



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Appliquée

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Effet des taux élevés de nitrite sur le cerveau du lapin

Présenté par :

Mlle : Chaima Ghalloussi Mlle : Nour el Houda Bouallag Mlle : Chaima Nahouche

Devant le jury:

Mr. GOUDJIL T	M.C.B	Université De Tébessa	Président
Mme. LAHMER.BELGUENDOZ.K	M.A.A	Université De Tébessa	Promotrice
Mr. LAHMER E	M.A.A	Université De Tébessa	Examineur

Date de soutenance : Le 07/06/2022 Note :/20



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Appliquée

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Effet des taux élevés de nitrite sur le cerveau du lapin

Présenté par :

Mlle : Chaima Ghalloussi Mlle : Nour el Houda Bouallag Mlle : Chaima Nahouche

Devant le jury:

Mr. GOUJIL T	M.C.B	Université De Tébessa	Président
Mme. LAHMER.BELGUENDOZ.K	M.A.A	Université De Tébessa	Promotrice
Mr. LAHMER E	M.A.A	Université De Tébessa	Examineur

Date de soutenance : Le 07/06/2022 Note :/20

Remerciement

Volonté à Dieu le Seigneur des deux mondes qui a accepté et nous a aidés dans ce cours d'étude à compléter ce mémoire avec détermination et volonté et à réaliser les moyens de réussir

*Nous exprimons nos sincères remerciements et notre appréciation à notre chère promotrice, **LAHMER BELGUNDOUZ KARIMA**, pour ses efforts avec nous et pour son attention dans les moindres détails dans cette étude et pour son bon traitement et la manière dont elle a été hautement supervisée.*

*Ensuite, nous remercions les membres du jury : **M. GOUJIL T** et **M. LAHMER.E** d'avoir consacré du temps et des efforts à discuter de cette mémoire avec des remerciements particuliers à notre professeur.*

*Nous remercions également **M. Haouam Abd el Rahim** pour son aide et pour nous avoir donné de son temps.*

Nous remercions tous ceux qui nous ont aidés et qui nous ont remontés le moral pour accomplir ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à ma précieuse famille :

A mon cher père, qui me fait oublier ma fatigue et partage ma joie et remplit mes journées de bonheur et heureux , tout respect et merci pour son soutien et t leurs complicités , que Dieu le préserve et le perpétue

A ma mère, mon joyau rare, sans qui je n'aurais pas atteint ce que je suis aujourd'hui. Merci pour ton amour, ton soutien et ton combat continu. Merci pour tout ce que tu as donné pour une journée comme celle-ci.

*A mes deux frères, **Riad el Azher** et **Mohammed Abd Eldjali l**, merci pour votre soutien continu à chaque fois*

*Je le dédie également à tous mes compagnons dans ce travail : **Chaima Ghalloussi**, merci pour cette précieuse amitié qui est la nôtre et à **Chaima Nahouche**, portez-vous bien et en bonne santé*

*Aux amis universitaires : **Amani, May, Chaima Amrane , Nacib , Iskander , Abd El Rahim***

À tous mes chers professeurs et étudiants du Département de biochimie appliquée (2021/2022)

Nour el Houda Bouallag

Dédicace

*A l'homme de ma vie , mon exemple éternel ,mon soutien moral, ma source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père **Ali***

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, mama **Fatema***

*A mes frères **Achraf** et **Monsef** qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études*

*Amon marie et à mon ame **Taki Eddine** merci pour votre soutien morale*

A toute ma famille

*A mes binomes **Chaima** et **Nour***

A Tous mes amis de la promo << Biochimie Appliquée 2022>>

Chaima Nahouche

Dédicace

*Je présente cette œuvre à ma chère mère pour son soutien et sa prière, et à mon père affectueux pour son amour et son accompagnement dans ma scolarité. Je leur souhaite une santé et un bien-être constants et à mes sœurs. **Rihab Rania Lina Amel Et Roukaya** bien-aimées ,et un spécial dédicace*

*à **Salah Eddine Hezili***

*Sans oublier mon ami **D Jabali Ahlem** et **Chaouchi Rawnek** , les deux camarades d'université. Ce travail est également effectué avec l'aide de ma compagne **Nour el-Houda Bouallag** et de la relation stimulée par Dieu, **Nahouche chaima**, et de tous mes éminents enseignants tout au long du parcours scolaire, et de tous les étudiants en biologie, en particulier la **Direction de la biochimie appliquée 2021-2022.***

Chaima Ghalloussi

. الملخص :

النتريت هو المنتج الوسيط للعديد من تفاعلات الأوكسدة والارجاع ، التي تشارك في عمليات تحويل النيتروجين المختلفة. مصادر هذا المنتج في الجسم هي مسار L-arginine-NOS ونظامنا الغذائي اليومي (البقوليات واللحوم) ، حيث يتم استخدام النتريت كمضافات حافظة لهذه الأطعمة ومصدر للون. استهلاك جرعة كبيرة يسبب آثارا سامة تعكس تأثيرها الإيجابي. تهدف دراستنا الحالية إلى الكشف عن تأثير المستويات العالية من النتريت على المخ.

تم قياس مجموعة من التحليلات الكيميائية الحيوية في كل من الأرانب الثلاثة التي عولجت عن طريق الفم بـ 100 ملغم/كغ من وزن الجسم من نتريت الصوديوم لمدة ستة أسابيع عن طريق الفم ، و اثنين من الأرانب الشاهدة التي لم تتلقى أي شيء. أظهرت الأرانب المعالجة بنتريت الصوديوم مستويات مرتفعة من MDA و Protéines carbonylées في الدم وأنسجة المخ، بالإضافة إلى زيادة albumine oxydée في الدم. لم تظهر النتائج أي تغييرات كبيرة في Protéines totales، وأظهرت الدراسة النسيجية وجود تنكس عصبي والتهاب الأوعية الدموية في القشرة الدماغية والحصين.

