

Université de Jijel
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département biologie végétale et animale

جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة و علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا النباتية و الحيوانية

جامعة محمد السادس بن لحيون
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 1944



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme : Master
Option : Toxicologie de l'environnement

Thème

**Contribution à l'étude de l'effet protecteur de la
vitamine C contre la toxicité induite par le fluorure de
sodium chez les rats**

Membres du jury :

Président : M^{lle} Ghorab I.

Examineur : D^r Ounes I.

Encadreur : M^r Oumeddour A.

Présenté par :

Aberkane Sabah.

Bouzamouche Imane.

Numéro d'ordre :



Session : Juin 2012

Remerciements

Nous adressons tout d'abord nos louanges à Dieu tout puissant et miséricordieux pour nous avoir donné la force et le courage d'aller jusqu'au bout de notre travail.

Nous remercions infiniment notre encadreur M^r Oumeddour d'avoir accepté de diriger notre travail. Nous lui sommes très reconnaissantes pour son aide, ses conseils, sa patience et sa disponibilité.

Nous remercions vivement M^{lle} Ghorab Ismahane d'avoir accepté de présider le Jury de notre travail.

Nous remercions vivement M^{me} Ounes Ilham d'avoir accepté d'être l'examinatrice de notre travail.

Nous remercions chaleureusement M^{me} Cherbal et M^{lle} Habila pour leur aide et leurs précieux conseils.

Nous adressons également nos remerciements et notre gratitude infinie au docteur Maiza Mohamed, médecin chef du laboratoire de biochimie de l'hôpital Mohamed Seddik ben Yahia, de nous avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir accepté de faire toutes les analyses dont nous avons eu besoin.

Un grand merci à M^r Desdous Rachid, ingénieur au laboratoire de l'université de Jijel, pour son aide et ses conseils au laboratoire quand nous en avons eu le plus besoin.

Nous sommes reconnaissantes à tous nos enseignants qui ont été à notre écoute et qui nous ont aidées à progresser tout au long de notre cursus universitaire.

En fin, nous adressons notre gratitude et notre affection à nos familles qui nous ont accompagnées et soutenues tout au long de notre vie et jusqu'au bout de nos études.

Sommaire

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	2
1. Généralités	2
2. Les radicaux libres	4
2.1. Définition	4
2.2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	5
2.2.1. Les dérivés radicalaires de l'oxygène et de l'azote	5
2.2.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	5
2.2.1.2. Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})	5
2.2.1.3. Le radical alcoxyle (RO^{\cdot})	6
2.2.1.4. Le radical peroxy (RO_2^{\cdot})	6
2.2.1.5. L'oxyde nitrique (NO)	6
2.2.1.6. Le dioxyde nitrique (NO_2^{\cdot})	7
2.2.2. Les composés oxygénés non radicalaires	7
2.2.2.1. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	7
2.2.2.2. L'oxygène singulet (1O_2)	7
2.2.2.3. L'acide hypochloreux (HOCl)	8
2.2.2.4. Le peroxy-nitrite (ONOOH)	8
2.2.2.5. Les hydroperoxydes organiques (ROOH)	8
3. Le stress oxydant et les systèmes de défenses antioxydantes	8
3.1. Définition du stress oxydant	8
3.2. Les conséquences biochimiques du stress oxydant	9
3.2.1. La peroxydation lipidique	9
3.2.2. L'oxydation des protéines	9
3.2.3. L'oxydation de l'ADN	10
3.3. Les systèmes de défense antioxydante	11
3.3.1. Le système de défense antioxydante primaire	11
3.3.1.1. Le système de défense enzymatique	11
a) Les superoxyde dismutases	12
b) La catalase	13
c) Les glutathion peroxydases	13

3.3.1.2. Le système de défense non enzymatique	14
A) Le système de défense non enzymatique endogène	14
B) Le système de défense non enzymatique exogène	16
1. La vitamine C	16
1.1. La nature de la vitamine C	16
1.2. Les sources de la vitamine C	16
1.3. L'effet antioxydant de la vitamine C	16
2. Autres molécules antioxydantes exogènes	17
2.1. La vitamine E	17
2.2. Les caroténoïdes	17
2.3. Les polyphénols	18
2.4. Les oligoéléments	18
3.3.2. Le système de défense antioxydante secondaire	18
a) La glutathion réductase	18
b) Les glutathion-S-transférases	19
4. Le fluorure de sodium	20
4.1. Propriétés physico-chimiques	20
4.2. Les utilisations	20
4.3. Toxicité	20
5. Les érythrocytes comme modèle pour l'étude du stress oxydant	20
II. Matériel et Méthodes	21
1. Matériel	21
1.1. Matériel animal	21
2. Méthodes	21
2.1. Traitement des animaux	21
2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons	21
2.3. Préparation des échantillons	22
2.4. Dosage des paramètres biochimiques du plasma	22
2.4.1. Dosage du glucose par la Méthode de Dubois et <i>al</i> (1956)	22
2.4.1.1. Principe	22
2.4.1.2. Mode opératoire	22
2.4.2. Dosage du cholestérol et des triglycérides	23
2.4.3. Dosage des protéines totales (Bradford, 1976)	23
2.4.3.1. Principe	23

2.4.3.2. Méthode de dosage	23
2.5. Dosage des enzymes de détoxification	24
2.5.1. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (Claiborne, 1985)	24
2.5.1.1. Principe	24
2.5.1.2. Méthode de dosage	24
2.5.1.3. Calcul	24
2.5.2. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) (Habig et <i>al.</i> , 1974)	24
2.5.2.1. Principe	24
2.5.2.2. Méthode de dosage	25
2.5.2.3. Calcul	25
2.6. Evaluation statistique	25
III. Résultats et discussion	26
1. Résultats	26
1.1. Les paramètres biochimiques	26
1.1.1. Le taux du glucose plasmatique	26
1.1.2. Le taux du cholestérol plasmatique	27
1.1.3. Le taux des triglycérides plasmatiques	28
1.1.4. Le taux des protéines totales plasmatiques	29
1.2. Les enzymes de détoxification	30
1.2.1. L'activité enzymatique de la catalase	30
1.2.2. L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase	31
2. Discussion	32
Conclusion	34
Références bibliographiques	35
Annexes	

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN_{mt}	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADN_n	Acide désoxyribonucléique nucléaire
BBC	Bleu brillant de coomassie G-250
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Catalase
cCu, Zn-SOD	Superoxyde dismutase cytosolique associée aux ions cuivre et zinc
cGPx	Glutathion peroxydase cytoplasmique
Cu/Zn-SOD	Superoxyde dismutase associée aux ions cuivre et zinc
DO	Densité optique
ecCu, Zn-SOD	Superoxyde dismutase extracellulaire associée aux ions cuivre et zinc
ERA	Espèces réactives dérivées de l'azote
ERO	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
giGPx	Glutathion peroxydase gastro-intestinale
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HOCl	L'acide hypochloreux
LDL	Lipoprotéines de basse densité
MDA	Malondialdéhyde
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MOAT	<i>Multispecific organic anion transport</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
M-NO	Métal-nitrosyl
Mn-SOD	Superoxyde dismutase associée au manganèse
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NaF	Fluorure de sodium
NO[•]	Oxyde nitrique
NO₂[•]	Le dioxyde nitrique
NOS	NO synthase

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet
O_2^-	Anion superoxyde
OH^-	Ion hydroxyl
OH^\bullet	Radical hydroxyle
ONOO^-	Ion peroxydinitrite
ONOOH	Le peroxydinitrite
PBS	<i>Phosphate Buffer solution</i>
pCu, Zn-SOD	Superoxyde dismutase plasmatique associée aux ions cuivre et zinc
pGPx	Glutathion peroxydase plasmatique
PHGPx	<i>Phospholipid hydroperoxyde glutathione peroxydase</i>
R\bullet	Radical d'acide gras.
RH	Acide gras polyinsaturé.
RO\bullet	Radical alkoxy.
ROO\bullet	Radical peroxy.
ROOH	L'hydroperoxyde organique
SH	Groupement sulfhydryle
snGPx	Glutathion peroxydase épидидymaire
SOD	Superoxyde dismutase
TXn	Thiorédoxine

Liste des figures

Fig. 1	Schéma illustrant l'implication du GSH dans le métabolisme des xénobiotiques et des radicaux libres	15
Fig. 2	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes	19
Fig. 3	Effet de la vitamine C sur le taux du glucose plasmatique chez les rats intoxiqués au fluorure de sodium	26
Fig. 4	Effet de la vitamine C sur le taux du cholestérol plasmatique chez les rats intoxiqués au fluorure de sodium	27
Fig. 5	Effet de la vitamine C sur le taux des triglycérides plasmatiques chez les rats intoxiqués au fluorure de sodium	28
Fig. 6	Effet de la vitamine C sur le taux des protéines totales plasmatiques chez les rats intoxiqués au fluorure de sodium	29
Fig. 7	Effet de la vitamine C sur l'activité enzymatique de la catalase chez les rats intoxiqués au fluorure de sodium	30
Fig. 8	Effet de la vitamine C sur l'activité enzymatique de la glutathion S- transférase chez les rats intoxiqués au fluorure de sodium	31

Liste des tableaux

Tab.1	Exemples de réactions de transformation des xénobiotiques au sein de l'organisme	3
Tab. 2	Réalisation de la gamme d'étalonnage du glucose	22
Tab. 3	Réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines	23



Introduction

Introduction

Le stress oxydatif, défini comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers, conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. Les espèces réactives à l'origine du stress sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés (Pincemail et *al.*, 1999).

Un grand nombre de xénobiotiques provoquent le stress oxydant. Le fluorure de sodium est notamment par son ion fluorure, l'élément le plus électronégatif dans la nature, une molécule génératrice du stress oxydatif. L'ion fluorure traverse les membranes cellulaires très rapidement et se distribue dans le muscle du squelette et dans le muscle cardiaque ainsi que dans le foie, la peau et les érythrocytes (Bouaziz et *al.*, 2006 ; Akdogan et *al.*, 2002 (a), (b) ; Chlubek, 2003). Le stress oxydant constitue un des mécanismes soulignant l'intoxication au fluorure. Des changements morphologiques, histologiques et biochimiques dans plusieurs tissus ont été rapportés dans des études menées sur des animaux qui ont reçus différentes doses de fluorure (Chinoy et Patel, 1998 ; Guan et *al.*, 1998). La génération de radicaux libres, la peroxydation lipidique, et l'altération des systèmes de protection antioxydante sont considérées comme jouant un rôle important dans les effets toxiques du fluorure.

Pour se protéger du stress oxydant l'organisme dispose de systèmes de défense antioxydante. Ces systèmes de nature enzymatique (les superoxydes dismutases, la catalase, les glutathion peroxydases) ou non enzymatique (le glutathion, les vitamines C et E entre autres), d'origine endogène ou exogène, œuvrent pour rétablir l'équilibre oxydatif et réparer les dommages consécutifs au stress. Parmi les molécules antioxydantes, la vitamine C présente une activité antioxydante remarquable qui a fait l'objet de nombreux travaux de recherche qui ont abouti à sa caractérisation précise.

L'objectif de la présente étude expérimentale est d'étudier l'activité antioxydante de la vitamine C contre le stress oxydant provoqué par le fluorure de sodium chez les rats wistar (*Rattus norvegicus albinus*) au niveau du plasma et des érythrocytes. Ce travail comprend trois chapitres : le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur le stress oxydatif, le système de défense antioxydante, le fluorure de sodium, et les érythrocytes ; le deuxième chapitre comporte le matériel et les méthodes utilisés ; et le dernier chapitre englobe les résultats et la discussion.



Synthèse bibliographique

1. Généralités

Les xénobiotiques sont des substances étrangères à l'organisme, elles sont de faible poids moléculaire et comportent les médicaments et les substances de l'environnement. Ces substances peuvent être naturelles ou artificielles, elles sont souvent hydrophobes et chimiquement réactives et doivent être métabolisées pour être neutralisées et surtout éliminées (Habdous et *al.*, 2004).

Le tableau 1 montre que le métabolisme des xénobiotiques, nommé aussi biotransformation, est orchestré en trois phases : I (réactions d'oxydation), II (réactions de conjugaison) et III (systèmes de transport impliquant les protéines ABC) (Habdous et *al.*, 2004).

Tableau 1 : Exemples de réactions de transformation des xénobiotiques au sein de l'organisme (Habdous et al., 2004).

Réactions		Enzymes	Substrats connus
Phase I			
Oxydation	Hydroxylation, oxydation	Cytochromes P450	Phénobarbital, aniline, phénothiazine, HAP
	Décarboxylation, désamination	Cytochromes P450	Codéine, amphétamine, histamine
	Déshydrogénation	Alcool déshydrogénase	Alcool
	Déshydrogénation des amines	Monoamine oxydase	Catécholamine
	Déhalogénéation	Cytochromes P450	Hydrocarbures dihalogénés
	Oxydation des radicaux	Superoxyde dismutase	Oxygène singulet, radical hydroxyle
Réduction	Peroxydation	Glutathion peroxydase NAD(P)H-quinone oxydoréductase	Lipoperoxydes Quinones
	Phase II		
Conjugaison	Glucuroconjugaison	UDP-glucuronosyltransférases	Phénol, alcool, amines, sulfamide, morphine
	Sulfoconjugaison	Sulfotransférases	Phénol, amines aromatiques, sulfamides
	Acétylation	O-, N-acétyltransférases	Sulfamides, procaïne
	Méthylation	O-, N-méthyltransférases	Nicotinamides
	Conjugaison au GSH	Glutathion-S-transférases	Époxydes, lipoperoxydes, quinones, carbonyles α,β -insaturés, anticancéreux.
Phase III			
Protéines ABC			
MRP	Transport		Médicaments, conjugués au GSH et à l'acide glucuronique
MDR	Transport		Médicaments, conjugués au GSH et à l'acide glucuronique
MOAT	Transport		Médicaments, conjugués au GSH et à l'acide glucuronique

La biotransformation peut conduire schématiquement à trois types de produits :

- Des métabolites chimiquement stables et non toxiques inactifs, ce qui est le cas habituel, surtout pour les formes hydroxylées et conjuguées, qui sont suffisamment solubles pour être éliminées par la bile et l'urine : c'est la voie de détoxification hépatique ;
- Des métabolites chimiquement stables et toxiques, par métabolisme de produits parents toxiques ou non ;
- Des métabolites chimiquement instables et donc souvent toxiques, généralement produits par des réactions d'oxydation : ce sont des métabolites capables de contracter des liaisons covalentes avec les macromolécules intracellulaires et de produire ainsi des effets toxiques : c'est le cas des radicaux libres tels que ceux produits par le métabolisme du paraquat (pesticide) dans le parenchyme pulmonaire, ou par l'oxydation du paracétamol à doses toxiques, responsable d'une nécrose hépatocytaire (Marquet et Lachâtre, 1998).

