales et des graisses animales, ils représentent une réserve d'énergie très importante sans engendrer de surpoids pour l'organisme car ce sont des réserves d'énergie anhydre.

En comparant le taux de triglycérides du témoin à celui de l'individu traité uniquement avec du H_2O_2 , on remarque que ce taux augmente sous l'effet du peroxyde d'hydrogène.

Pour les trois individus traités avec les antioxydants, on note une légère baisse du taux de triglycérides qui reste, cependant, supérieur à celui du témoin.

Les individus traités avec les mélanges présentent des taux très élevés, supérieurs à tous les autres, de cholestérol sauf pour le mélange Vitamine E- Romarin.

L'hypertriglycéridémie est liée à plusieurs facteurs :

- ✚ Un trouble de l'une des étapes de la destruction ou la synthèse du processus métabolique.
- ✚ Une alimentation malsaine.
- ✚ Une consommation excessive d'alcool
- ✚ Un diabète
- ✚ Une insuffisance thyroïdienne
- ✚ Une insuffisance rénale aigue
- ✚ Une maladie du foie.

Cette augmentation est, presque, toujours liée à une hypercholestérolémie.

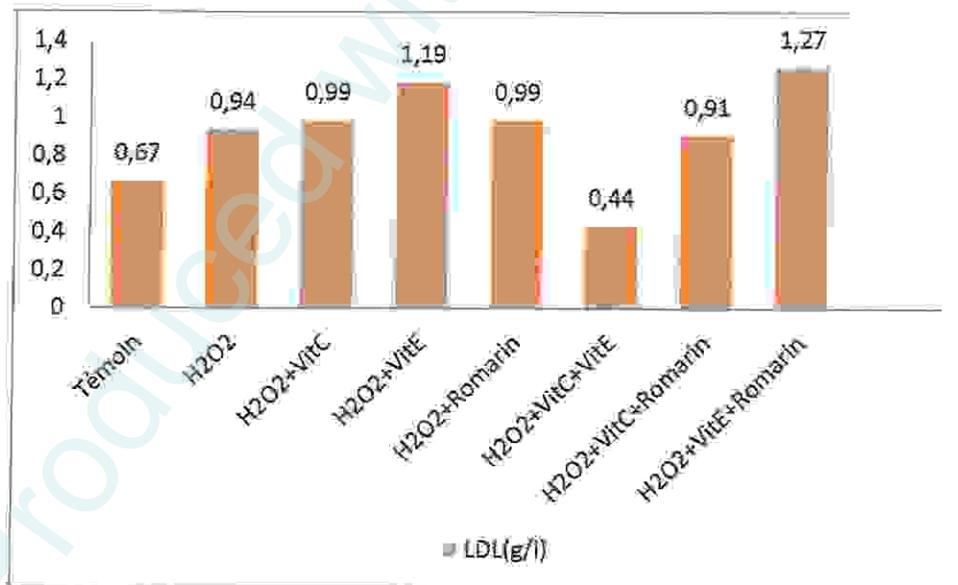


Figure 18 : Résultats du dosage de la LDL.

La LDL est une des protéines de transport du cholestérol. C'est une lipoprotéine qui constitue le principal élément du bilan lipidique pour évaluer le risque cardio-vasculaire.

Le graphe montre que le H_2O_2 augmente la LDL. On remarque également que les antioxydants n'ont presque pas d'effet et que la vitamine E accentue l'action du H_2O_2 .

Le mélange vitamine C – vitamine E diminue considérablement le taux de LDL tandis que, au contraire, le mélange vitamine E – Romarin augmente ce taux.

La LDL est la cible privilégiée de l'oxydation. Une fois oxydée, cette protéine devient la principale cause de maladie athéromateuse responsable de l'angine de poitrine, de l'infarctus du myocarde, de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ou encore de l'artérite des membres inférieurs (20). Tab II

Discussion des résultats obtenus après des dosages du cholestérol, des triglycérides et de la LDL

En comparant les trois graphes du cholestérol, des triglycérides et de la LDL, on remarque que :

-Chez l'individu traité uniquement avec le H_2O_2 les trois paramètres augmentent ce qui démontre que le peroxyde d'hydrogène a un effet sur le bilan lipidique. Ce qui s'expliquerait par le fait que les radicaux libres générés par le H_2O_2 altéreraient l'apoprotéine empêchant ainsi la LDL d'y adhérer ce qui oblige cette dernière à circuler dans le sang puis à s'accumuler sur les parois des artères faisant augmenter son taux dans le sang. Vu que la LDL est un transporteur de cholestérol, ce dernier va s'accumuler dans les artères avec la LDL ce qui se manifeste par une augmentation du taux de cholestérol dans le sang (21).