وبالتالي، تشير نتائجنا إلى أن نتريت الصوديوم سيكون له تأثير سام على الدماغ من خلال تحفيز الإجهاد التأكسدي مما يؤدي إلى تفوق أكسدة الدهون وأكسدة البروتين الذي يؤدي إلى موت الخلايا

الكلمات المفتاحية : نتريت الصوديوم, الدماغ , الإجهاد التأكسدي , دراسة نسيجية

Abstract:

Nitrite is the intermediate product of several oxidation and reduction reactions, involved in the different nitrogen transformation processes. The sources of this product in the body is the L-arginine-NOS pathway and our daily diet (legumes and meat), where they are used as preservative additives of these foods and as a source of color. The consumption of a high dose causes toxic effects. Our current study aims to reveal the effect of elevated nitrite levels on the brain.

A set of biochemical analyses was measured in both three rabbits treated orally (NaNO₂ 100 mg/kg) for six weeks and two control rabbits that did not. Rabbits treated with sodium nitrite showed elevated levels of MDA and carbonylated protein in blood and brain tissue, as well as increased oxidized albumin in the blood. The results show no significant changes in total proteins, and the histological study showed the presence of neuronal degeneration and vascular inflammation in the cerebral cortex and hippocampus.

Thus, our results suggest that NaNO₂ would have a toxic effect on the brain through the induction of oxidative stress resulting in lipid peroxidation and protein oxidation leading to cell death.

Keywords: sodium nitrite, brain, oxidative stress, histological study

Résumée :

Le nitrite est le produit intermédiaire de plusieurs réactions d'oxydation et de réduction, impliquées dans les différents processus de transformation de l'azote. Les sources de ce produit dans le corps c'est la voie L-arginine-NOS et notre alimentation quotidienne (légumes secs et viande), où ils sont utilisés comme additifs conservateurs de ces aliments et comme source de couleur. La consommation d'une forte dose provoque des effets toxiques. Notre étude actuelle vise à révéler l'effet des taux élevés des nitrites sur le cerveau.

Un ensemble d'analyses biochimiques a été mesuré à la fois chez trois lapins traités par (NaNO_2 100 mg/kg) par voie orale pendant six semaines et deux lapins témoins qui n'en ont pas reçu. Les lapins traités avec nitrite de sodium ont montré un taux élevé du MDA et de la protéine carbonylés dans le sang et dans le tissu cérébral, ainsi qu'une augmentation d'albumine oxydée dans le sang. Les résultats ne montrent aucun changement significatif dans les protéines totales, et l'étude histologique a montré une présence d'une dégénérescence neuronale et d'une inflammation vasculaire dans le cortex cérébral et l'hippocampe.

Ainsi, nos résultats suggèrent que le NaNO_2 aurait un effet toxique sur le cerveau à travers l'induction d'un stress oxydatif ayant pour conséquences la peroxydation lipidique et l'oxydation protéiques aboutissant à la mort cellulaire.

Mots clés : nitrite de sodium, cerveau, stress oxydatif, étude histologique

Table des matières

Sommaire :

Remerciement

Dédicaces

المخلص

Abstract

Résumé

Sommaire

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Chapitre 01 : Nitrite

1. Nitrite :	
1.1 Propriétés physiques du nitrite de sodium	3
1.2 Propriétés chimique du nitrite de sodium	3
2. Utilisation du nitrite	4
3. Toxicité de nitrite	4
4. Les effets de nitrite	5
4.1 Effets physiologie	5
4.2 Effets biologiques	5
4.3 Effets cancérogènes	8
5. Biotransformation du nitrite :	9
5.1 La transformation de l'azote	9
5.2 Formation du monoxyde d'azote par la NO synthase	10
5.3 Réaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde : formation de peroxynitrite	11
5.4 Le devenir des nitrates et de nitrites dans l'organisme	12
5.5 La réaction du nitrite avec la désoxyhémoglobine pour former du NO	13

et de l'hémoglobine fer-nitrosylée

5.6 Réduction de nitrite à l'oxyde nitrique dans la mitochondrie	14
--	----

Chapitre II : Cerveau

I. Le système nerveux	16
II. Organisation et fonction cérébrales :	16
1) Le télencéphale ou néocortex	16
2) Le diencephale	19
3) Le cervelet	19
4) Le tronc cérébral	19
III. Différents types de cellules nerveuses :	20
1) Les neurones	20
2) Les cellules gliales	22

Matériel et Méthodes :

I. Matériel :	
1. Matériel biologique : Lapin	24
2. Matériel de laboratoire	24
3. Produits d'administrés	24
II. Méthode d'élevage	25
1. Description d'élevage	25
2. Mode de traitement	25
III. Dissection	26
1) Préparation des échantillons	26
2) Broyages des tissus	27
IV. Analyses biochimique	27
1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	27
2. Albumine oxydée	28
3. Dosage MDA	28
4. Dosage de protéine carbonylé	29

V. Technique histologie :	30
1) Fixation	30
2) Déshydratation	31
3) Eclaircissement	31
4) Inclusion à la paraffine	32
5) Les coupes	32
6) Collage et montage	33
7) Déparaffinage et Réhydratation	33
8) Coloration	33
VI. Analyse statistique :	33
1 Résultats de la mesure du poids:	35
1.1 Poids corporel	35
1.2 Poids des cerveaux	35
2 Résultats des analyses biochimie	36
2.1 Résultats des analyses biochimie dans le sang :	36
2.1.1. Albumine oxydée	36
2.1.2 MDA libre	37
2.1.3 MDA liée à la protéine	38
2.1.4 Protéines carbonylées	38
2.2 Résultats des analyses biochimie dans le tissu cérébral:	39
2.2.1 Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford	39
2.2.2 MDA libre	40
2.2.3 Protéines carbonylées	41
3 Résultats d'étude histologique :	42
3.1.1 Cortex cérébral chez témoins	42
3.1.2 Cortex cérébral chez traité	42