2. Les radicaux libres

2. 1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique, atomique ou moléculaire, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires, et capable d'existence indépendante (Helliwell, 1989). La présence d'électrons célibataires confère au radical libre une grande réactivité (demi-vie courte) (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003). Pour gagner une stabilité, le radical libre réagit avec des atomes ou des molécules (Borel et *al.*, 2006) en étant une espèce oxydante ou réductrice (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003).

Actuellement, il est fait mention d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) pour désigner à la fois les radicaux libres dérivés de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO^{\cdot} , ROO^{\cdot}) et les espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène (H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$, $ONOO^{\cdot}$). Par ailleurs, tous les radicaux libres ne dérivent pas de l'oxygène comme le monoxyde d'azote NO^{\cdot} qui dérive de l'azote (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003). A noter aussi que l'ion $ONOO^-$ est considéré comme une espèce réactive de l'azote tout comme de l'oxygène (Belli, 2008) et l'acide hypochloreux $HOCl$ est un dérivé du chlore (Auberval, 2010).



2.2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

2.2.1. Les dérivés radicalaires de l'oxygène et de l'azote

2.2.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

C'est l'espèce la plus couramment générée par la cellule. Elle est formée par réduction de l'oxygène moléculaire selon la réaction :



La réaction semble être surtout catalysée par des NADPH oxydases membranaires des mitochondries. L'anion peut être formé aussi au sein de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes (via la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysée par la xanthine oxydase) (Wolin, 1996), et les mitochondries où 2 % de l'oxygène utilisé dans la respiration est converti en $O_2^{\cdot-}$, pourcentage qui augmente lors d'une respiration plus intense ou lorsque interviennent des désordres inflammatoires ou nutritionnels qui augmentent avec l'âge (Favier, 2003).

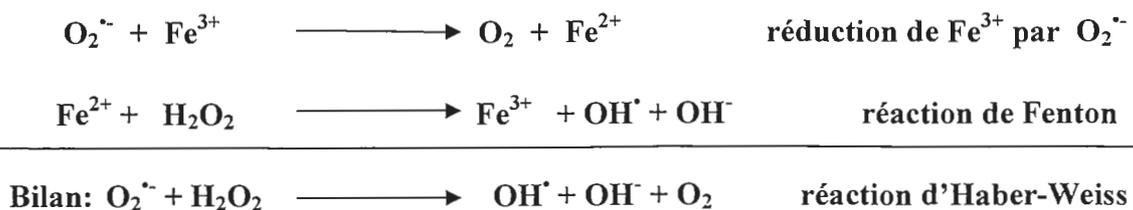
Le $O_2^{\cdot-}$ est relativement stable et peu toxique pour l'organisme mais il est l'initiateur de cascades de réactions aboutissant à la production de composés plus réactifs et nocifs.

2.2.1.2. Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})

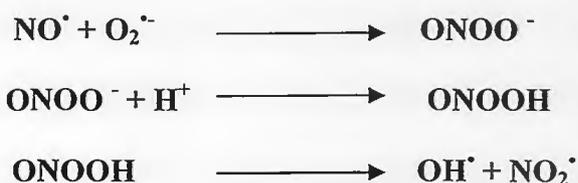
Il est formé par la dégradation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en présence de métaux de transition (fer et cuivre) sous leur forme réduite. Ainsi le peroxyde d'hydrogène associé à du fer ferreux conduit à la réaction de fenton :



La mise en jeu de cette réaction *in vivo* a longtemps fait l'objet de controverse. Actuellement, il est généralement admis que le radical hydroxyle est produit *in vivo* suivant la réaction d'Haber-Weiss (Cossu et *al.*, 1997), qui est la résultante de la réaction de réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} grâce au pouvoir réducteur du radical superoxyde et de la réaction de fenton (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) :



Une autre source de ce radical est l'interaction entre $O_2^{\cdot-}$ et l'oxyde nitrique NO^{\cdot} selon le schéma réactionnel suivant (Bourdon, 2004) :



L'acide hypochloreux, généré notamment lors de la phagocytose par action de la myéloperoxydase, peut aussi conduire à la formation de radicaux OH^{\cdot} (Bonfont-Rousselot et al., 2003) :



Avec une durée de vie de l'ordre de la nanoseconde le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène (Marfak, 2003). Il apparait comme ayant la responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Frelon, 2001).

Il a une capacité à diffuser restreinte (Delattre et al., 2005) et réagit sur le lieu de sa production (Bonfont-Rousselot et al., 2003). Il peut attaquer tous les types de constituants cellulaires :

- Par addition sur la molécule cible, comme dans le cas des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques,
- Par arrachage d'un atome d'hydrogène, ce qui peut initier la peroxydation lipidique des acides gras insaturés et la dégradation des acides aminés,
- Par transfert d'électrons (Cossu et al., 1997).

2.2.1.3. Le radical alcoxyl (RO^{\cdot})

Il se produit lors de la dégradation des peroxydes organiques, il est très réactif (Markaf, 2003).

2.2.1.4. Les radicaux peroxy (ROO^{\cdot})

Ils se forment par l'addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres carbonés. Ils sont peu réactifs mais sont capables de diffuser à travers les membranes biologiques (Badouard, 2006).

2.2.1.5. L'oxyde nitrique (NO^{\cdot})

L'oxyde nitrique, molécule gazeuse peu réactive et hautement diffusible dans les membranes biologiques, est présent dans tous les types de cellules (Massion et al., 2002). Les NO synthases (NOS) assurent la biosynthèse du NO^{\cdot} . Elles catalysent la réaction entre l'atome d'azote appartenant à la L-arginine et une molécule d'oxygène (Sarr, 2004).

La toxicité du NO[•] réside en sa capacité de générer des ions nitrites (NO₂[•]) ou de fixer un groupement nitroxyyle sur les acides aminés comme la tyrosine pour générer la nitrotyrosine. Aussi lorsque le NO[•] interagit avec les métaux de transition (principalement le fer), il se produit une réaction de M-nitrosylation, qui aboutit à la formation de complexe métal-nitrosyl (M-NO), au niveau de différentes métallo-enzymes dont les hémoprotéines (Wink et *al.*, 1997).

2.2.1.6. Le dioxyde nitrique (NO₂[•])

Le dioxyde nitrique est formé à partir de la réaction du radical pyroxyyle avec NO. Il est un puissant déclencheur de la peroxydation lipidique par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (Hamadi, 2010).

2.2.2. Les composés oxygénés non radicalaires

2.2.2.1. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Lorsqu'un second électron s'additionne à l'anion superoxyde, il en résulte l'ion peroxyde qui est protonné immédiatement en H₂O₂ dans les conditions de pH physiologique, compte tenu du pka très élevé de H₂O₂. Toutefois, la source majeure de H₂O₂ est la dismutation de l'O₂^{•-} catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction (Coulon, 2005) :



Le H₂O₂ est généré dans le peroxysome, les microsomes et les mitochondries. Le peroxyde d'hydrogène est capable de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires pour engendrer des dommages sur des distances relativement grandes du site de production.

2.2.2.2. L'oxygène singulet (¹O₂)

Il représente l'état excité de l'oxygène moléculaire dans sa forme delta (¹O₂ Δg) et se caractérise par la présence d'électrons périphériques à spin antiparallèles (Badouard, 2006). De ce fait, il est très instable et extrêmement réactif vis-à-vis des molécules riches en électrons. Il peut se former au niveau des pigments biologiques (chlorophylles, rétinol, flavines et porphyrines) lors de leur exposition à la lumière en présence d'O₂ :



2.2.2.3. L'acide hypochloreux (HOCl)

L'acide hypochloreux est un oxydant puissant, capable de réagir avec de nombreuses molécules biologiques notamment celles contenant des groupements thiols (-SH). Il est généré lors de la phagocytose par action de la myéloperoxydase, participant ainsi à la bactéricidie (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2003) :



2.2.2.4. Le peroxynitrite (ONOOH)

Il est formé par la réaction de NO[•] avec l'O₂^{•-} :



L'ion ONOO⁻ est considéré comme une espèce réactive de l'azote mais aussi de l'oxygène, sa protonation en acide (ONOOH) donne une espèce très oxydante (Sarr, 2004).

2.2.2.5. L'hydroperoxyde organique (ROOH)

C'est la forme hydrogénée du radical peroxy. Il est réactif et se décompose en radical peroxy ou en radical alcoxy (Haton, 2005).

3. Le stress oxydant et les systèmes de défenses antioxydantes

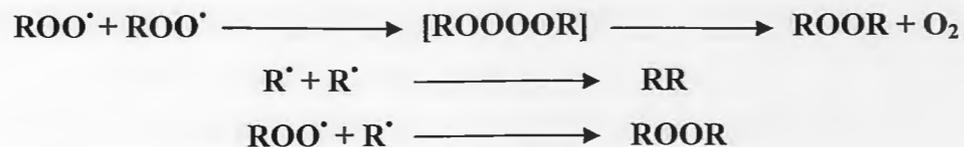
3.1. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd et *al.*, 2003). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999). Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sont donc à l'origine du stress. En réalité ces espèces sont produites par divers mécanismes physiologiques car elles sont utiles à l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. En temps normal on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme des espèces en question, l'excès de ces dernières est appelé stress oxydant (Favier, 2003). Celui-ci peut être aussi induit par des perturbations provenant de l'environnement de l'organisme (Silvestre, 2005) par exposition excessive à des facteurs environnementaux (xénobiotiques, métaux lourds, irradiations ionisantes, pathogènes, etc.) (Martin, 2003).

3.2. Les conséquences biochimiques du stress oxydant

3.2.1. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique, réaction caractéristique des lipides, est amorcée par l'attaque des lipides et principalement de leurs acides gras polyinsaturés par le radical hydroxyle (OH^\bullet) qui arrache un hydrogène sur un carbone situé entre deux doubles liaisons. Cette réaction produit un radical diène conjugué qui sera oxydé en radical peroxyde (Favier, 2003). Le radical peroxyde peut arracher un autre hydrogène d'une autre molécule lipidique, ce qui fait progresser la peroxydation lipidique par une réaction en chaîne autocatalytique. A ce stade le radical peroxyde se combine avec l'hydrogène qu'il capte pour former un hydroperoxyde lipidique ou un peroxyde cyclique. La molécule lipidique à laquelle l'hydrogène a été arraché se transforme en radical qui repart dans le circuit de peroxydation assurant ainsi sa propagation (Amzal, 2010). Au stade terminal les radicaux libres produits se combinent les uns aux autres stoppant les réactions en chaînes pour mettre fin à la peroxydation (Amzal, 2010). La réaction finale schématisée ci-dessous produit un composé non radicalaire par formation d'une liaison covalente suivant différents cas de figures (Eymard, 2003) :



Les hydroperoxydes peuvent aussi continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Les peroxydes cycliques, après coupure moléculaire, peuvent libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde ou l'hydroxynonanal (Favier, 2003).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences sont différentes selon le cas : l'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées, alors que l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane (et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs) et la transduction des signaux (Favier, 2003).

3.2.2. L'oxydation des protéines

Des modifications s'opèrent sur les protéines au cours d'un stress oxydant, soit sous l'action des ERO et ERA, soit en présence de cations métalliques tels le Fe^{2+} et le Cu^{2+} (Stadtman, 1991 ; 1993). Les modifications en question peuvent être de plusieurs types : fragmentation de la protéine par cassure des liaisons peptidiques, oxydation des chaînes latérales

des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonnetfont-Rousselot et *al.*, 2001). Tous les acides aminés constituant les protéines peuvent être oxydés mais les protéines comportant un groupement sulfhydryle (SH) (cystéine et méthionine) et des acides aminés aromatiques (tyrosine et triptophane) sont les plus sensibles et les plus en proie aux dommages consécutifs au stress (Belli, 2008).

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés. L'histidine, la proline, l'arginine et la lysine sont particulièrement prédisposées à cette attaque. La formation de nitrotyrosines est due au peroxy-nitrite hautement toxique, produit par la réaction du monoxyde d'azote et du superoxyde (Levine, 2002).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales (Favier, 2003).

3.2.3. L'oxydation de l'ADN

Il existe au sein de la cellule deux types d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO 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 des ERO cellulaires : 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 et *al.*, 2002).

Les dommages médiés par le stress oxydant au niveau de l'ADN sont de cinq types : l'oxydation des bases, la formation de sites abasiques, les adduits intra-caténaux, les cassures de brins et les pontages ADN-protéines (Cadet et *al.*, 2002).

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimido uracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des

aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine. Le rôle des nombreux métaux (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd...) fixés à l'ADN, qui est un polyanion, est crucial pour amplifier ou orienter le profil de ces lésions (Favier, 2003).

3.3. Les systèmes de défenses antioxydantes

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Boyd *et al.*, 2003).

Les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. Certains agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation (en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras) tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Vansant, 2004).

Les systèmes de défense primaire et secondaire, sont les deux systèmes mis en jeu par l'organisme dans la défense antioxydante.

3.3.1. Le système de défense antioxydante primaire

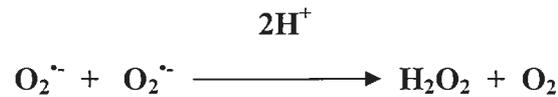
Constitué de systèmes enzymatiques et non enzymatiques (endogènes et exogènes), le système primaire est mis en œuvre par l'organisme pour se protéger des dommages que peuvent engendrer les espèces réactives de l'oxygène.