-Lorsque les individus traités avec le H_2O_2 reçoivent un traitement antioxydant (par la vitamine C, la vitamine E ou encore le romarin) les trois paramètres diminuent.

-Pour les mélanges, on remarque que le plus efficace est celui composé de la vitamine C et la vitamine E, alors que l'action du mélange « vitamine E- romarin » n'a pas d'action antioxydante car la valeur obtenue est plus élevée que toutes les autres valeurs. Ceci peut être expliqué par le fait que la vitamine E augmente l'action du H_2O_2 sans que le romarin ne puisse la freiner. Cette constatation n'est valable que pour le cholestérol et la LDL.

-Pour ce qui est des triglycérides, on remarque que les mélanges « vitamine C- vitamine E » et « vitamine C- romarin » amplifiaient l'effet du H_2O_2 par contre le mélange « vitamine E-romarin » le diminue.

Tableau II : Tableau récapitulatif des résultats de l'ensemble des paramètres.

Paramètre	témoin	H_2O_2	Vit C + H_2O_2	Vit E+ H_2O_2	Romarin + H_2O_2	Vit C + Vit E+ H_2O_2	Vit C + Romarin + H_2O_2	Vit E+ Romarin + H_2O_2
Glycémie	0,85	1,97	1,65	1,77	1,56	3,32	1,63	1,41
Urée sanguine	0,19	1,74	0,43	0,54	0,83	0,37	0,61	0,53
Cholestérol total	0,71	1,42	1,08	1,17	1,00	1,13	1,25	1,49
Triglycérides	1,14	1,72	1,07	1,53	1,59	2,96	2,93	1,30
Créatinine	72,13	69,50	34,00	60,32	114,09	35,41	118,03	48,52
LDL	0,67	0,94	0,99	1,19	0,99	0,44	0,91	1,27

CONCLUSION

Produced with ScanTOPDF

Conclusion

Le stress oxydatif est un phénomène causé par un déséquilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants qui peut être induit soit par la production excessive de EOA soit par une défaillance des systèmes de défenses naturels. Toute fois il existe des moyens de protection contre le stress oxydant.

Le but de notre travail était de tester l'effet protecteur de la vitamine C, la vitamine E et le romarin. Pour cela on a utilisé des souris blanches qu'on a gavées avec les antioxydants puis on a injecté le peroxyde d'hydrogène et enfin on a sacrifié les animaux et collecté le sang à partir duquel on a analysé une batterie de paramètres (glycémie, urée sanguine, créatinine, cholestérol, triglycérides et LDL) dont on a observé les variations en fonction de l'antioxydant administré à l'animal.

Cependant, notre travail a été altéré par un grand nombre d'entraves en l'occurrence le manque de moyens. En effet, les produits permettant la réalisation de plusieurs analyses fondamentales dans la détermination du stress oxydatif (telles que : la SOD, la GPx, le GSH, les TBARS et le MDA) nous ont fait défaut ceci d'une part et d'autre part on a été confrontées à l'absence d'animalerie au sein de l'université ce qui a grandement affecté notre manipulation.

Afin d'améliorer cette étude, nous proposons comme perspectives de réaliser l'étude sur d'autres mammifères (rats ou lapins), d'essayer d'autres voies d'administration car, parfois, l'animal tolère mal le gavage. L'utilisation de radicaux libres synthétique à côté du H_2O_2 permettrait de compléter l'étude.

Egalement, pour améliorer la fiabilité des résultats, il serait souhaitable de réaliser l'études sur plusieurs lots afin de pouvoir calculer la valeur moyenne pour les différents paramètres ainsi que pour pouvoir calculer l'écart type ce qui donnera sans doute une signification aux résultats.