3.2.1	Hippocampe chez les lapins témoins	44
3.2.2	Hippocampe chez les lapins traité	45

Discussion

Conclusion

Bibliographie

Annexes

Liste des Figures

Figure	Titre	page
01	Formation et recyclage des nitrates (NO₃⁻), nitrites (NO₂⁻) et de l'oxyde nitrique (NO).	09
02	Schéma simplifié du cycle d'azote dans l'environnement	10
03	Les cerveaux de différentes espèces de mammifères	17
04	La face inférieure du cerveau du lapin	18
05	Structure du neurone	21
06	Nitrite de sodium	24
07	Lapin de race néo-zélandais	25
08	Cerveau du lapin pendant du sacrifice	26
09	Sonificateur	27
10	Formation du complexe colorée Malondialdéhyde/thiobarbiturique	28
11	Réaction mise en jeu pour le dosage des carbonyles totaux	30
12	Cerveau dans le Formol	31
13	Ensembles des fragments du cerveau	31
14	Les bains des paraffines	32
15	Microtome	32
16	Les étapes de coloration	33
17	Les variations des poids corporel des lapins pendant la période du traitement	35
18	Résultats des mesures du poids du cerveau chez le lapin	35
19	Variations des poids des cerveaux des lapins traité par rapport des lapins témoins	36
20	Comparaison la variation Albumine oxydée dans le sang entre les lapins témoins et traités.	37
21	Comparaison la variation du MDA libre dans le sang entre les lapins témoins et traités	37
22	Comparaison la variation du MDA liée à la protéine dans le sang entre les lapins témoins et traités.	38

23	Comparaison la variation protéines carbonylées dans le sang entre les lapins témoins et traités	39
24	Comparaison la variation des protéines totales dans les tissus cérébrale entre les lapins témoins et traités	40
25	Comparaison la variation du MDA libre dans les tissu cérébrale entre les lapins témoins et traités.	40
26	Comparaison la variation protéines carbonylées dans le tissu cérébral entre les lapins témoins et traités	41
27	Structure histologique du cortex cérébral chez lapin témoins	42
28	Structure histologique du cortex cérébral chez lapin traité	43
29	Structure histologique de l'hippocampe chez lapin témoins	44
30	Structure histologique de l'hippocampe chez lapin traité	46

Liste des abréviations :

AGPI :	Acides Gras Poly-Insaturés
AOS :	Activated Oxygen Species
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
BSA :	L'Albumine de Sérum Bovin
CoCl₂:	Clorure de Cobalt
COX :	Cytochrome Coxyfase
DNRA:	Réduction Dissimilatrice Du Nitrate En Ammonium
DTT:	Direct Transfer Trip
DNPH :	Dinitro Phénylhydrozine
DNP :	Dinitrophényle
DO :	Densité Optique
EDL:	Extensor D'exercice Longus
EOA:	Emergency Oxygen Administration
HNO:	Endogenose Synthesis by NOS
H₂O₂:	Peroxyde d'hydrogène
HCL:	Hydrochloric acide
HE:	Hemateine éosine
Hbfe₂⁺ :	Deoxyhemoglobin
Hbfe₃⁺ :	Methemoglobin
Hbfe₂⁺no:	Iron-Nitrosylated Hemoglobin
IMA:	Ischémie Modified Albumine
IM:	Infarctus du myocarde
LDL:	Low Density lipoprotein
Methb:	Méthomoglobine
MDA :	Malondialdéhyde
NO₂ :	Nitrite
NaNO₂:	Nitrite de sodium
NOC:	Composés N - nitrose
NO₃⁻ :	Nitrate

NO :	Nitric Oxide
NH₄:	Amonyum
NH₃ :	L'anion peroxydinitrite
N₂:	Diazote
N₂O:	Protoxyde d'azote
N:	Azote
NOS:	Synthase d'oxyde nitrique
NaOH:	Hydroxyde de sodium
NO:	Oxyde d'azote
NADH :	Nicotinamide adenine dinucleotide +hydrogen
OD:	Oxygène dissous
SCD :	Sickle cell disease
SN :	Système Nerveux
SNC :	Système Nerveux Central
SNP:	Système Nerveux Périphérique
SNV :	Système Nerveux Végétatif
SCA:	Syndrome Coronaire Aigu
TBA:	Acide Thiobarbiturique
TCA :	Trichloroacetic Acid
TBARS:	Thiobarbituric Acide Reactive Substances



Introduction

Introduction

Les composés azotés sont présents dans l'environnement sous différentes formes, notamment les nitrates (NO_3^-) et les nitrites (NO_2^-), qui peuvent à leur tour oxyder la fraction d'hémoglobine et réduire la capacité de la molécule à transporter l'oxygène lorsqu'elle pénètre dans la matière organique, Ce qui entraîne une toxicité. Le nitrite est le plus toxique des anioniques. (*Eytcheson et al., 2018*).

Ils sont également utilisés comme additifs alimentaires dans les charcuteries pour augmenter la durée de conservation et éviter la croissance bactérienne. Ces composés pourraient jouer un rôle dans la cancérogénicité de la charcuterie. (*Chazelas et al., 2022*).

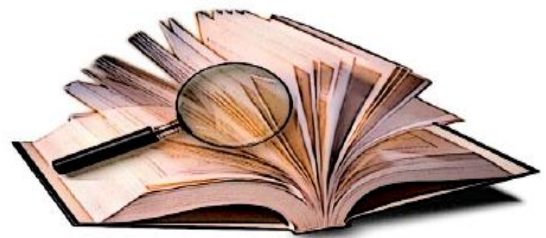
Le nitrite de sodium est un puissant agent oxydant qui provoque une hypotension et limite le transport et l'apport d'oxygène dans l'organisme par la formation de méthémoglobine. Les manifestations cliniques peuvent inclure une cyanose, une hypoxie, une altération de la conscience, des troubles du rythme cardiaque et la mort. La majorité des rapports sur les empoisonnements au nitrite de sodium ont été le résultat d'expositions non intentionnelles. (*Neth et al., 2020*).

Le système nerveux central est constitué par l'encéphale (cerveau, tronc cérébral – pédoncules cérébraux, protubérance annulaire et bulbe – et cervelet) et la moelle épinière. Il est composé de neurones, de cellules gliales, de capillaires sanguins et d'une matrice extracellulaire. Les neurones sont les unités fonctionnelles du système nerveux. En dehors de leur phase de développement, les neurones sont incapables de se multiplier. Les cellules spécialisées de soutien (cellules gliales) sont de quatre types : astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales et cellules épendymaires. Ils forment un réseau de soutien pour les neurones et autres cellules du système nerveux central. (*Haberer et al., 2010*).