3.3.1.1. Le système de défense antioxydante enzymatique

Composant le système enzymatique antioxydant primaire, des enzymes auront comme fonction d'empêcher l'initiation ou la propagation des réactions radicalaires (Krinsky, 1989). Les plus importantes développées ci-dessous sont les superoxydes dismutases, la catalase, et les glutathion peroxydases.

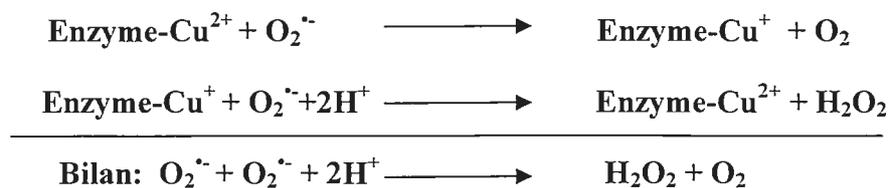
a) Les superoxyde dismutases

Les superoxyde dismutases représentent une grande famille de métalloprotéines possédant des groupements prosthétiques différents (Bourdon, 2000). Elles catalysent la dismutation mono-électronique de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène moléculaire (O_2) (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) selon la réaction :

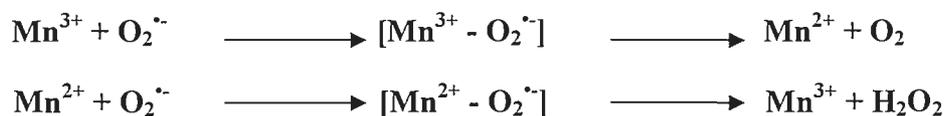


Les superoxyde dismutases existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (Mn-SOD) protégeant la mitochondrie, et les superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu, Zn-SOD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales ainsi que l'espace interstitiel des tissus et les fluides extracellulaires (ecCu, Zn-SOD) ou le plasma sanguin (pCu, Zn-SOD) (Favier, 2003 ; Soares, 2005).

Dans le cas de la (Cu, Zn-SOD), les ions Cu^{2+} sont nécessaires à l'activité superoxyde dismutase, tandis que les ions Zn^{2+} (qui n'ont qu'un seul état de valence possible) ne participent pas au cycle catalytique, mais stabilisent la structure de l'enzyme. L'enzyme est de couleur bleu-vert et est inhibée par le cyanure et le diéthylthiocarbamate (qui lie le Cu^{2+} et le retire du site actif). Sa catalyse de la dismutation est comme suit (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) :

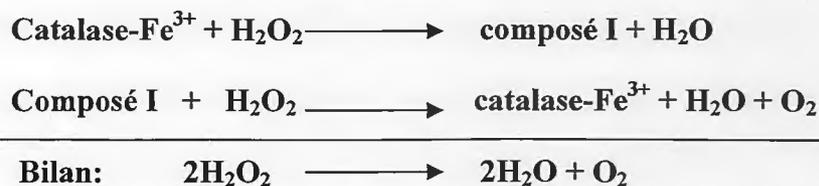


La Mn-SOD entièrement différente de la Cu, Zn-SOD est de couleur rose en rapport avec le manganèse du site actif. Elle n'est pas inhibée par le cyanure et le diéthylthiocarbamate. Sa catalyse de la dismutation est comme suit (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) :



b) La catalase

La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) en eau et oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2003) :



Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (pour les cellules qui ne possèdent pas cette organelle, exemple : érythrocytes) (Lindau-Shepard et Shaffer, 1993).

La catalase est une enzyme tétramérique, chaque sous unité comporte un groupement ferriprotophyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' H_2O_2 (Delattre et *al.*, 2005).

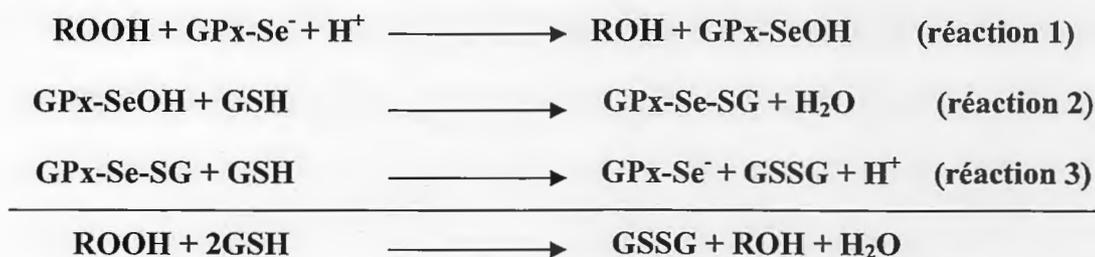
La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée, et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Cantin et Paquette, 1999).

c) Les glutathion peroxydases

Les GPx constituent une famille d'enzymes capables de réduire des composés hydroperoxydes en leurs composés hydroxyles correspondants en utilisant du glutathion ou des agents réducteurs équivalents comme Co-substrats (Gladyshef et *al.*, 1999 ; Arthur 2000).

Il existe des GPx avec ou sans résidu séléno-cystéine dans leur site actif mais les plus courantes sont celles possédant une séléno-cystéine. Jusqu'à présent 5 GPx séléno-cystéine ont été identifiées GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 et GPx5 chez les eucaryotes : la GPx1 ou cGPx cytoplasmique et mitochondriale, la GPx2 ou giGPx gastro-intestinale, la GPx3 ou pGPx plasmatique, la GPx4 ou PHGPx (*Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase*) à localisation intracellulaire et la GPx5 ou snGPx épидidymaire. La plus abondante est la GPx1. Elle est exprimée dans la plupart des cellules (Bouldjadj, 2008 ; Bacot, 2004).

L'ensemble des GPx séléno-cystéine catalysent la réduction des hydroperoxydes minéraux ou organiques en eau et en alcool lipidique respectivement, tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG). Toutes ces enzymes contiennent dans leurs sous-unités un à quatre atomes de sélénium selon l'isoenzyme (Delattre et *al.*, 2005). Elles fonctionnent toutes selon le même mécanisme catalytique suivant :



La première étape est une oxydation du groupement séléniol de l'enzyme par un hydroperoxyde pour former un acide séléinique (réaction 1). La seconde étape conduit à la formation d'une liaison covalente entre le soufre du GSH et le sélénium de l'enzyme (réaction 2). La dernière étape est la régénération de l'enzyme sous sa forme réduite grâce à l'action d'une deuxième molécule de GSH qui rompt le pont sélénosulfure (réaction 3) (Favier, 2003). L'activité antioxydante de ces peroxydases est cependant très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Favier, 2003 ; Delattre et *al.*, 2005).

3.3.1.2. Le système de défense non enzymatique

Les antioxydants non-enzymatiques réagissent directement avec les agents oxydants et les désactivent (Servais, 2004).

A) Le système de défense non enzymatique endogène

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide lipoïque, l'ubiquinone (coenzyme Q₁₀), et le cytochrome c.

De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (GSH) (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui est un tripeptide (γ glutamyl-cystéinyl-glycine). Il protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO[•] (Favier, 2003). Le glutathion peut en effet non seulement réduire le H₂O₂ en eau en agissant comme co-substrat des glutathion peroxydases ainsi que les peroxydes de types ROOH en alcool, mais également interagir directement avec les ERO formés par l'oxydation des vitamines E et C baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (figure 1) (Bourdon, 2004 ; Cossu et *al.*, 1997).

Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et *al.*, 1992). Le glutathion est un constituant intracellulaire ubiquiste présent à des concentrations millimolaires dans la plupart des cellules et micromolaires dans le plasma (Gérard-Monnier et Chaudière, 1996).

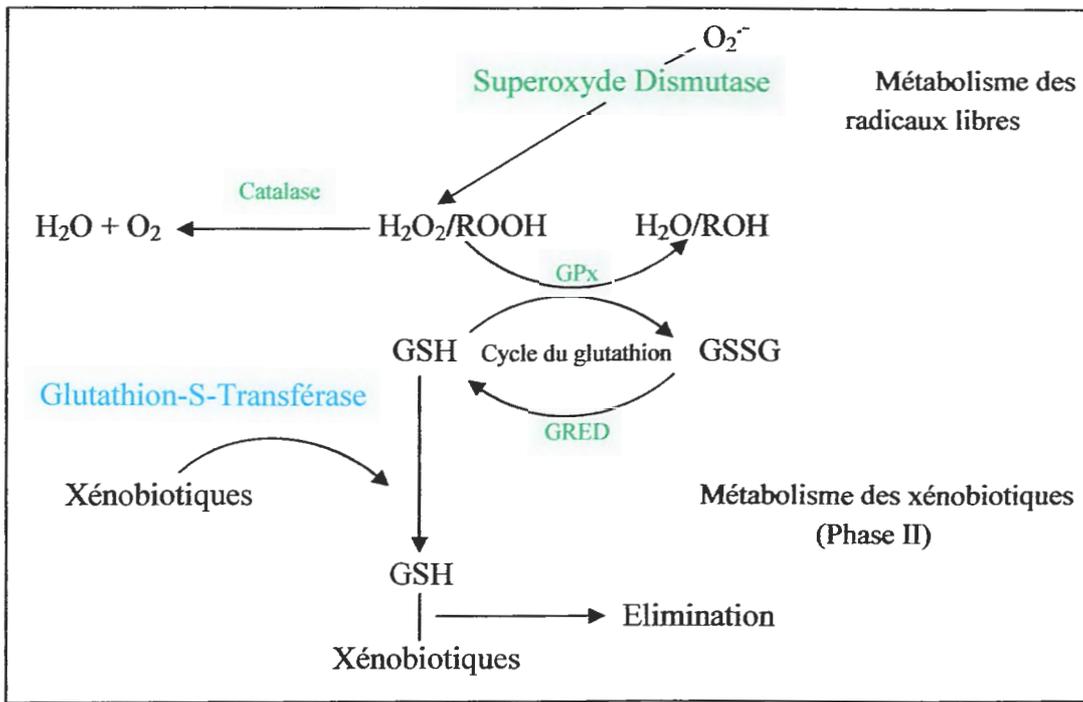


Figure 1 : Schéma illustrant l'implication du GSH dans le métabolisme des xénobiotiques et des radicaux libres (Bourdon, 2004).

L'acide urique présente également, aux concentrations physiologiques, une activité antioxydante puisqu'il piège les radicaux OH^{\cdot} . La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger des radicaux peroxydes (ROO^{\cdot}) et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neužil et Stocker, 1993). L'acide alpha-lipoïque est un antioxydant qui peut piéger les radicaux libres aux niveaux intracellulaire et extracellulaire. Du fait qu'il est aussi bien liposoluble qu'hydrosoluble, il peut accéder à toutes les parties de nos cellules (Packer et *al.*, 1995). En étant impliqué dans la formation de l'acétyl co-enzyme A à partir du pyruvate, il est un réducteur puissant sous sa forme réduite, capable de réduire le glutathion et les radicaux peroxydes, et de désactiver l'oxygène singulet (Cossu et *al.*, 1997). L'ubiquinone (co-enzyme Q_{10}), sous la forme "ubiquinol-10", sa forme réduite, agit comme antioxydant (Power et Lennon, 1999). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ERO (Packer et *al.*, 1997). Le cytochrome c, présent aux niveaux de la

membrane interne de la mitochondrie, a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\cdot-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' H_2O (Skulachev, 1998).

B) Le système de défense non enzymatique exogène

1. La vitamine C

1.1. La nature de la vitamine C

La vitamine C est l'acide ascorbique, très soluble dans l'eau, et sensible à la chaleur et à l'oxydation par l'air. Au plan chimique, sa forme ionisée (ascorbate) est un donneur d'électrons (un réducteur) qui se transforme tout d'abord en intermédiaire radicalaire (semi-déhydroascorbate) puis en déhydroascorbate (forme oxydée). Le radical ascorbyle est relativement peu réactif et disparaît en terminant les chaînes radicalaires, se qui redonne naissance à l'ascorbate et produit du déhydroascorbate. Ce dernier dérivé est lui-même immédiatement retransformé en ascorbate par des enzymes de type réductases ou par réduction chimique par le glutathion (Corpet, 2008 ; Neve et Pincemail, 2008).

1.2. Les sources de la vitamine C

Les principales sources alimentaires de vitamine C sont les fruits ayant un caractère acide qui stabilise la vitamine C (Kiwi, acérola, agrumes, fraise, framboises, groseilles, cassis, cerises, papaye), et les végétaux colorés comme les choux, les brocolis, les tomates, les poivrons, les nouvelles pommes de terre, le persil, la mâche et le cresson de fontaine (Neve et Pincemail, 2008).

1.3. L'effet antioxydant de la vitamine C

La vitamine C permet de régénérer l'activité antioxydante de la vitamine E dans les systèmes cellulaires. Elle la maintien sous sa forme réduite active en réagissant avec le radical tocophéryle formé lors de l'inhibition de la peroxydation lipidique membranaire par la vitamine E. Ce phénomène, qui démontre que les antioxydants agissent de manière complémentaire, est impliqué dans la protection des LDL contre l'oxydation (Corpet, 2008 ; Neve et Pincemail, 2008).

Des études réalisées sur du plasma montrent que l'ascorbate est la première ligne de défense contre les radicaux libres hydrosolubles : il réagit rapidement et désactive les radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ et hydroxyle HO^{\cdot} , ainsi que l'oxygène singulet 1O_2 . Il d'interagit aussi avec le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'oxyde nitrite NO^{\cdot} (Corpet, 2008 ; Neve et Pincemail, 2008).

Contrairement à une idée simpliste répandue, la vitamine C n'est pas un «antioxydant» qui permettrait de contrer les radicaux libres. La vitamine C est en fait un agent redox : c'est un antioxydant dans certaines circonstances, probablement aux concentrations apportées par les végétaux ; c'est aussi un oxydant puissant, qui participe à la formation de radicaux libres dans d'autres circonstances. C'est peut-être le cas lorsqu'il est apporté pur et en grande quantité par des suppléments médicamenteux, en particulier lorsqu'il est associé avec du fer, ou donné à quelqu'un qui a des réserves excessives de fer (Corpet, 2008).