ANNEXES

Produced with ScanTOPDF

Préparation des solutions

La vitamine C :

Un comprimé de vitamine C	1 g
Eau distillée	10 ml

La vitamine E :

Une gélule de vitamine E	100 mg
Eau distillée	5 ml

Romarin :

Extrait de romarin (huile essentielle)	0,2 ml
Eau distillée	5 ml

Produced with ScanTOPDF

Bibliographies

Alleva R., Tomasetti M., Bompadre S. and Littaru P. (1997): Oxidation of LDL and their subfractions : kinetic aspects and COQ10 content. *Mol. Aspects Med.* **18**, 105-112.

Andreyev A Y., Kushnareva Y E., Starkov A A. (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* **7**, 200-14.7

Atmaca M., Kuloglu M., Tezcan E. and Ustundag B. (2008): Antioxidant enzyme and MDA levels in patient social phobia. *Psychatry research* **05678**, 1-6.

Barouki R.(2006) : Stress oxydant et vieillissement. *Médecine et Science.* **22**, 266-272.

Blaque-Belaire A. (1981) : Dictionnaire Médical Clinique Pharmacologique et Thérapeutique. 3^e édition. Ed. Maloine S.A. Editeur. Paris. 1984p.

Beaudeau J.L and Dominique B.R. (2005) : Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Edition médicales. Internationales. 550p. In Boumaza A.(2009).

Boumaza A.(2009) : Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* coss contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation. Thèse magistrale, université Mentouri-Constantine. Algérie. 125p.

Cadenas E and Davies J.A. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222-230.

Cuvelier C., Dotreppe O., et Istasse L.(2003) : Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. **147**, 315-324.

Darley-USmar V., Wiseman H and Halliwell B. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters* **369**, 131-135.

Derubertis F.R and Craven Patricia A. (2005): Oxidative and glycoxidative stress in

diabetic nephropathy. Ed: P.Cortes and C.E Magensen. Humana press Inc, Totawa N.J.

Delattre J. (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC, Londres-paris –new york. 620p. In Boumaza A.(2009)

Durackova Z. (2010): Some Current Insights into Oxidative Stress ,*physiol.Res.* **59**, 459-469.

El-Sohemy A., Baylin A., Spiegelman D., Ascherio A., Campos H. (2002): Dietary and adipose tissue gamma-tocopherol and risk of myocardial infarction. *Epidemiology.* **13**, 216-23.

Ernster L and Daliner G. (1995): Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *BBA.* **1271**, 195-204.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.* 108-115.

Ferrari C K B. (2001). Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal* **8**, 175-184.

Gallou G., Ruelarid A., Campion L., Allaniric H., Legras B et Cloarec L. (1994) : Susceptibilité des LDL a la peroxidation lipidique dans le diabete non insulino dépendant avec ou sans macroarigiopathie *Ann. Biol clin.***52**, 695-699.

Garait B. (2006) : Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GlisODin. Thèse doctoral .Université Joseph Fourier- Grenoble 1. 195p.

Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., et Jore D. (2003) : Espèces réactives de l'oxygène. *Mécanisme Biochimique.* 91-96.

Gey KF., Moser UK., Jordan P., Stahelin HB., Eichholzer M., Ludin E.(1993): Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants:

an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr.* **57**, 787S-797S.

Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. (2000): Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status; critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med.* **29**, 1106-14.

Hansen L.L., Ikeda Y., Olsen G.S. et al. (1999): Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem.* **274**, 25078-25084.

Hattori I., Nakamura H., Masutai H et al. (2003): Thioedoxin-dependent redox regulation – implication in aging and neurological diseases. Eds. World Scientific .p 87 – 101.

Jones DP, Mody VC, Carlson JL et al.(2002) : Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Rad Biol Med.* **33**, 1290-1300.

Jourd'heuil D., Hallen K., Feelisch M. and Grisham MB. (2000): Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Rad Biol Med.* **28**, 409-417.

Kalousova M., Skrha J., Zima T. (2002): Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res.* **51**, 597-604.

Kregel KC.(2002): Heat shock proteins : modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol.* **92**, 2177-2186.

Lagendijk J., Ubbink JB and Vermaak JH.(1996): Measurement of the ratio between the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human plasma as a possible marker of oxidative stress. *J Lipid Res.* **37**, 67-75.