A travers notre étude, nous avons cherché à connaître l'action des nitrites ingérés par voie orale et les modifications pouvant survenir dans le tissu cérébral des lapins traités.

En ce qui concerne le travail que nous avons mené, nous avons essayé de donner des hypothèses et des observations que nous attendons de se produire :

- ❖ Effet du nitrite sur le tissu cérébral
- ❖ Effet du nitrite sur les paramètres biochimiques.



Chapitre 01 :
Nitrite

1. Nitrite :

Le nitrite (NO_2^-) est un ingrédient essentiel contenu dans les produits de salaison. Ils sont des ions présents de façon naturelle dans l'environnement. (INSPQ Centre d'expertise et de référence en santé publique).

Est un sous-produit du cycle de l'azote. L'excès de nitrite limite non seulement la croissance et le métabolisme des bactéries, mais nuit également à la santé des humains et des organismes aquatiques. (Nie *et al.*.,2020).

1.1 Propriétés physiques du nitrite de sodium :

Le nitrite de sodium se présente sous la forme d'une poudre, de granulés ou de bâtonnets blancs ou légèrement jaunâtres, hygroscopiques, inodores, à saveur salée. Il se dissout facilement dans l'eau (85 g / 100 g d'eau). Les solutions obtenues sont légèrement alcalines (pH = 9). Le nitrite de sodium est faiblement soluble dans le méthanol (4,43 g de nitrite de sodium / 100 g de méthanol), quasi insoluble dans l'éthanol (0,31 g de nitrite de sodium / 100 g d'éthanol). (Bonnard. N *et al.*, 2021)

Nom Substance	Détails	
Nitrite de sodium	Formule	NaNO_2
	N° CAS	7632-00-0
	Etat Physique	Solide
	Solubilité	85 g/100 mL
	Masse molaire	69
	Point de fusion	271 à 282 °C
	Densité	2,17
	Pression de vapeur	Négligeable

1.2 Propriétés chimique du nitrite de sodium :

Exposé à l'air, le nitrite de sodium s'oxyde lentement en nitrate. Il se décompose sous l'action de la chaleur (à partir de 320 °C) avec formation d'azote, d'oxygène et d'oxyde d'azote. Il explose aux environs de 540 °C.

Le nitrite de sodium est un agent oxydant fort qui peut réagir de façon explosive avec les acides, les cyanures, les sels d'ammonium, les thiocyanates et les thiosulfates.

Il peut également, en mélange avec les matières organiques (bois, textile...) s'enflammer spontanément par frottement.

En présence d'amines secondaires ou tertiaires, le nitrite de sodium donne naissance à des nitrosamines, dont certaines sont suspectées d'être cancérigènes. Certains facteurs (pH, température, concentration...) peuvent augmenter le rendement de la réaction. (**Bonnard. N et al., 2021**)

2. Utilisation du nitrite :

Le nitrite de sodium (NaNO_2) est utilisé comme colorant, conservateur alimentaire et agent antimicrobien. Ses propriétés anti-corrosives ont également conduit à son utilisation dans les industries dentaires et de la construction. (**Matthew. R et al., 2020**)

Le nitrite attribue également la couleur et la saveur caractéristiques à la viande salaisonnée (**CMC : CANADIAN MEAT COUNCIL**).

Les nitrites sont aussi utilisés dans la manufacture des teintures et du caoutchouc, dans l'industrie textile et photographique. Ils servent aussi d'inhibiteur de corrosion et d'antidote dans des cas d'empoisonnement au Cyanure .Dans l'industrie, ils sont utilisés pour transformer des amines en sels de diazonium qui sont des colorants organiques. (**Sandarine et Chébékoué 2008**).

3. Toxicité de nitrite :

La consommation de nitrites sous certaines conditions peut entraîner la formation de composés N-nitroso (NOC), dont certains sont cancérigènes (**Crowe et al., 2019**)

Le nitrite ingéré est absorbé dans le système sanguin et réagit avec l'hémoglobine dans les érythrocytes pour former la méthémoglobine (danger pour bébés et les femmes enceintes), et des études animales suggèrent que le nitrite peut traverser le placenta ou exercer un effet trans placentaire, de plus amples travaux sont nécessaires afin d'évaluer l'importance de l'ingestion de NO_3^- et NO_2^- par la mère sur la santé du fœtus .Il est important de mentionner que le nitrite et le nitrate sont classifiés comme possiblement cancérigènes pour l'humain. Des études épidémiologiques ont démontré une association entre la présence de ces ions dans l'eau potable et le cancer de l'estomac. (**Corriveau et al., 2009**)

Cette molécule (NO_2^-) résulte de l'oxydation du fer (II) contenu dans la molécule d'hémoglobine en fer (III), ce qui rend inopérant le transport de l'oxygène vers les tissus par l'hémoglobine. Une méthémoglobinémie modérée «30% de l'hémoglobine oxydée) peut

provoquer des nausées et des maux de tête, tandis qu'une méthémoglobinémie sévère (>50% de l'hémoglobine oxydée) est susceptible de provoquer la mort (**Corriveau et al., 2009**).

La toxicité du nitrite se fait également ressentir chez les poissons, puisque la plupart des espèces forment de la méthémoglobine en présence de nitrite. Toutefois, plusieurs études ont aussi démontré qu'en absence de nitrite dans l'environnement, diverses espèces de poisson peuvent avoir un niveau de méthémoglobine variant entre 0 et 10% (**Corriveau et al., 2009**).

4. Les effets de nitrite :

4.1 Effets physiologie :

NaNO₂ a été utilisé pour induire l'hypoxie. Plus précisément, NaNO₂ transforme l'hémoglobine en MetHb, ce qui réduit la capacité du sang à transporter l'oxygène (**Ribeiroa et al., 2017**), les animaux peuvent mourir d'anoxie tissulaire, Ainsi dans une étude réalisée (**Miller et al., 2021**) sur des rats mâles et femelles Sprague-Dawley et des chiens Beagle qui ont reçu une injection de (NaNO₂) (une fois par jour pendant 7 jours) à des doses variables, les résultats observés étaient que les doses uniques ≥ 100 mg/kg et 60 mg/kg ont entraîné la mort avec des signes cliniques tels que la coloration bleue des lèvres.