2. Autres molécules antioxydantes exogènes

2.1. La vitamine E

Le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' α -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' α -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle (OH^\cdot). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxy (ROO^\cdot) pour former un radical tocophéryle. L' α -tocophérol est régénéré essentiellement selon deux voies ; d'une part, la vitamine C (l'acide ascorbique) est capable de réduire le radical tocophéryle, d'autre part, une enzyme spécifique, glutathion dépendante, la tocophéryl réductase, est capable de réduire le radical tocophéryle en α -tocophérol (Delattre et *al.*, 2005).

2.2. Les caroténoïdes

Les Caroténoïdes sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, mais également dans le lait. Ils protègent notamment contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication. Les exemples de caroténoïdes, incluent l' α carotène, bêta carotène, lycopène, phytofluène, phytoène, lutéine, neoxanthine, viloxanthine, anthéroxanthine, alpha cryptoxanthine et bêta cryptoxanthine. Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet. Cette chaîne polyène, par mécanisme d'addition, permet l'incorporation des espèces réactives ou radicaux libres et de ce fait ralentir leur propagation. De la sorte les caroténoïdes stoppent les réactions en chaîne de peroxydation lipidique et protègent les structures cellulaires contre l'agression oxydante (Hale, 2003 ; Goudable et Favier, 1997).

2.3. Les polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. 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 hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre et *al.*, 2005).

2.4. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, et réaction d'Haber-Weiss) (Garait, 2006).

3.3.2. Le système de défense antioxydante secondaire

Ce système enzymatique a pour rôle d'éliminer les produits du système primaire de détoxification tels que le GSSG.

a) La glutathion réductase

La glutathion réductase a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction.



Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit par le NADPH créé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD) de la voie des pentoses phosphates (Bounekta et *al.*, 2008).

b) Les glutathion-S-transférases

Les glutathion-S-transférases sont une famille d'enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Rajurkar et *al.*, 2003).

La glutathion-S-transférase (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Jiang et *al.*, 2004 ; Gattás et *al.*, 2004). L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit :

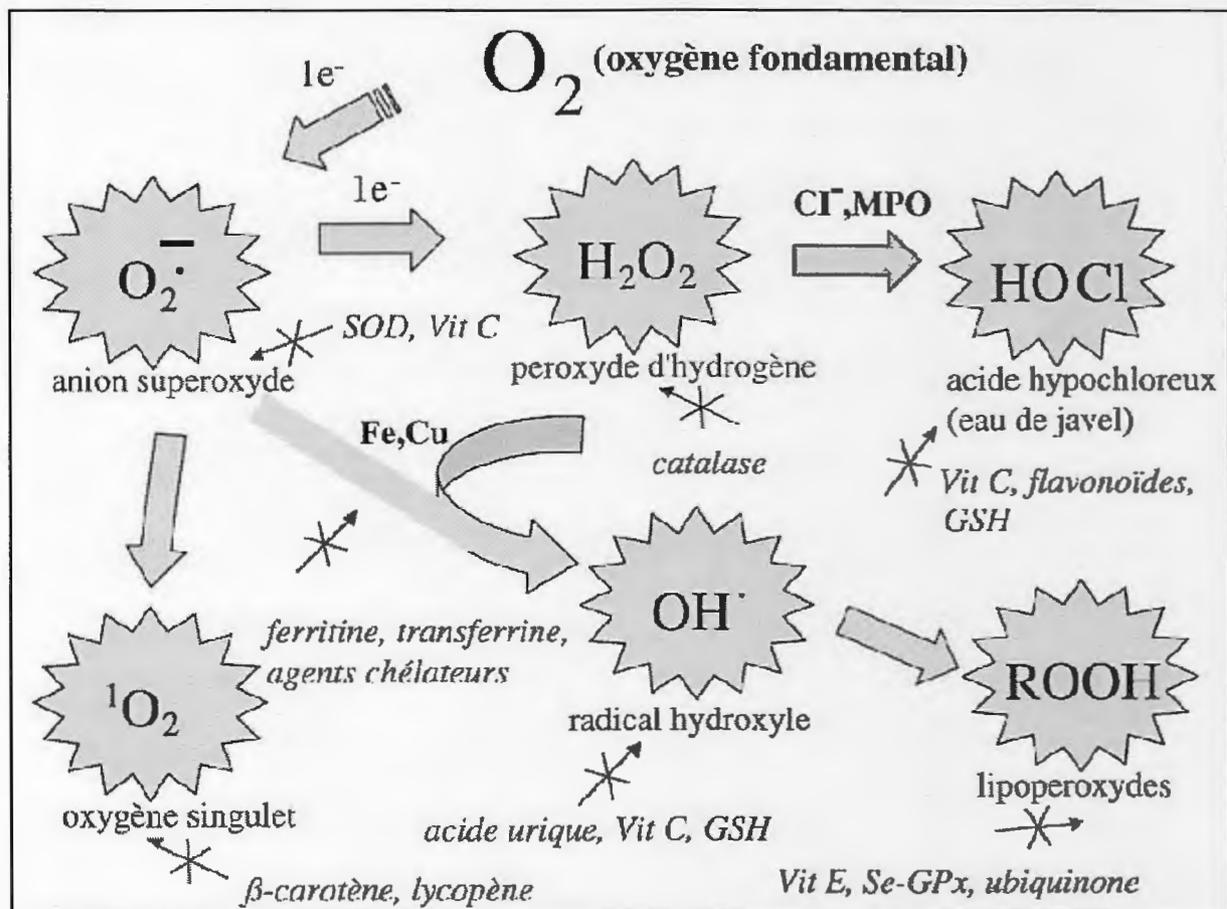
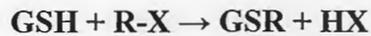


Figure 2 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail, 2002).

4. Le fluorure de sodium

4.1. Propriétés physico-chimiques

Le fluorure de sodium est peu soluble dans l'eau, sa solubilité est de 42g/l à 10°C, et il est insoluble dans l'alcool. La masse molaire du fluorure de sodium est de 42.0, ses points de fusion et d'ébullition sont respectivement 992°C et 1704°C, sa densité (D^{41}_4) est de 2.55 et sa tension de vapeur de 133 Pa à 1077°C. On obtient le fluorure de sodium en saturant l'acide fluorhydrique par du carbonate de soude pur.

4.2. Les utilisations

Le fluorure de sodium (NaF) fait partie des composés fluorés utilisés dans les préparations médicamenteuses de dentifrice. Son utilisation est à but carioprophylactique, un effet assuré par l'ion fluorure. Il est aussi utilisé comme agent carioprophylactique dans l'eau de boisson. Le fluorure de sodium est utilisé aussi dans nombre d'industries. Les principales industries concernées sont les suivantes :

- Métallurgie de l'aluminium.
- Préservation du bois et fabrication d'adhésifs.
- Fabrication des insecticides.

4.3. La toxicité

Le fluorure de sodium est toxique en cas d'ingestion. Il est irritant pour les yeux et la peau. Au contact d'un acide, il dégage un gaz très toxique et l'inhalation de ses poussières irrite les voies respiratoires.

5. Les érythrocytes comme modèle pour l'étude du stress oxydant

Les globules rouges sont très riches en enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). De très nombreuses études chez l'animal ont montré que le taux d'enzymes antioxydantes est soit augmenté par expression moléculaire en cas de faible stress oxydatif (adaptation), soit diminué lorsque l'intensité du stress oxydatif est trop importante. La susceptibilité des globules rouges au stress oxydatif peut être aussi déterminée en soumettant ces cellules à un système produisant des ERO de manière constante et en mesurant à intervalles réguliers le taux d'hémolyse comme marqueur *in vitro* du dommage oxydatif (Pincemail et al., 1999).



Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel animal

L'étude de l'effet protecteur de la vitamine C contre la toxicité induite par le fluorure de sodium a été réalisée sur des rats femelles adultes de type Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) pesant entre 100 à 200 g, provenant de l'institut Pasteur d'Alger.

Les 24 rats utilisés pour cette étude ont été logés dans des cages regroupant chacune 6 rats ayant libre accès à l'eau et à la nourriture. Ils ont été maintenus dans un environnement contrôlé sous des conditions standard de température et d'humidité avec une photopériode de 12h / 24h et une aération réalisée à l'aide de deux extracteurs.

2. Méthodes

2.1. Traitement des animaux

Les rats sont répartis en quatre lots chacun contenant six rats:

Lot 1 : lot témoin recevant de l'eau distillée par gavage.

Lot 2 : recevant de la vitamine C à la dose de 10 mg/kg par jour par voie intra-péritonéale pendant 4 jours.

Lot 3 : recevant un traitement à la vitamine C par voie intra-péritonéale à la dose de 10 mg/kg par jour pendant 4 jours, suivi par un traitement au fluorure de sodium en solution à une dose de 100 ppm par gavage pendant 4 jours. Au total le traitement aura duré 8 jours.

Lot 4 : recevant une dose journalière de fluorure de sodium en solution de 100 ppm par gavage pendant 4 jours.

Le traitement des lots 2 et 4 a commencé en même temps que le traitement au fluorure de sodium du lot 3.

2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons

Les animaux sont sacrifiés 24h après le dernier traitement. Le prélèvement du sang a été effectué par ponction cardiaque en utilisant des seringues. Après chaque prélèvement sanguin, le sang est mis dans des tubes à EDTA. Les volumes de sang prélevés ont été de 2.5 ml à 4 ml.

2.3. Préparation des échantillons

Le sang est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 min et le surnageant (plasma) est récupéré pour le dosage du glucose, du cholestérol, des triglycérides et des protéines plasmatiques. Le culot est lavé une fois au PBS puis centrifugé à 3000 tours/ min pendant 15 min. Après centrifugation, les globules rouges sont lysés par un volume de tampon phosphate hypotonique. En fin, après une dernière centrifugation à 3000 tours/ min pendant 15 min, le surnageant (hémolysât) est conservé pour le dosage de la catalase, et de la glutathion-S-transférase.

2.4. Dosage des paramètres biochimiques du plasma

2.4.1. Dosage du glucose par la Méthode de Dubois et *al.*, 1956 modifiée

2.4.1.1. Principe

Cette méthode est basée sur le développement d'une coloration sous l'effet d'un réactif, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du sucre dans le milieu, il s'agit d'un dosage colorimétrique. La micro méthode colorimétrique ou méthode Dubois, est basée sur le même principe.

L'acide sulfurique H_2SO_4 concentré et à chaud provoque le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des alcools des oses, cette déshydratation s'accompagne de la formation d'un Hydroxy-methylfurfural, (cas d'un hexose) et d'un furfural (cas d'un pentose). Ce composé se condense avec le phénol pour donner des composés colorés ; l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'ose en cause.

➤ Réactifs

Acide Sulfurique concentré $d=1,84$, Phénol 5 %, Eau distillée, Solution de glucose (1mg/ml).

2.4.1.2. Mode opératoire

Consiste d'abord en la préparation des dilutions adéquates, puis l'addition des réactifs, et enfin, la lecture de l'absorbance à 488 nm.

Tableau 2 : réalisation de la gamme d'étalonnage du glucose.

Concentration du glucose (mg/ml)	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2
Solution de glucose (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Acide sulfurique $d=1,84$ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Phénol 5% (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Laisser reposer 10 min après agitation.

Mettre au bain-marie pendant 20 à 30 min à 30 ° C.

Lecture de l'absorbance à 488 nm.

La courbe d'étalonnage figure dans l'annexe 2.

2.4.2. Dosage du cholestérol et des triglycérides

Le dosage du cholestérol et des triglycérides a été effectué avec un automate DIAMS et exprimé en g/l.

Le réactif utilisé pour le dosage des triglycérides est le Glycérol peroxydase, PAP (laboratoire Bio magreb).

Le réactif utilisé pour le dosage du cholestérol est le Cho.od.PAP (laboratoire Human).

2.4.3. Dosage des protéines totales (Bradford, 1976)

2.4.3.1. Principe

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode mesure la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu brillant de coomassie G 250 qui se lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant la concentration en protéines dans l'échantillon.

2.4.3.2. Méthode de dosage

Un volume de 100 μ l de la fraction plasmatique du sang dilué à 1/5^{ème} avec de l'eau distillé est ajouté à 4 ml du réactif de Bradford. Après agitation au vortex (Heidolph, REAX top ; Germany), le mélange est incubé 5 min à température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 595 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU, China.).

La concentration en protéines de l'échantillon nécessite l'élaboration d'une gamme d'étalonnage de protéines standards réalisée dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentration connus. Selon le tableau suivant :

Tableau 3 : réalisation de la gamme d'étalonnage des protéines.

Tubes	Blanc	2	3	4	5	6	7	8
Concentration de BSA (mg/ml)	0	0.1	0.25	0.5	1	2	3	4
Solution BSA (μl)	100 (H ₂ O)	100	100	100	100	100	100	100
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4

La courbe d'étalonnage figure dans l'annexe 3.

2.5. Dosage des enzymes de détoxification

2.5.1. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (Claiborne, 1985)

2.5.1.1. Principe

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode de Claiborne (1985). Le principe est basé sur la disparition de l' H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25°C.

2.5.1.2. Méthode de dosage

La cuve de mesure contient : 1 ml de tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1M, pH 7.2), 0.950 ml peroxyde d'hydrogène (0.019M), 0.01 ml de la source enzymatique. La lecture de l'absorbance est effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes.

2.5.1.3. Calcul

Une unité de l'activité de la catalase est calculée par l'équation suivante :

$$K = \left(\frac{2.3033}{T} \times \log \frac{A_1}{A_2} \right)$$

Sachant que :

K : Constante de vitesse de la réaction d'ordre 1.

2.3033 : coefficient d'extinction molaire.

T : Intervalle de temps en minute.

A_1 : Absorbance au temps t_0 .

A_2 : Absorbance au temps t_1 .

L'activité enzymatique de la catalase = K/mg de protéine (U/mg de protéine). La concentration des protéines de l'hémolysât nécessaire pour ce calcul est estimée par la méthode de Bradford (1976).