Larousse dictionnaire médical. (1981).479p.

Larousse encyclopédie des plantes médicinales. (2001).353p.

Site web:

(1) Anonyme. Le Stress Oxydant.

Site http://www.probiox.com/uk/html/body_stressoxydant.htm (consulté le : 13/04/2011 à 23h20).

(2) Anonyme.

Site : april-sante.fr (consulté le : 19/04/2011 à 23h20).

(3) Anonyme.

Site : www.stress-oxydatif.com/stress_oxydant/definition.shtml (consulté le 13/04/2011 à 22h30).

(4) Anonyme.

Site : www.bioteche-ecolo.net (consulté le : 23/04/2011 à 23h20).

(5) Anonyme.

Site : <http://www.medecine-anti-age.com/site/definition-54.html?idGlossaire=41>

(6) Anonyme. Stress oxydant.

Site : http://www.staps.univ-avignon.fr/S6/UE3/Entrainement/Le_stress_oxydant.pdf (consulté le : 19/04/2011 à 23 :18)

(7) Anonyme.

Site : <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/radical-libre-5212.html> (consulté le : 21/04/2011 à 00 :15).

(8) Lémarchant P., (2008). Radicaux libres.

Site : <http://www.sante.univ-nantes.fr/med/ticem/ressources/587.pdf> (consulté le : 19/04/2011 à 23 :22).

(9) Anonyme.

Site : <http://www.onnouscachetout.com/forme/topic/9874-chloramphenicolside> (consulté le : 12/05/2011 à 23h12).

(10) Peroxyde hydrogène : Services techniques et médicaux de l'INRS.(1992) : Peroxyde d'hydrogène et solution aqueuse.

Site : <http://espaceeducatif.ac-rennes.fr/jahia/webdav/site/espaceeducatif3/users/vgerones-troade/public/securit%E9/Peroxyde%20d'hydrogE8ne.pdf> (consulté le: 15/04/2011 à 22 :18).

(11) Wikipidia, l'encyclopédie libre (2011). Peroxyde d'hydrogène.

Site : http://fr.wikipedia.org/wiki/Peroxyde_d'hydrogène (consulté le : 16/04/2011 à 23 :10).

(12) Site : <http://www.ac-nancy-metz.fr/pres.../fds31.html> (consulté le :

19/04/2011 à 23 :18).

(13) Wikipidia, l'encyclopédie libre. (2011). Urokinase.

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Urokinase> (consulté le : 29/04/2011 à 21:09).

(14) Poitout V., Tanaka P., Reach G. et Robertson R P : Stress oxydatif, insulinosecretion, et insulinoresistance.

Site : <http://www.rgcb.org/IMG/pdf/chap8.pdf> (consulté le : 21/04/2011 à 10:13).

(15) Atangana R ; Bensalem S ; Filatriau S et Guendouz Y. (2008) : Mutations et cancers liés aux facteurs de l'environnement.

site : <http://lewebpedagogique.com/blogsvt/files/2008/09/expose-de-svt-sur-les-cancers.pdf> (consulté le : 01/05/2011 à 22: 13).

(16) Anonyme.

Site : <http://lewebpedagogique.com> (consulté le : 16/04/2011 à 20h20).

(17) Anonyme.

Site : <http://www.edunet.ch/activite/arche/sourisreussilles/textesscient2.html> (consulté le : 03/05/2011 à 11:13).

(18) Wikipidia, l'encyclopédie libre. (2011) .Créatinine.

Site : <http://fr.wikipedia.org/wiki/cr%C3%A9atinine> (consulté le : 03/05/2011 à 11:21).

(19) Anonyme. Comment guérir : la médecine au service de la santé.

Site : <http://www.commentguerir.com/analyse/creatinine> (consulté le : 02/05/2011 à 1 :13).

(20) Anonyme.

Site : http://www.stress-oxydatif.com/stress_oxydant/nutrition/cholesterol.shtml (consulté le : 01/05/2011 à 1 :57).

(21) Anonyme. Le cholestérol et stress oxydatif.

Site : <http://dismutance.fr/?categorie17/cholesterol-et-stress-oxydatif> (consulté le : 01/05/2011 à 1 :52).

Produced with ScanTOPDF