Dans une autre étude réalisée sur des rats Wistar exposés au NaNO₂ ont montré une augmentation du temps d'immobilité, suggérant un possible comportement dépressif. L'immobilité est interprétée comme une absence de tentative d'évasion (état comportemental de désespoir). (**Ribeiroa et al., 2017**)

Les animaux présentent une réduction de la prise de poids (**Zhang .ZQ et al., 2017**)

4.2 Effets biologiques :

- **Vasodilatation :**

Les vaisseaux sanguins contiennent des anions qui sont le plus grand réservoir d'oxyde nitrique selon les conditions physiologies pour retourner le nitrite en NO. Les propriétés vasodilatatrices et les mécanismes de bioactivation du nitrite ont été évalués dans l'avant-bras humain et il a été constaté que le nitrite est pompé à un débit de 0.36 à 36 μ l par min, ce qui montre que : à mesure que la concentration de nitrite augmente, il y a une augmentation du débit sanguin dans l'avant-bras, avant et pendant l'exercice, avec ou sans inhibition de la NO synthase. Ce qui montre que la fuite de nitrite est directement proportionnelle à la formation rapide d'hémoglobine dans les globules rouges et inversement proportionnelle à la saturation

de l'oxygène. Aussi, cette étude a montré la vasodilatation des anneaux aortiques du rat et formation de gaz NO et d'hémoglobine modifiée par NO résultant du nitrite réductase activité de la désoxyhémoglobine et des érythrocytes désoxygénés.

Cette découverte associe hypoxie tissulaire, allostérie de l'hémoglobine et la bioactivation des nitrites. Ces résultats suggèrent que le nitrite représente un pool biodisponible majeur de NO et décrivent une nouvelle fonction de l'hémoglobine en tant que nitrite réductase, contribuant potentiellement à la vasodilatation hypoxique (**Cosby et al., 2003**).

- **Tuniques oculaire :**

L'effet cytotoxique de nitrite sur la rétine bovine in vitro a été montré .que Il y a des altérations tissulaires et cellulaires étaient observées dans toutes les structures oculaires, mais à des degrés différents selon la concentration et le temps d'incubation. (**Lahmar-Belguendouz. K et al., 2009**).

	Concentration de nitrite	Durée d'incubation	Cellules cibles	Effets
Effets des nitrites sur les explants oculaires Postérieurs	300µm	après 24 heures	Rétine	Altérations tissulaires
	400µm	après 24 heures	Choroïde	Importantes vasodilatations augmentation de l'épaisseur
	400µm	après 48 heures	Vaisseaux sanguins	Vasodilatation accrue pouvant aller jusqu'à leur éclatement
			Sclérotique	Aucune atteinte
Effets des nitrites sur les explants oculaires Antérieurs	300µm	après 24 heures	Procès ciliaires	Perte de l'épithélium non pigmenté par éclatement cellulaire.
	400µm	après 24 heures	épithélium cornéen	Décollement de la membrane de Bowman, détachement les cellules superficielles
			Iris	Lésions au niveau de l'épithélium
	A plus fortes concentrations	après 24 heures	Epithélium	Désorganisation générale observée avec l'apparition de cellules de petites tailles présentant une vacuolisation cytosolique et la libération de cellules de forme sphérique
			Stroma cornéen	Légère dissociation des fibres conjonctives
			Corps ciliaire	Aucune altération structurale activation et infiltration de cellules activées
	500µm	Après 48 heures	Trame conjonctive	Lâche, se dissociant presque totalement

- **Musculaires :**

Les patients atteints de drépanocytose (SCD) peuvent avoir une capacité d'exercice limitée et un dysfonctionnement musculaire caractérisé par une diminution de la force, une atrophie, des anomalies microvasculaires, des modifications de la distribution des fibres et des anomalies énergétiques des muscles squelettiques. De plus en plus de preuves suggèrent que dans le SCD, il y a une altération de la disponibilité/de la signalisation de l'oxyde nitrique (NO) et que le nitrate/nitrite peut servir de réservoir de NO et améliorer les performances musculaires. Ici, nous avons examiné les effets du nitrite sur la force musculaire, la capacité d'exercice et sur les propriétés contractiles des muscles rapides (extensor digitorum longus, EDL) et à contraction lente (soleus) chez des souris SCD. Par rapport aux témoins, les homozygotes (faucille) avaient une force de préhension réduite, des performances de roulement de roue altérées et une diminution de la masse musculaire des muscles à contraction rapide, mais pas des muscles à contraction lente. Le traitement au nitrite a entraîné une augmentation des taux plasmatiques de nitrite chez les témoins, les hétérozygotes et les homozygotes, mais une diminution des taux de nitrite musculaire chez les hétérozygotes et les homozygotes. Quel que soit le génotype, le nitrite a entraîné des augmentations de la force de préhension, qui ont été associées à des augmentations de la force spécifique dans l'EDL, mais pas dans le muscle soléaire. De plus, le nitrite a augmenté la fatigabilité de l'EDL, mais pas celle du soléaire, dans tous les génotypes. Inversement, chez les témoins, le nitrite a diminué, alors que chez les homozygotes, il a augmenté la sensibilité de l'EDL aux lésions induites par la contraction. Fait intéressant, le nitrite n'a entraîné aucun changement dans les distances parcourues sur la roue en marche. Ces effets différentiels du nitrite dans les muscles à contraction rapide et lente suggèrent que ses effets ergogéniques seraient observés dans des exercices de haute intensité/courts comme constaté avec des augmentations de la force de préhension mais aucun changement sur les distances de course des roues. En outre, les effets différentiels du nitrite chez les homozygotes et les animaux témoins suggèrent que les souris falciformes, qui ont altéré la disponibilité/signalisation du NO, gèrent le nitrite différemment des animaux témoins. (Wang *et al.*, 2018).

4.3 Effets cancérigènes :

Le nitrite de sodium provoque des tumeurs dont le site et la nature varient selon l'espèce et le sexe (pré-estomac, foie, glande mammaire) :

Le nitrite de sodium est un cancérigène faible chez le rat, nécessitant une période d'exposition supérieure à deux ans. Il n'y a pas d'indication de cancérigénicité chez le rat mâle, exposés à des doses allant jusqu'à 3 g/l dans l'eau de boisson ou 5 % dans la nourriture pendant deux ans ; si le traitement est prolongé, on note, chez les rats femelles, une augmentation du taux de papillomes squameux du pré-estomac, de néoplasmes hépatocellulaires ou de fibroadénomes de la glande mammaire.