2.5.2. Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) (Habig et al., 1974)

2.5.2.1. Principe

L'activité enzymatique de la GST est déterminée selon la méthode de Habig et al (1974). Cette activité enzymatique est étudiée en cinétique. Le substrat utilisé est le 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans l'éthanol 95° ; l'enzyme a besoin d'un second substrat pour être active, additionné sous forme de glutathion. L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électron ($\text{GSH} = \text{GS}^\ominus + \text{H}^+$) sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton : attaque électrophile.

2.5.2.2. Méthode de dosage

La mesure de l'activité enzymatique est effectuée au spectrophotomètre à 340 nm et à 25°C. Dans la cuve de mesure, nous avons introduit 1.7 ml du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0.1M, pH 7.2), 100 µl de CDNB (20 mM). Après 10 minutes d'incubation à 37°C, 100 µl de glutathion (20 mM) et 100 µl de l'homogénat (cytosol) sont ajoutés à la cuve de mesure. L'absorbance est suivie pendant 5 minutes avec 1 minute d'intervalle à 340 nm. Le mélange de réaction sans enzyme a été utilisé comme un blanc.

2.5.2.3. Calcul

L'activité de la glutathion-S-transférase est exprimée en activité totale et en activité spécifique.

$$\text{Activité totale de la GST } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\Delta \text{ abs } 340\text{nm} / \text{min test} \times V_t}{V_{ez}} \times \frac{1}{9.6} \times 1/F$$

Sachant que :

9.6 : coefficient d'extinction molaire par mM⁻¹ cm⁻¹

Δ abs 340 nm/min test : différence de l'absorbance

V_t : volume total de cuvette par ml

V_{ez} : volume de la fraction cytosolique ajoutée par ml

F : facteur de dilution

L'activité spécifique de la GST = activité totale/mg de protéine (µmol/min/mg de protéine). La concentration des protéines de l'hémolysât nécessaire pour ce calcul est estimée par la méthode de Bradford (1976).

2.6. Evaluation statistique

Les résultats quantitatifs des différentes évaluations réalisées *in vitro* ont été exprimés en moyenne ± écart type. Ces résultats ont été traités statistiquement à l'aide du logiciel Excel 2007 par l'analyse des tests de student. Toutes les analyses sont réalisées au seuil de signification de 5 %. Pour la valeur *p*, des astérisques (*) sont utilisées afin d'indiquer l'importance de la signification pour la comparaison des différents échantillons avec les rats témoins.

Différence non significative : *p* > 0.05.

Différence significative : * *p* < 0.05.

Différence très significative : ** *p* < 0.01.

Différence hautement significative : *** *p* < 0.001.



Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Les paramètres biochimiques

1.1.1. Le taux du glucose plasmatique

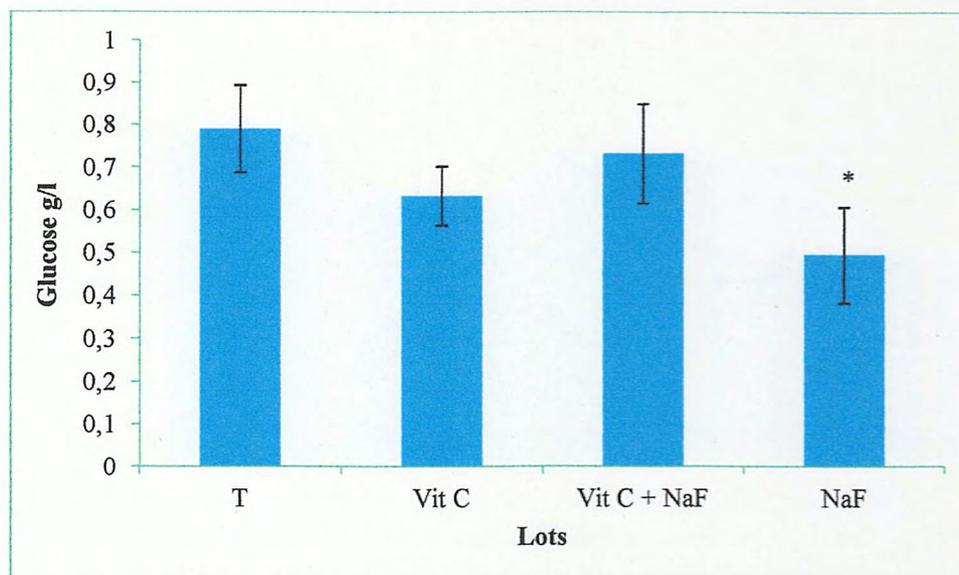


Figure 3 : Effet de la vitamine C sur le taux du glucose plasmatique chez les rats traités au fluorure de sodium. Les données sont exprimées en valeurs moyennes \pm écart type. ^{NaF} $P < 0.05$ versus témoin.

Dans le plasma, chez les rats traités au fluorure de sodium, le taux du glucose (0.495 ± 0.112 g/l) diminue de façon significative comparé au groupe témoin (0.790 ± 0.103 g/l). Les rats traités à la vitamine C puis au fluorure de sodium ont montré une diminution non significative du taux de glucose (0.732 ± 0.117 g/l) comparé au groupe témoin (0.790 ± 0.103 g/l). Le traitement à la vitamine C seule diminue le taux de glucose (0.632 ± 0.069 g/l) chez les rats de façon non significative en comparaison avec le groupe témoin (0.790 ± 0.103 g/l). La comparaison entre le taux de glucose du groupe traité au fluorure de sodium (0.495 ± 0.112 g/l) et le taux de glucose du groupe traité à la vitamine C puis au fluorure de sodium (0.732 ± 0.117 g/l) a montré que la vitamine C rehausse le taux du glucose plasmatique de façon non significative.

1.1.2. Le taux du cholestérol plasmatique

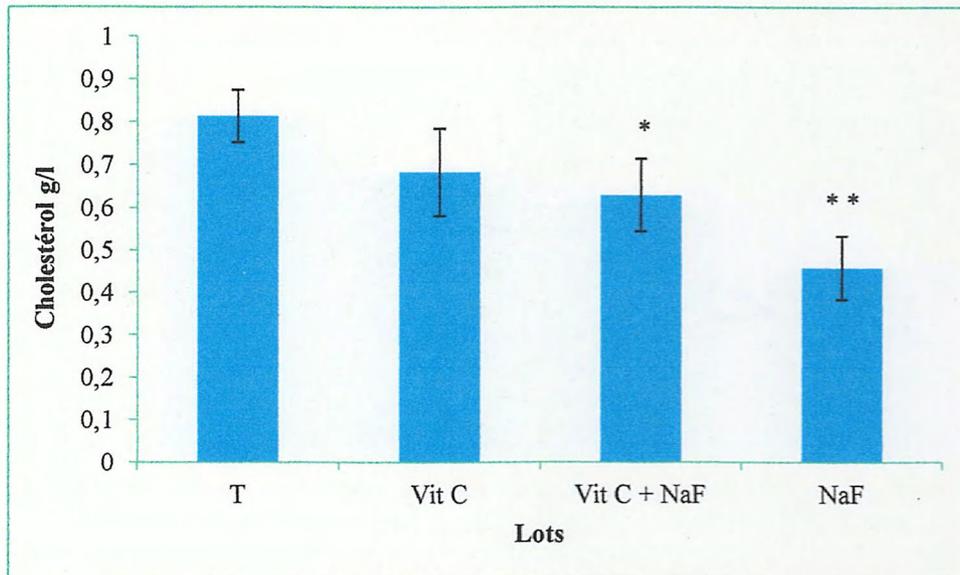


Figure 4 : Effet de la vitamine C sur le taux du cholestérol plasmatique chez les rats traités au fluorure de sodium. Les données sont exprimées en valeurs moyenne \pm écart type. ^{Vit C + NaF} $P < 0,05$ versus témoin. ^{NaF} $P < 0,01$ versus témoin.

Dans le plasma, chez les rats traités au fluorure de sodium, le taux du cholestérol ($0,46 \pm 0,075$ g/l) diminue de façon significative comparé au groupe témoin ($0,813 \pm 0,061$ g/l). Les rats traités à la vitamine C puis au fluorure de sodium ont montré une diminution significative du taux de cholestérol ($0,63 \pm 0,085$ g/l) comparé au groupe témoin ($0,813 \pm 0,061$ g/l). Le traitement à la vitamine C seule diminue le taux de cholestérol ($0,683 \pm 0,102$ g/l) chez les rats de façon non significative en comparaison avec le groupe témoin ($0,813 \pm 0,061$ g/l). La comparaison entre le taux de cholestérol du groupe traité au fluorure de sodium ($0,46 \pm 0,075$ g/l) et le taux de cholestérol du groupe traité à la vitamine C puis au fluorure de sodium ($0,63 \pm 0,085$ g/l) a montré que la vitamine C rehausse le taux du cholestérol plasmatique de façon non significative.

1.1.3. Le taux des triglycérides plasmatiques

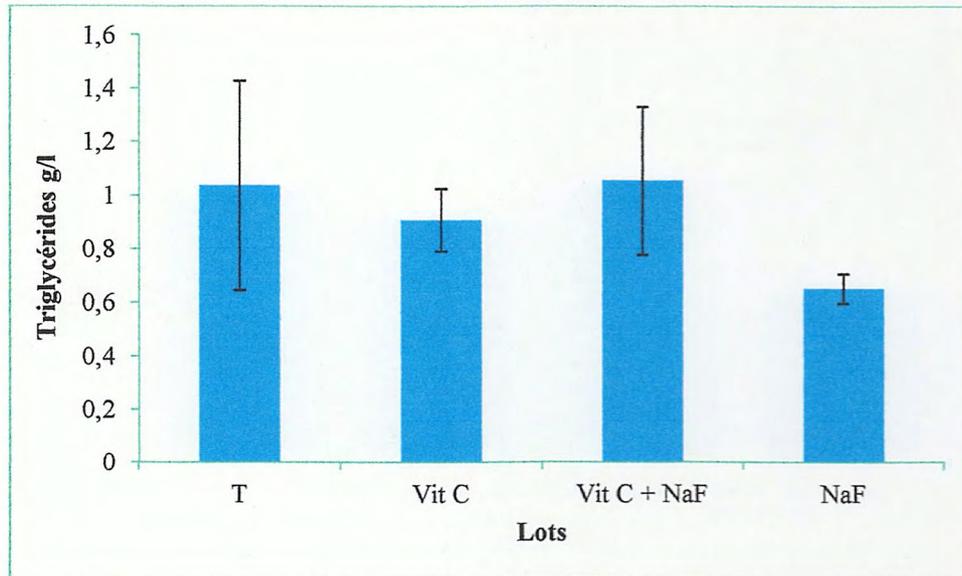


Figure 5 : Effet de la vitamine C sur le taux des triglycérides plasmatiques chez les rats traités au fluorure de sodium. Les données sont exprimées en valeurs moyenne \pm écart type. $P > 0.05$ versus témoin.

Dans le plasma, chez les rats traités au fluorure de sodium, le taux des triglycérides (0.653 ± 0.055 g/l) diminue de façon non significative comparé au groupe témoin (1.036 ± 0.391 g/l). Les rats traités à la vitamine C puis au fluorure de sodium ont montré une augmentation non significative du taux de triglycérides (1.053 ± 0.276 g/l) comparé au groupe témoin (1.036 ± 0.391 g/l). Le traitement à la vitamine C seule diminue le taux des triglycérides (0.906 ± 0.116 g/l) chez les rats de façon non significative en comparaison avec le groupe témoin (1.036 ± 0.391 g/l). La comparaison entre le taux de triglycérides du groupe traité au fluorure de sodium (0.653 ± 0.055 g/l) et le taux de triglycérides du groupe traité à la vitamine C puis au fluorure de sodium (0.63 ± 0.085 g/l) a montré que la vitamine C rehausse le taux des triglycérides plasmatiques de façon non significative.

1.1.4. Le taux des protéines totales plasmatiques

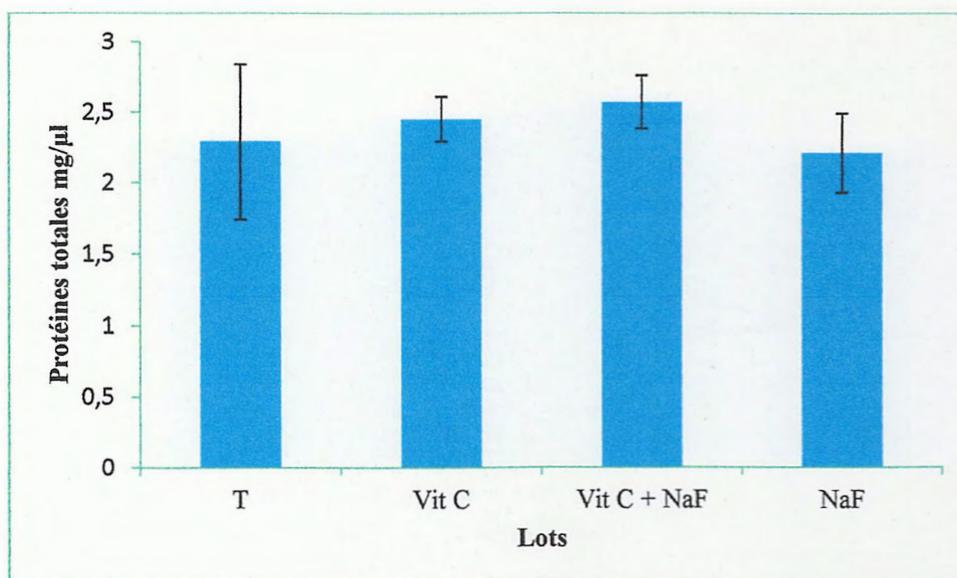


Figure 6 : Effet de la vitamine C sur le taux des protéines totales plasmatiques chez les rats traités au fluorure de sodium. Les données sont exprimées en valeurs moyenne \pm écart type. $P > 0.05$ versus témoin.