Chez la souris mâle (0,75 à 3 g/l dans l'eau de boisson pendant deux ans), il n'y a pas de développement tumoral ; en revanche, la souris femelle le développe des papillomes à cellules squameuses ou des carcinomes du pré-estomac.

De plus, on observe une augmentation du taux d'hyperplasie épithéliale du pré-estomac (souris mâles et femelles) et de l'estomac glandulaire (souris mâles uniquement).

Il agit également comme promoteur de cancérigénèse avec développement de tumeurs du pré-estomac chez le rat et la souris et diminue la survenue de certains cancers chez le rat :

En présence de substances cancérigènes (à des doses non actives), le nitrite de sodium se comporte comme promoteur de cancérigénèse avec développement de néoplasmes du pré-estomac chez le rat et la souris. Dans l'estomac, le nitrite de sodium serait transformé par les sucs gastriques en HNO qui se dimériserait en NO, intermédiaire réactif se liant aux amines et amides secondaires pour former des composés N-nitroso cancérigènes. **(Bonnard. N *et al.*, 2021)**

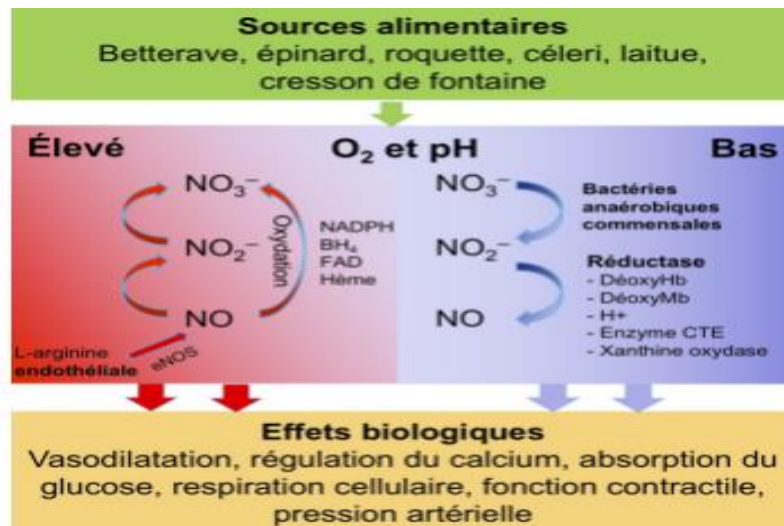


Figure01 : Formation et recyclage des nitrates (NO_3^-), nitrites (NO_2^-) et de l'oxyde nitrique (NO). (Woessner et coll., 2017)

5. Biotransformation du nitrite :

Le nitrite est le produit intermédiaire de plusieurs réactions d'oxydation et de réduction, impliquées dans les différents processus de transformation de l'azote (Corriveau *et al.*, 2009).

5.1 La transformation de l'azote :

Principalement responsables de la présence de nitrite dans les cours d'eau:

La nitrification, la dénitrification, la réduction dissimilatrice du nitrate en ammonium (DNRA).

- **La nitrification :**

Est un processus qui transforme l'ammonium en nitrate par deux réactions d'oxydation successives. Les bactéries autotrophes du genre *Nitrosomonas* réalisent la nitrification en oxydant l'ammonium en nitrite, alors que les bactéries autotrophes du genre *Nitrobacter* réalisent la nitrification en oxydant le nitrite en nitrate. Ces deux réactions d'oxydation sont catalysées par leur enzyme spécifique, qui répond différemment aux conditions physico-chimiques ambiantes. Conséquent, l'accumulation de NO_2^- se produit lorsque le taux d'oxydation de NH_4^+ est plus élevé que le taux d'oxydation du NO_2^- .

Plusieurs facteurs environnementaux dont les effets combinés sont complexes influencent le taux d'oxydation des deux réactions. Les concentrations en NH_4^+ et NH_3 libre,

le pH, la température, l'oxygène dissous (OD), le rayonnement ultraviolet, l'importance des populations bactériennes et le substrat disponible. (Corriveau *et al.*, 2009).

- **La dénitrification :**

Consiste en la transformation du nitrate en diazote (N_2) ou en protoxyde d'azote (N_2O) par une série de réactions de réduction. Les bactéries dénitrifiantes sont hétérotrophes. Elles métabolisent le NO_3^- en l'utilisant comme accepteur d'électron dans la chaîne respiratoire. D'un autre côté, la DNRA est effectuée par des bactéries fermentaires anaérobies strictes, anaérobies facultatives et aérobies qui utilisent le NO_3^- comme source d'électron. Le nitrate est ainsi transformé en ammonium par une série de réactions de réduction. Le ratio entre la disponibilité du substrat en carbone et en azote est déterminant dans la répartition de la contribution relative des deux processus. Ainsi, la DNRA est favorisée lorsque l'environnement est limité en nitrate, alors que la dénitrification est favorisée lorsque le carbone est peu disponible. (Corriveau *et al.*, 2009).