Dans le plasma, chez les rats traités au fluorure de sodium, le taux des protéines totales (2.21 ± 0.28 mg/μl) diminue de façon non significative comparé au groupe témoin (2.29 ± 0.55 mg/μl). Les rats traités à la vitamine C puis au fluorure de sodium ont montré une augmentation non significative du taux de protéines totales (2.57 ± 0.19 mg/μl) comparé au groupe témoin (2.29 ± 0.55 mg/μl). Le traitement à la vitamine C seule augmente le taux de protéines totales (2.45 ± 0.16 mg/μl) chez les rats de façon non significative en comparaison avec le groupe témoin (2.29 ± 0.55 mg/μl). La comparaison entre le taux de protéines totales du groupe traité au fluorure de sodium (2.21 ± 0.28 mg/μl) et le taux de protéines totales du groupe traité à la vitamine C puis au fluorure de sodium (2.57 ± 0.19 mg/μl) a montré que la vitamine C rehausse le taux des protéines totales plasmatiques de façon non significative.

1.2. Les enzymes de détoxification

1.2.1. L'activité enzymatique de la catalase

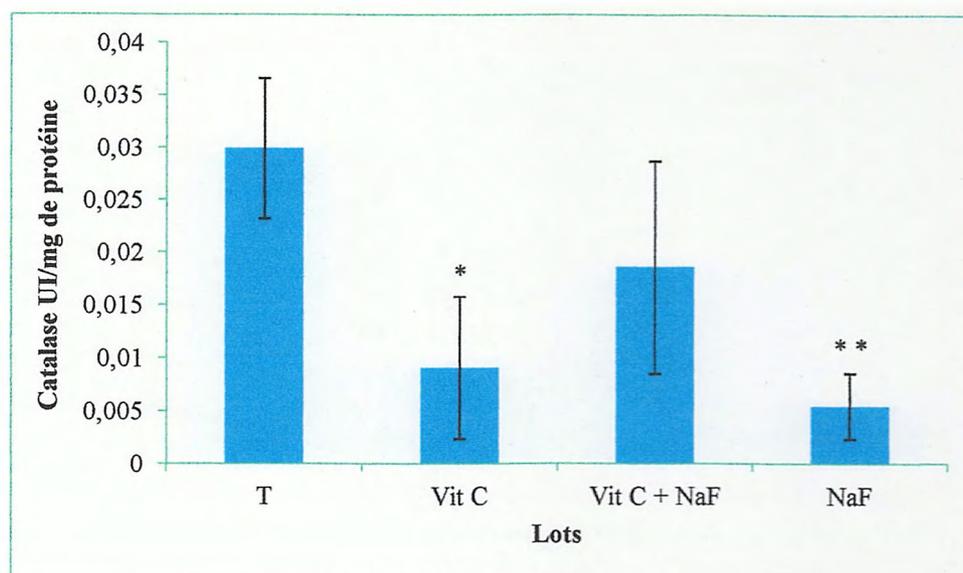


Figure 7 : Effet de la vitamine C sur l'activité enzymatique de la catalase chez les rats traités au fluorure de sodium. Les données sont exprimées en valeurs moyenne \pm écart type. ^{Vit C} $P < 0.05$ versus témoin. ^{NaF} $P < 0.01$ versus témoin.

Dans les érythrocytes, chez les rats traités au fluorure de sodium, l'activité enzymatique de la catalase (0.0055 ± 0.0031 UI/mg de protéine) était plus réduite que celle du groupe témoin (0.0299 ± 0.0067 UI/mg de protéine) de façon significative. Les rats traités à la vitamine C puis au fluorure de sodium ont montré une réduction non significative de l'activité enzymatique de la catalase (0.0186 ± 0.0101 UI/mg de protéine) comparé au groupe témoin (0.0299 ± 0.0067 UI/mg de protéine). Le traitement à la vitamine C seule réduit l'activité enzymatique de la catalase (0.0091 ± 0.0067 UI/mg de protéine) chez les rats de façon significative en comparaison avec le groupe témoin (0.0299 ± 0.0067 UI/mg de protéine). La comparaison entre l'activité enzymatique de la catalase du groupe traité au fluorure de sodium (0.0055 ± 0.0031 UI/mg de protéine) et l'activité enzymatique de la catalase du groupe traité à la vitamine C puis au fluorure de sodium (0.0186 ± 0.0101 UI/mg de protéine) a montré que la vitamine C hausse l'activité de l'enzyme de façon non significative.

1.2.2. L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase

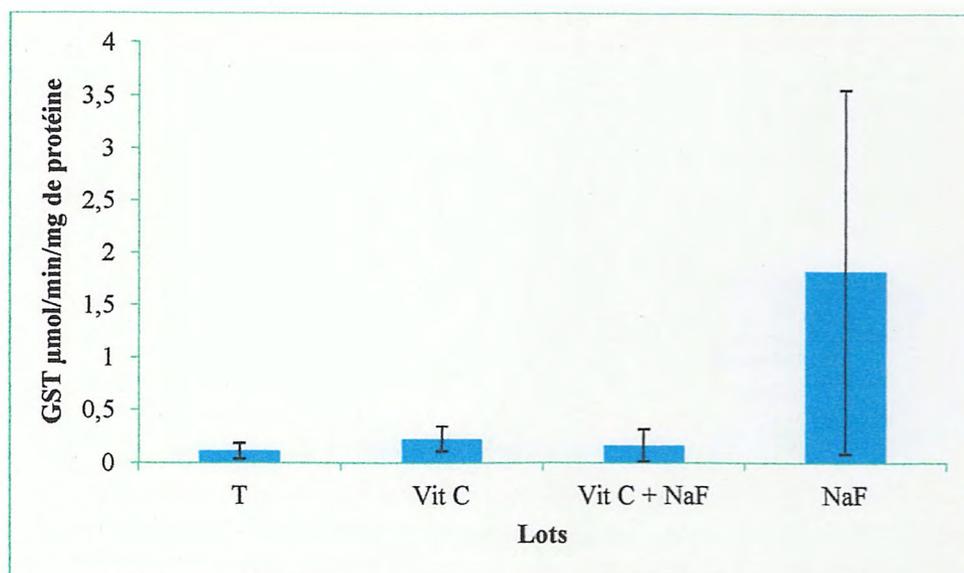


Figure 8 : Effet de la vitamine C sur l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase chez les rats traités au fluorure de sodium. Les données sont exprimées en valeurs moyenne \pm écart type. $P > 0.05$ versus témoin.

Dans les érythrocytes, chez les rats traités au fluorure de sodium, l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) ($1.822 \pm 1.735 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) était plus importante que celle du groupe témoin ($0.114 \pm 0.073 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) de façon non significative. Les rats traités à la vitamine C puis au fluorure de sodium ont montré une augmentation non significative de l'activité enzymatique de la GST ($0.166 \pm 0.15 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) comparé au groupe témoin ($0.114 \pm 0.073 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine). Le traitement à la vitamine C seule hausse l'activité enzymatique de la GST ($0.227 \pm 0.118 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les rats de façon non significative en comparaison avec le groupe témoin ($0.114 \pm 0.073 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine). La comparaison entre l'activité enzymatique de la GST du groupe traité au fluorure de sodium ($1.822 \pm 1.735 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) et l'activité enzymatique de la GST du groupe traité à la vitamine C puis au fluorure de sodium ($0.166 \pm 0.15 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) a montré que la vitamine C fait baisser l'activité de l'enzyme de façon non significative.

2. Discussion

Le but de cette étude est la mise en évidence de l'effet protecteur de la vitamine C contre la toxicité induite par le fluorure de sodium chez les rats. Nous avons choisi de vérifier le rôle protecteur de la vitamine C au niveau du plasma et des érythrocytes.

La présente étude montre que le métabolisme du glucose est fortement perturbé chez les animaux traités au NaF. Une diminution significative du taux plasmatique de glucose est remarquée uniquement chez le groupe traité au NaF, alors que le groupe qui a reçu de la vitamine C suivie d'un traitement au fluorure de sodium semble être protégé contre l'action délétère du NaF. La diminution du taux de glucose a été déterminée par Bouaziz et *al.*, 2006, dans le sérum de rats exposés au NaF. Cette diminution du glucose a été reliée à des dommages du foie et à la modification de la fonction hépatique (Eraslan et *al.*, 2007).

Une diminution très significative du taux de cholestérol dans le sang a été observée chez le lot traité au NaF par rapport au témoin. Ce résultat est concordant avec l'étude de Eraslan et *al.*, 2007, qui ont rapporté une diminution significative du taux de cholestérol sérique chez les rats exposés au fluorure de sodium. La différence entre le lot traité à la vitamine C puis au NaF et celui traité au NaF uniquement est non significative, néanmoins il y a un effet protecteur de la vitamine C contre la toxicité du NaF. L'absence de signification peut être due à la faible dose de NaF (100 ppm) et/ou à la courte période de traitement (4 jours).

Concernant le taux des triglycérides, une diminution non significative a été notée chez le lot traité à la vitamine C et le lot traité au NaF. Bouaziz et *al.*, 2006, ont rapporté une diminution du taux de cholestérol sérique et des triglycérides chez les rats exposés au fluorure de sodium. Les fluctuations des niveaux de cholestérol et de triglycérides sanguins sont indicatrices de désordres dans le métabolisme lipidique. La diminution du taux de cholestérol et des triglycérides peut être reliée à l'interaction directe des enzymes impliquées dans le métabolisme de ces composants avec le fluorure. En effet, le fluorure est signalé pour provoquer des changements dans l'activité des enzymes liées à ces deux paramètres, tels que la triglycéride lipase, estérase, et la pyrophosphatase (Czerny et *al.*, 2000).

Notre étude montre que le métabolisme protéique n'est pas affecté par le traitement au NaF. Ce résultat n'est pas concordant avec la littérature. Plusieurs auteurs ont montré que le fluorure diminue la synthèse protéique, ce qui provoque une diminution du taux des protéines tissulaires chez le rat et la souris (Bouaziz et *al.*, 2006 ; Chinoy et Memon, 2001). Ces études ont été réalisées sur des animaux en utilisant une dose plus forte (400 à 600 ppm) que la dose utilisée dans notre étude (100 ppm). En plus, la durée du traitement était plus longue allant jusqu'à

plusieurs semaines. Cela démontre que les effets du fluorure sont dépendants de la dose et/ou de la durée du traitement.

Nos résultats concernant l'activité enzymatique de la catalase au sein des érythrocytes ont démontré que l'activité enzymatique était réduite significativement chez le groupe traité à la vitamine C, et le groupe traité au NaF. Chez le groupe prétraité à la vitamine C l'activité de la catalase a été rehaussée de façon non significative, néanmoins cela démontre un effet protecteur exercé par cette vitamine contre la toxicité du NaF. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Nabavi et *al.*, 2011, à noter que pour leur travaux la dose de NaF administrée était plus élevée (600 ppm) et la durée du traitement plus longue (7 jours). Ces résultats indiquent que la vitamine C peut présenter un effet protecteur à court terme comme à plus long terme et avec des doses différentes de fluorure de sodium. Eraslan et *al.*, 2007, ont noté une augmentation de l'activité de la catalase au niveau des érythrocytes chez les rats traités au fluorure de sodium à la dose de 100 ppm pendant 7 jours. Vani et Reddy, 2000, ont rapporté une réduction de l'activité de la catalase dans le cerveau et le muscle gastrocnémien de souris.

L'activité de la glutathion-S-transférase a augmenté chez les lots traités respectivement à la vitamine C, à la vitamine C puis au NaF, et au NaF uniquement de façon non significative. Néanmoins, l'induction de la GST démontre que l'enzyme est active pour conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles. Ces résultats ne sont pas en accord avec la littérature. Une diminution de l'activité de la GST au niveau des reins chez les rats traités au fluorure de sodium à la dose de 10 mg/kg pendant 35 jours a été rapportée par Błaszczuk et *al.*, 2007. Ces chercheurs ont étudié en parallèle l'effet antioxydant de la vitamine E et de la méthionine et ont révélé l'aptitude de ces composés à augmenter l'activité de l'enzyme. Prasenjit et *al.*, 2006, ont mené des travaux sur les désordres hépatorénaux induits par le fluorure de sodium chez les souris et ils ont démontré que le fluorure de sodium administré à la dose de 600 ppm pendant 7 jours diminuait l'activité de l'enzyme au niveau du foie et des reins, alors que le prétraitement à la protéine A 43 kD isolée de l'herbe *Cajanus indicus L* rehaussait remarquablement l'activité de l'enzyme.

L'augmentation ou la diminution des activités des enzymes peuvent être expliquées soit par leur consommation et induction durant la conversion des radicaux libres en métabolites moins nocifs, soit secondairement par l'effet inhibiteur ou stimulateur direct du fluorure sur les activités des enzymes (Eraslan et *al.*, 2007).

D'après nos résultats et les données de la bibliographie nous pouvons conclure que l'effet protecteur de la vitamine C sur les substrats biologiques contre la toxicité du NaF est fortement dépendant de la dose du fluorure de sodium et de la durée du traitement.



Conclusion

Conclusion

Le fluorure de sodium est un agent générateur d'espèces réactives de l'oxygène, qui sont source de stress oxydant cellulaire. Ce stress induit des désordres biochimiques et des lésions tissulaires impliqués dans de nombreuses maladies.

Ce mémoire de master est essentiellement consacré à l'étude de l'effet antioxydant protecteur de la vitamine C contre le stress oxydant induit par le fluorure de sodium chez les rats. Cette étude a mis en évidence l'effet protecteur de la vitamine C sur les taux plasmatiques de glucose, de cholestérol, de triglycérides, et de protéines totales d'une part, et le statut antioxydant au sein des érythrocytes d'autre part, chez des rats intoxiqués au fluorure de sodium.

Les résultats montrent que la vitamine C rehausse le taux du glucose sanguin chez les rats intoxiqués par le fluorure indiquant ainsi une régulation du métabolisme perturbé du glucose et donc la réduction de la toxicité du fluorure. Les concentrations plasmatiques du cholestérol total et des triglycérides sont augmentées de façon non significative chez le groupe prétraité à la vitamine C comparé au groupe non prétraité. Concernant les protéines totales, le traitement à la vitamine C n'a pas eu d'effet contre le fluorure de sodium car ce dernier n'a pas eu d'effet sur le métabolisme protéique. Enfin, en ce qui concerne l'activité de certaines enzymes antioxydantes au sein des érythrocytes, il apparaît que la vitamine C rétablit l'activité de la catalase réduite par le fluorure de sodium et réduit l'activité de la glutathion-S-tranférase augmentée par le NaF.



Références bibliographiques

A

^(a)Akdogan, M., Bilgili, A., Karaoz, E., Gokcimen, A., Eraslan, G., Ustuner, E., (2002). *The structural and biochemical changes of kidney tissue on Xuorosis in rabbit. Turkish Journal of veterinary and animal sciences*, vol. 26, N°1, pp. 71-77.

^(b)Akdogan, M., Bilgili, A., Karaoz, E., Gokcimen, A., Eraslan, G., Yarsan, E., (2002). *The Structural and biochemical alternations in liver of rabbits received Xuor with water for particular dose and period. Firat University, Journal of Health Sciences*, vol. 16, N°1, pp. 41-46.

Amzal, H., (2010). Etude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier. Thèse de doctorat, univ. Mohammed V Agdal-Rabat, Royaume du Maroc, 112 p.

Arthur, J.R., (2000). *The glutathione peroxidases. Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, pp. 1825-1835. Cité dans la thèse de doctorat : Bacot, (2004), Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, France.

Auberval, N., (2010). Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat, univ. de Strasbourg, France, 257 p.

B

Bacot, S., (2004). Caractérisation d'un nouvel aldéhyde d'origine plaquettaire (4-hydroxydodecadienal) et formation d'adduits de Michael avec les phospholipides à éthanolamine. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, France, 187 p.

Badouard, D., (2006). Les lésions des acides nucléiques : Détection par CLHP-SMIS dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de doctorat, univ. de Joseph Fourier-Grenoble I, France, 228 p.

Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U., Weiler, E.W., (1993). *A glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity from Arabidopsis thaliana. European Journal of Biochemistry*, vol. 216, N°2 pp. 579-586. Cité dans le mémoire de magistère : Hamadi, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

- Belli, N., (2008). La contamination potentielle des eaux d'alimentation de la ville de Jijel par les métaux lourds serait-elle responsable de stress cellulaire. Mémoire de magistère, univ. de Jijel, Algérie, 174 p.
- Błaszczuk, I., Grucka-Mamczar, E., Kasperczyk, S., Birkner, E., (2008). *Influence of Fluoride on Rat Kidney Antioxidant System : effects of Methionine and Vitamin E. Biological Trace Element Research*, vol. 121, N°1, pp. 51-59.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Beaudeau, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J., (2001). *Aging and oxydative stress-Which potential makers?* Annales de Biologie Clinique, Paris, vol. 59, N°4, pp. 453-459. Cité dans la thèse de doctorat : Auberval, (2010), univ. de Strasbourg, France.
- Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., Delattre, J., (2003). Radicaux libres et antioxydants. *In : Biochimie pathologique-Aspects moléculaires et cellulaires*, Delattre, J., Durand, G., Jardillier, J.C., Flammarion, Paris, pp. 59-81. ISBN : 2-257-10946-5.
- Borel, J.P., Maquart, F.X., Gillery, P., (2006). Précis de biochimie et biologie moléculaire, de la biologie à la clinique, Frison-Roche, Paris, 255 p. ISBN : 2-87671-496-5.
- Bouaziz, H., Ketata, S., Jammoussi, K., Boudawara, T., Ayedi, F., Ellouze, F., Zeghal, N., (2006). *Effects of sodium fluoride on hepatic toxicity in adult mice and their suckling pups. Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 86, N°3, pp. 124-130.
- Bouldjadj, R., (2009). Etude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba* Asso chez des rats sains et des rats rendus diabétiques par streptozotocine. Thèse de doctorat, univ. Mentouri-Constantine, Algérie, 90 p.
- Bounekta, F., Harrag, H., Rezzagui, A., (2008). Etude expérimentale de l'effet des Flavonoïdes sur la modulation de l'activité des enzymes de détoxification au cours d'un traitement par un médicament anticancéreux. Diplôme d'études supérieures en biochimie, univ. de Jijel, Algérie, 42 p.
- Bourdon, E., (2000). Stress oxydant et glycation. Etude de l'albumine et des apolipoprotéines AL et B biosynthétisées par l'hépatocyte humaine en culture et importance chez le diabétique. Thèse de doctorat, univ. de Bourgogne, France, 222 p. Cité dans le mémoire de magistère : Belli, (2008), univ. de Jijel, Algérie.

Bourdon, E., (2004). Altérations oxydatives de protéines aux importantes propriétés physiologiques ; l'Albumine, la protéine de régulation du fer (IRP2), la superoxyde dismutase, le protéasome. Thèse de doctorat, univ. de la Réunion, France, 157 p. Cité dans le mémoire de magistère : Belli, (2008), univ. de Jijel, Algérie.

Boyd, S., Gary, K., Koepke, C., McAnalley, S., Ford, C., Horn, E., McAnalley, B., (2003). *An open-label pilot study of the antioxidant effect in healthy people of Ambrotose AOTM*. *GlycoScience & Nutrition*, vol. 4, N°6, pp. 1-6. Cité dans le mémoire de magistère : Mohammedi, (2006), univ. Abou Bakr Belkaïd-Telemcen, Algérie.

C

Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S., (2002). *Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases*. *Biological Chemistry*, vol. 383, N°6, pp. 933-943.

Cantin, A.M., et Paquette, B., (1999). *Oxidants and antioxidants in lung injury : Potential Links with LAM*. In : *LAM and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation*. Moss, J., / New York : Dekker, M., pp. 519-531. Cité dans le mémoire de magistère : Bouldjadj, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Chinoy, N.J., et Patel, D., (1998). *Influence of fluoride on biological free radicals in ovary of mice and its reversal*. *Environmental sciences*, vol. 6, N°3, pp. 171-184.

Chinoy, N.J., et Memon, M.R., (2001). *Beneficial effects of some vitamins and calcium on fluoride and aluminium toxicity on gastrocnemius muscle and liver of male mice*. *Fluoride*, vol. 34, N°1, pp. 21-33.

Chlubek, D., (2003). *Fluoride and oxidative stress*. *Fluoride*, vol. 36, N°4, pp. 217-228.

Corpet, D.E., (2008). Aliments fonctionnels réduisant le risque de cancer. In : *Aliments fonctionnels*, Roberfroid, M.B., Coxam, V., Delzenne, N., Lavoisier, Paris, pp. 907-959. ISBN : 978-2-7430-1026-3.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., (1997). Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In : *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects*

fondamentaux, Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., Masson, Paris, pp. 125-147. ISBN : 2-225-83053-3.

Coulon, L., (2005). Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans les phospholipides plaquettaires. Thèse de doctorat, univ. de Lyon, France, pp. 194. Cité dans le mémoire de magistère : Belli, (2008), univ. de Jijel, Algérie.

Czerny, B., Put, A., Mysliwiec, Z., Juzyszyn, Z., (2000). *The influence of quercetin on some parameters of lipid metabolism in rats chronically exposed to ammonium fluoride. Fluoride*, vol. 33, N°1, pp. 27-32.

D

Delattre, J., Beaudeau, J., L, Bonnefont-Rousselot, D., (2005). Radicaux libres et stress oxydant - Aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier, Paris, 405 p.

Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Favier, A., Cadet, J., (2004). *Predominance of the 1, N²-propano 2'-desoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. Free radical biology and medicine*, vol. 37, N°1, pp. 62-70.

Dulhunty, A., Gage, P., Curtis, S., Chelvanayagam, G., Board, P., (2001). *The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, N°5, pp. 3319-3323. Cité dans le mémoire de magistère : Hamadi, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

E

Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., (2007). *Evaluation of propolis effects on some biochemical parameters in rats treated with sodium fluoride. Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 88, N°3, pp. 273-283.

Eymard, S., (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du Chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de doctorat, univ. de Nantes, France, 143 p.

F

Favier, A., (2003). Stress oxydant - Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, N°269-270, pp. 108-115.

Frelon, S., (2001). Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN. Thèse de doctorat, univ. de Joseph Fourier-Grenoble I, France, 179 p.

G

Garait, B., (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de doctorat, univ. de Joseph Fourier-Grenoble I, France, 196 p.

Gattás, G.J.F., Kato, M., Soares-Vieira, J.A., Siraque, M.S., Kohler, P., Gomes, L., Rego, M.A.V., Bydlowski, S.P., (2004). *Ethnicity and glutathione-S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 37, N°4, pp. 451-458. Cité dans le mémoire de magistère : Hamadi, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Gérard-Monnier, D., et Chaudière, J., (1996). Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Pathologie et Biologie*, vol. 44, N°1, pp. 77-85. Cité dans le mémoire de magistère : Bouldjadj, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Goudable, J., et Favier, A., (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, vol. 11, N°2, pp. 115-120. Cité dans le mémoire de magistère : Bouldjadj, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Guan, Z.Z., Wang, Y.N., Xiao, K.Q., Dai, D.Y., Chen, Y.H., Liu, J.L., Sindelar, P., Dallner, G., (1998). *Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. Neurotoxicology and Teratology*, vol. 20, N°5, pp. 537-542.

H

Habdous, M., Siest, G., Herbeth, B., Vincent-Viry, M., Visvikis S., (2004). Polymorphismes des glutathion S-transférases et pathologies humaines : bilan des études épidémiologiques. *Annales de Biologie Clinique*, vol. 62, N°1, pp. 15-24.

Hale, A.L., (2003). *Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using AFLP and Microsatellite Marker Analysis*. Office of Graduate Studies of Texas A & M University, 245 p. Cité dans le mémoire de magistère : Mohammadi, (2005), univ. Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie.

Halliwell, B., (1989). *Free radicals, reactive oxygen species and human disease : a critical evaluation with special reference to atherosclerosis*. *The British Journal of Experimental Pathology*, vol. 70, pp. 737-757.

Hamadi, N., (2010). Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendu diabétiques par l'injection de la streptozotocine. Mémoire de magistère, univ. Mentouri-Constantine, Algérie, 98 p.

Haton, C., (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale. Thèse de doctorat, univ. de Pierre et Marie Curie, France, 168 p.

J

Jiang, Z., Arnér, E.S.J., Mu, Y., Johansson, L., Shi, J., Zhao, S., Liu, S., Wang, R., Zhang, T., Yan, G., Liu, J, Shen, J., Luo, G., (2004). *Expression of selenocysteine-containing glutathione-S-transferase in Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 321, N°1, pp. 94-101. Cité dans le mémoire de magistère : Hamadi, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, E.W., (1992). *Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity*. *Journal of Applied Physiology*, vol. 73, N°5, pp. 1854-1859. Cité dans la thèse de doctorat : Garait, (2006), univ. de Joseph Fourier-Grenoble I, France.

K

Keaney, J.F.Jr., Schwaery, G.T., Xu, A., Nicolosi, R.J., Loscalzo, J., Foxall, T.L., Vita, J.A., (1994). *17 beta-oestradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine*. *Circulation*, vol. 89, N°5, pp. 2251-2259. Cité dans le mémoire de magistère : Bouldjadj, (2008), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Krinsky, N.I., (1989). *Antioxidant functions of carotenoids. Free Radical Biology and Medicine*, vol. 7, N°6, pp. 617-635.

L

Lindau-Shepard, B.A., et Shaffer, J.B., (1993). *Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B₂ cells confers protection from oxidative damage. Radical Biology and Medicine*, vol. 15, N°6, pp. 581-588. Cité dans le mémoire de magistère : Bouldjadj, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Levine, R.L., (2002). *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radical Biology and Medicine*, vol. 32, N°9, pp. 790-796.

M

Massion, P., Preiser, J.C., Bailligand, J.L., (2002). *Reactive nitrogen species : deleterious or not? Nutrition Clinique et métabolisme*, vol. 16, N°4, pp. 248-252.

Marfak, A., (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat, univ. de Limoges, France, 220 p.

Marquet, P., et Lachâtre, G., (1998). Devenir des xénobiotiques dans l'organisme. *In : Toxicologie et pharmacologie médico-légales*, Kintz, P., Elsevier, Nancy, pp. 27-66. ISBN : 2-84299-037-4.

Martin, F., (2003). Vann 1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de doctorat, univ. de la Méditerranée, France, 228 p. Cité dans le mémoire de magistère : Belli, (2008), univ. de Jijel, Algérie.

Morel, Y., et Barouki, R., (1999). *Repression of gene expression by oxidative stress. Biochemical Journal*, vol. 342, pp. 481-496.

N

Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Abolhasani, F., Moghaddam, A.H., Eslami, S., (2011). *Cytoprotective Effects of Curcumine on Sodium Fluoride-Induced Intoxication in Rats Erythrocytes. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 88, N°3, pp. 486-490.

Neužil, J., et Stocker, R., (1993). *Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin*. *FEBS Letters*, vol. 331, N°3, pp. 281-284. Cité dans le mémoire de magistère : Bouldjadj, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

Neve, J., et Pincemail, J., (2008). Antioxydants alimentaires : vitamines, oligoéléments et non-nutriments. *In* : *Aliments fonctionnels*, Roberfroid, M.B., Coxam, V., Delzenne, N., Lavoisier, Paris, pp. 203-235. ISBN : 978-2-7430-1026-3.

P

Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H. J., (1995). *Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant*. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 19, N°2, pp. 227-250. Cité dans le mémoire de magistère : Mohammadi, (2005), univ. Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie.

Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K., (1997). *Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid*. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 22, N°1-2, pp. 359-378. Cité dans la thèse de doctorat : Garait, 2006, univ. de Joseph Fourier-Grenoble I, France.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.O., (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, vol. 4, N°5, pp. 148-154.

Powers, S.K., et Lennon, S.L., (1999). *Analysis of cellular responses to free radicals : focus on exercise and skeletal muscle*. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 58, N°4, pp. 1025-1033. Cité dans la thèse de doctorat : Garait, (2006), univ. de Joseph Fourier-Grenoble I, France.