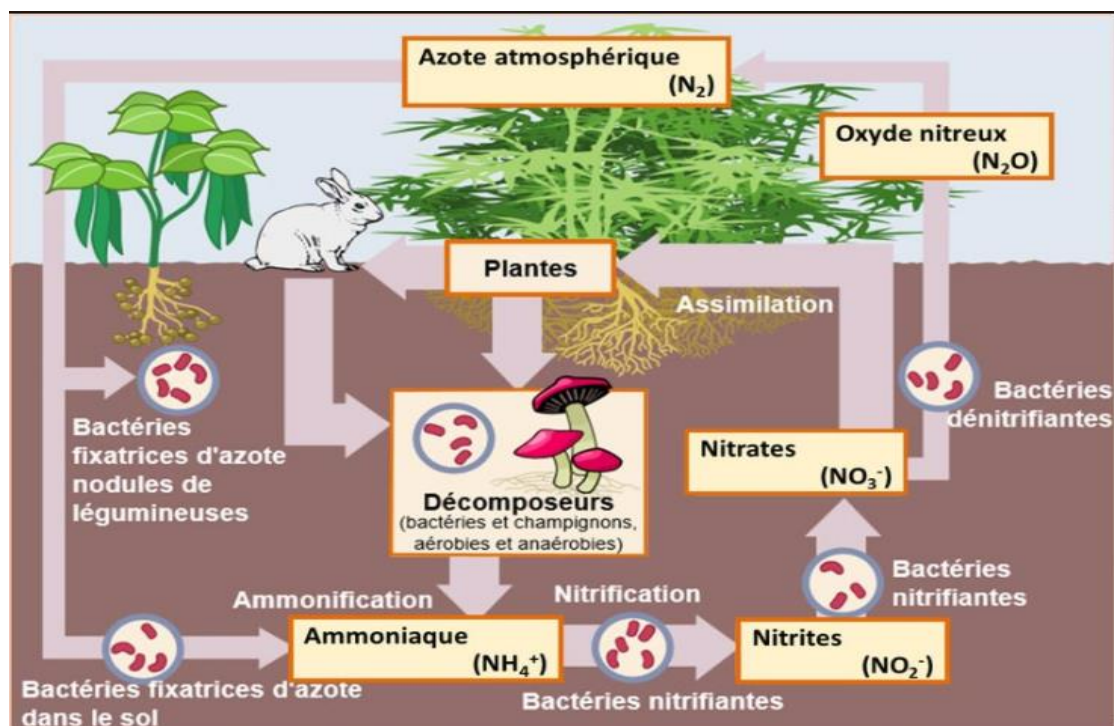


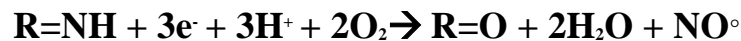
Figure02 : schéma simplifié du cycle d'azote dans l'environnement. [1]

5.2 Formation du monoxyde d'azote par la NO synthase :

Le monoxyde d'azote est une molécule très réactive qui réagit avec un grand nombre de substrat, notamment par nitration. Il possède une demi-vie relativement longue et il est capable de traverser les membranes cellulaires. Cependant, il serait rapidement protoné en

acide nitreux et son importance in vivo n'est pas clairement comprise, l'un des principaux polluants atmosphériques et se compose chimiquement avec un atome d'oxygène (O) et un atome d'azote (N).

NO° est un radical libre provenant de la transformation de la L-arginine ($\text{R}=\text{NH}$) en citrulline ($\text{R}=\text{O}$) (sous forme L ou D, le doute subsiste encore par la NO-Synthase. (Mongens, 2013):



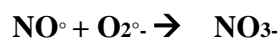
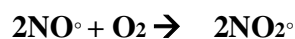
Identifiées pour la première fois en 1989, les trois isoformes de la NO synthase ont été clonés et purifiés entre 1991 et 1994 :(Mongens. 2013)

La NOS neuronale exprimée de manière constitutive et prédominante dans le cytoplasme des cellules du système nerveux central.

La NOS inductible présente dans le cytoplasme des macrophages (mais aussi, en moindre mesure, dans les hépatocytes, les neutrophiles, les cellules pancréatiques et les cellules endothéliales).

La NOS endothéliale, exprimée de façon constitutive et associée aux membranes plasmiques et à l'appareil de Golgi des cellules endothéliales.

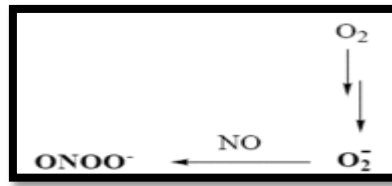
Le monoxyde d'azote produit deux dérivés en réagissant avec l'oxygène et l'anion superoxyde :



5.3 Réaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde :formation de peroxydinitrite

L'anion peroxydinitrite NO_3^- est un puissant agent oxydant qui provoque l'oxydation de l'hémoglobine et de la méthémoglobine, l'oxydation lipidique (notamment des LDL), la fragmentation de l'ADN et qui a également des effets délétères sur les protéines .qui sont des agents nitrosomes conduisant a la formation de nitrite (NO_2^-) et la nitrosothiol dans les milieux biologique. (Mongens. 2013).

On présence l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) le couplage avec le (NO) produit l'anion peroxynitrite, selon la réaction suivant :



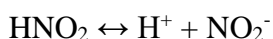
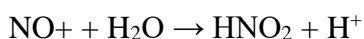
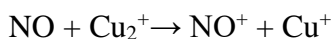
On peut noter que le peroxynitrite peut aussi être formé par l'oxydation de NO_2^- par la myéloperoxydase ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Mongens 2013)

5.4 Le devenir des nitrates et de nitrites dans l'organisme :

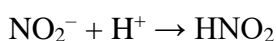
Le nitrite (NO_2^-) se forme dans l'organisme via l'oxydation de l'oxyde nitrique (NO) ou par la réduction du nitrate (NO_3^-). La réaction non enzymatique du NO avec l'oxygène dans les tissus est relativement lente, alors que son oxydation par le multicuivre oxydase céruloplasmine dans le plasma est rapide. Les bactéries commensales dans la cavité buccale et le tractus gastro-intestinal contribuent à la formation de nitrite via une réduction à un électron du nitrate. (Lundberg *et al.*,2008)

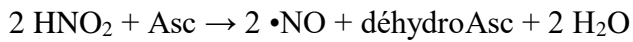
La réduction du nitrite en NO se produit dans le sang et les tissus et passe par plusieurs voies enzymatiques et non enzymatiques, dont certaines sont énumérées ci-dessous. La réduction acide des nitrites entraîne la génération de NO mais aussi d'autres oxydes d'azote, aux propriétés nitrosantes (N_2O_3) et nitrantes (dioxyde d'azote, $\bullet NO_2$). En présence d'acide ascorbique ou de polyphénols, la réduction acide des nitrites est grandement améliorée avec moins de génération de N_2O_3 et de $\bullet NO_2$. L'oxydation du nitrite se produit dans le globule rouge et entraîne la formation de nitrate et de méthémoglobine (Met-Hb). (Lundberg *et al.*,2008).