R

Rajurkar, R.B., Khan, Z.H., Gujar, T.G., (2003). *Studies on levels of glutathione S-transferase, its isolation and purification from Helicoverpa armigera*. *Current Science*, vol. 85, N°9, pp. 1355-1360. Cité dans le mémoire de magistère : Hamadi, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.

S

Sarr, M., (2004). Modulation de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) en physiologie vasculaire : intérêt des stocks mobilisables de NO et des antioxydants naturels. Thèse de doctorat, univ. Louis Pasteur, France, 188 p.

Silvestre, F., (2005). Réponse à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin : *erichia sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse de protéine. Thèse de doctorat, univ. de Notre-Dame de la paix, France, 72 p. Cité dans le mémoire de magister : Belli, (2008), univ. de Jijel, Algérie.

Skulachev, V.P., (1998). *Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades*. *FEBS Letters*, vol. 423, N°3, pp. 275-280. Cité dans la thèse de doctorat : Garait, (2006), univ. de Joseph Fourier-Grenoble I, France, 196 p.

Soares, A.F., (2005). Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat, univ. de Lyon, France, 133 p.

Stadtman, E.R., (1990). *Metal ion-catalyzed oxidation of proteins : biochemical mechanism and biological consequences*. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 9, N°4, pp. 315-325. Cité dans la thèse de doctorat : Auberval, (2010), univ. de Strasbourg, France.

Stadtman, E.R., (1993). *Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions*. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 62, pp. 797-821. Cité dans la thèse de doctorat : Auberval, (2010), univ. de Strasbourg, France.

Stevnsner, T., Thorslund, T., De Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., (2002). *Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging*. *Experimental Gerontology*, vol. 37, N°10-11, pp. 1189-1196.

Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill, R., Gulotta, V.C., (2001). *A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage*. *The Journal of Biological chemistry*, vol. 276, N°41, pp. 38084-38089.

V

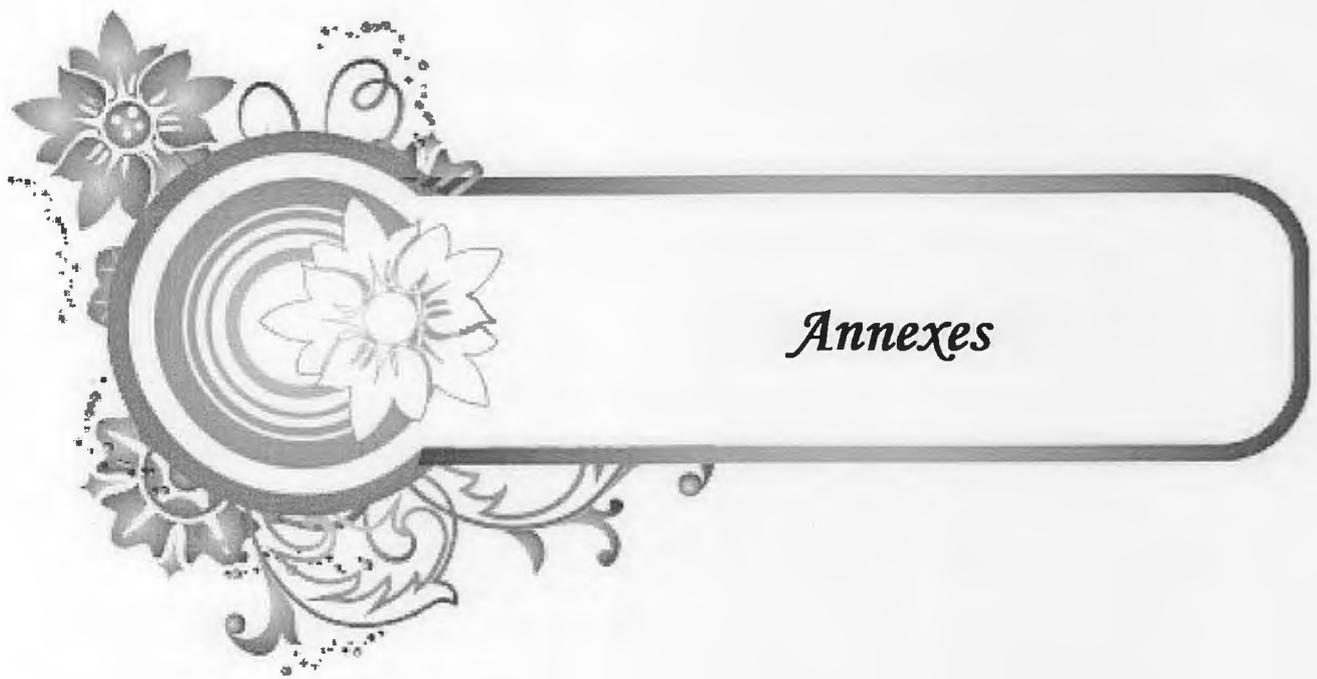
Vansant, G., (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone. Cité dans le mémoire de magistère : Mohammadi, univ. Abou Bakr Belkaïd-Telemcen, Algérie.

Vani, M.L., et Reddy, K.P., (2000). *Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice*. *Fluoride*, vol. 33, N°1, pp. 17-26.

W

Wink, D.A., Cook, J.A., Kim, S.Y., Vodotz, Y., Pacelli, R., Krishna, M.C., (1997). *Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, N°17, pp. 11147-11151.

Wolin, M.S., (1996). *Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. Microcirculation*, vol. 3, N°1, pp. 1-17. Cité dans le mémoire de magistère : Bouldjadj, (2009), univ. Mentouri-Constantine, Algérie.



Annexes

Annexe 1 : tampons et solutions

1. PBS : 1x pour 250 ml

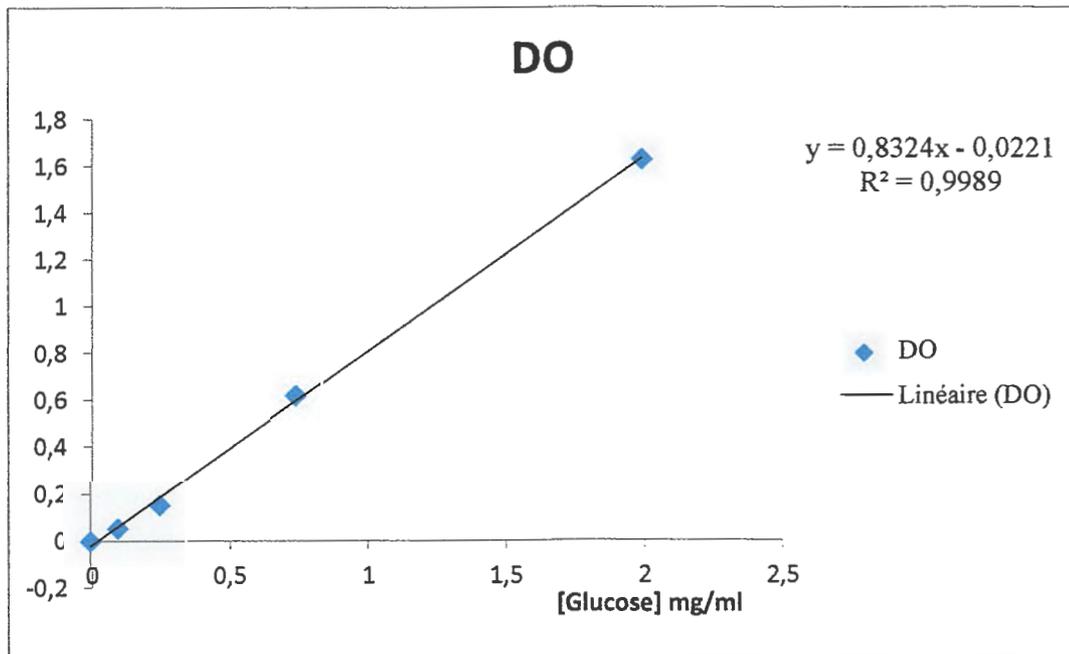
- 200 ml eau distillée
- Na_2HPO_4 0.9 g
- KH_2PO_4 0.06 g
- KCl 0.05 g
- NaCl 2 g
- Ajuster le PH à 7.4 avec HCl
- Compléter avec de l'eau distillée à 250 ml

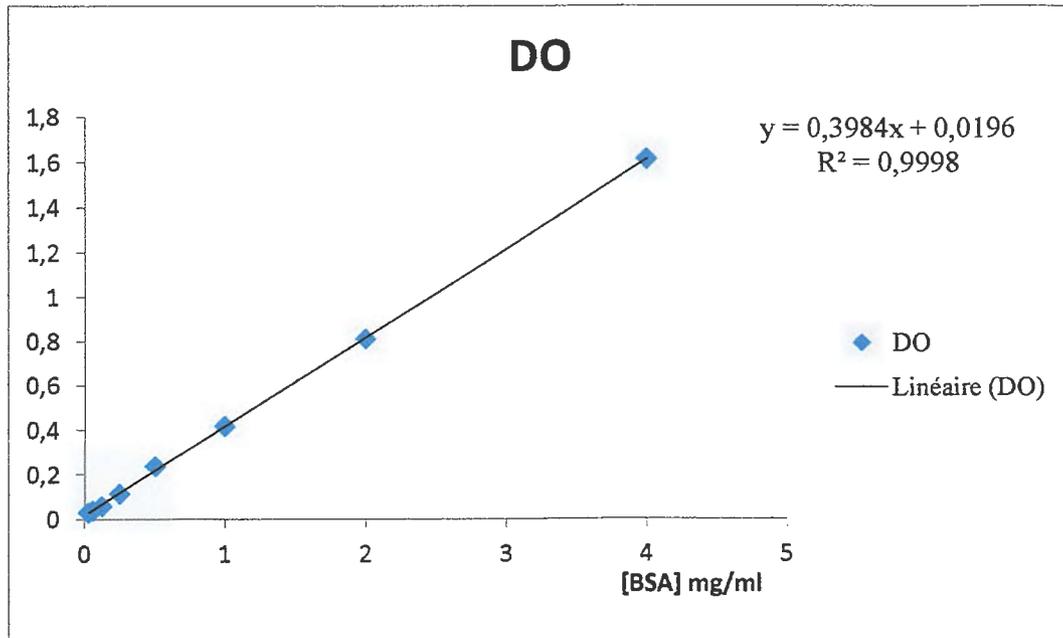
2. Préparation du tampon phosphate hypotonique

- 5 vol solution A (0.33 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /liter)
- 1 vol solution B (0.14 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /liter)
- Ajuster le PH à 7.4 avec du HCl (1.0 N)

3. Réactif de Bradford

- Bleu brillant de coomassie G-250
- 12.5 ml éthanol (95%)
- 25 ml acide phosphorique (85%)
- Compléter avec de l'eau distillée à 250 ml

Annexe 2 : courbe d'étalonnage du glucose

Annexe 3 : courbe d'étalonnage des protéines totales

Aberkane Sabah Bouzamouche Imane	Contribution à l'étude de l'effet protecteur de la vitamine C contre la toxicité induite par le fluorure de sodium chez les rats	Date de soutenance : Le 03/07/2012
-------------------------------------	--	---------------------------------------

Résumé

La présente étude a pour objectif la contribution à la mise en évidence de l'effet protecteur de la vitamine C contre le stress oxydant induit par le fluorure de sodium au niveau du plasma et des érythrocytes chez les rats. Le travail a été effectué sur quatre lots de rats Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) : lot témoin, lot traité à la vitamine C, lot traité à la vitamine C et au fluorure de sodium, lot traité au fluorure de sodium. Les taux de glucose, de cholestérol, de triglycérides, et des protéines totales ont été mesurés au niveau du plasma et les résultats ont montré que le NaF exerce un effet néfaste sur l'organisme en réduisant les taux des métabolites en question. L'activité des enzymes antioxydantes (CAT et GST) a été modifiée par rapport au témoin. La vitamine C joue un rôle protecteur en réduisant l'effet nocif du fluorure de sodium.

Mots clés : stress oxydatif, vitamine C, fluorure de sodium, catalase, glutathion-s-transférase.

Abstract

The aim of this study is the contribution in the put in evidence the protective effect of vitamin C against oxidative stress induced by sodium fluoride in plasma and erythrocytes in rats. The work was performed on four groups of Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) : normal group, group treated with vitamin C, group treated with vitamin C and sodium fluoride, group treated with sodium fluoride. Glucose, cholesterol, triglycerides, and total protein levels were measured in plasma and the results showed that NaF exerts a negative effect on the body by reducing the levels of some metabolites. The rate of antioxidant enzymes (CAT and GST) were modified compared to normal group. Vitamin C plays a protective role in reducing the harmful effect of sodium fluoride.

Key words : oxidative stress, vitamin C, sodium fluoride, catalase, glutathione-S-transferase.

ملخص

هذه الدراسة تهدف إلى المساهمة في تبيان التأثير الوقائي للفيتامين (ج) ضد الاضطراب التأكسدي الذي يسببه فلوريد الصوديوم في البلازما وكريات الدم الحمراء عند الجرذان. تم إجراء العمل على أربع مجموعات من جرذان ويستار (الجرذ النرويجي ألبينوس) : مجموعة شاهدة ، مجموعة معالجة بالفيتامين (ج) ، مجموعة معالجة بالفيتامين (ج) وفلوريد الصوديوم ، و مجموعة معالجة بفلوريد الصوديوم. تم قياس مستويات السكر والكوليسترول والشحوم الثلاثية ، والبروتينات الكلية في البلازما وأظهرت النتائج أن فلوريد الصوديوم له تأثير سلبي على الجسم عن طريق الحد من معدل العناصر الأيضية . تم تعديل معدل الأنزيمات المضادة للأكسدة (كاتالاز ، جلوتاثيون س ترانسفيراز) مقارنة بالمجموعة الشاهدة. الفيتامين (ج) يلعب دورا وقائيا في الحد من التأثير الضار لفلوريد الصوديوم.

الكلمات المفتاحية : الاضطراب التأكسدي، الفيتامين (ج)، فلوريد الصوديوم، الكاتالاز، الجلوتاثيون س ترانسفيراز.

Encadré par Mr. Oumeddour