➤ Céruloplasmine :

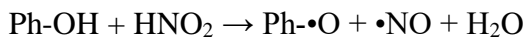
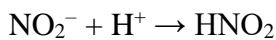


➤ Acide ascorbique :



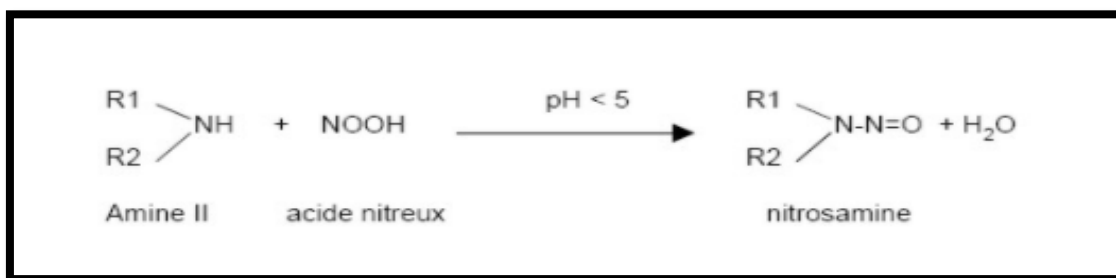


➤ Polyphénols (Ph-OH) :



- **La formation des nitrosamines :**

Les nitrosamines sont formées par réaction d'amines secondaires ou tertiaires avec un agent nitrosant. Dans les aliments, l'agent de nitrosation est généralement l'anhydride nitreux, formé à partir de nitrite en solution aqueuse acide. Les constituants alimentaires et la composition physique des aliments peuvent affecter la formation de nitrosamines. (Scanlan 1983).



5.5 La réaction du nitrite avec la désoxyhémoglobine pour former du NO et de l'hémoglobine fer-nitrosylée :

Le nitrite est d'abord réduit pour former du NO et de la méthémoglobine, avec une constante de vitesse de $2,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (mesurée à 25°C , pH 7,0). Cette réaction est de pseudo-premier ordre, régie par les grandes quantités (20 mM) d'hémoglobine intra érythrocytaire et limitée par le taux d'absorption des nitrites par la membrane érythrocytaire. Le NO se lie ensuite à la désoxyhémoglobine pour former de l'hémoglobine fer-nitrosylée, s'échappe de l'érythrocyte ou réagit avec d'autres oxydes supérieurs (tels que NO_2 , pour former N_2O_3 et S-nitroso-hémoglobine). Ces réactions sont représentées par les équations suivantes :



Les perfusions de nitrite ont été associées à la formation rapide d'hémoglobine nitrosylée au fer dans les érythrocytes et, dans une moindre mesure, S-nitroso-hémoglobine.

La formation d'hémoglobine modifiée par NO était inversement proportionnelle à la saturation en oxyhémoglobine. . (Cosby *et al.*, 2003)

5.6 Réduction de nitrite a l'oxyde nitrique dans la mitochondrie :

Chez les animaux, le NO est synthétisé à partir de la L-arginine par la synthase d'oxyde nitrique (NOS) dont isoforme mitochondrial. Le nitrite est réduit en NO par la chaine de transfert d'électron au niveau du site Q externe du complexe 3.

La conversion du nitrite en NO par COX ou par oxydation chimique au sein du milieu membranaire et l'inactivation de ce mécanisme à faible l'O₂ à été suggéré pour augmenter le niveau de NO et médire la vasodilatation hypoxique.

Le NO produit au complexe 3 diffuse rapidement vers la COX et se lie au site actif, pour provoquant l'inhibition de consommation d'O₂. Nous montrons que les mitochondries exercent un control fin de bilan d'oxygène par le cycle NO-nitrite.(MM de Mecca *et al.*, 2002)

Chapitre 02:

Cerveau

I. Le système nerveux

Le système nerveux (SN) est le système le plus complexe du corps .il gère l'ensemble des fonctions de l'organisme .il se compose de centres nerveux qui sont chargés de recevoir et de traiter les informations avant de les transmettre via les voies nerveuses qui les transportent vers les autres organes .le SN représente l'ensemble des organes et tissus nerveux qui commandent les fonctions de sensibilité .de mobilité et ainsi que les facultés intellectuelles et affectives. Le système nerveux peut décomposer en trois parties :

Le système nerveux central (névraxes): il assure l'intégration de l'information. Il se situe dans les cavités osseuses et est représenté par la moelle épinière dans le canal vertébral et par le cerveau dans la boîte crânienne.

Le système nerveux périphérique: sa fonction et la transmission de l'information dans les deux directions (SN-organe, organe -SN). Il est formé par les nerfs rachidiens de la moelle épinière et les nerfs crâniens.

Le système nerveux végétatif: est l'ensemble des centres et des nerfs contrôlant les viscères (fonction vitales internes), les vaisseaux sanguins et les glandes, la digestion, respiration, circulation sanguine, sécrétion des hormones... etc. Il s'agit d'un système inconscient (**Takfarinas *et al.*, 2016**).

II. Organisation et fonction cérébrales :

L'encéphale est constitué de quatre grandes régions : (**Camirand.2019**)

1) Le télencéphale ou néocortex :

L'encéphale désigne, en neurosciences, les structures nerveuses centrales contenues à l'intérieur de la boîte crânienne incluant en fait tous les constituants du cerveau crânien.les deux hémisphères cérébraux rattachés de part et d'autre au diencéphale. (**Camirand.2019**)

Chaque partie de l'encéphale contient des cavités de forme et de taille différentes. La cavité primaire du tube neural et des vésicules cérébrales devient beaucoup plus petite durant le développement du fait de l'épaississement des parois. (**Kahile *et Frotscher.* 2015**)

- Comparaison la surface cortex entre les mammifères :

La surface du cortex humain est environ 1 000 fois supérieure à celle de la souris et dix fois plus importante que celle du cortex du macaque. En revanche, l'épaisseur du cortex de l'homme n'est que deux fois supérieure à celui du singe, et même moins. Ces différences considérables de surface sont en rapport avec la taille des zones prolifératives ventriculaires, qui sont elles-mêmes en rapport avec la durée de la période de division symétrique au cours des stades précoces de la gestation. (Bear. MF *et al.*, 2016).

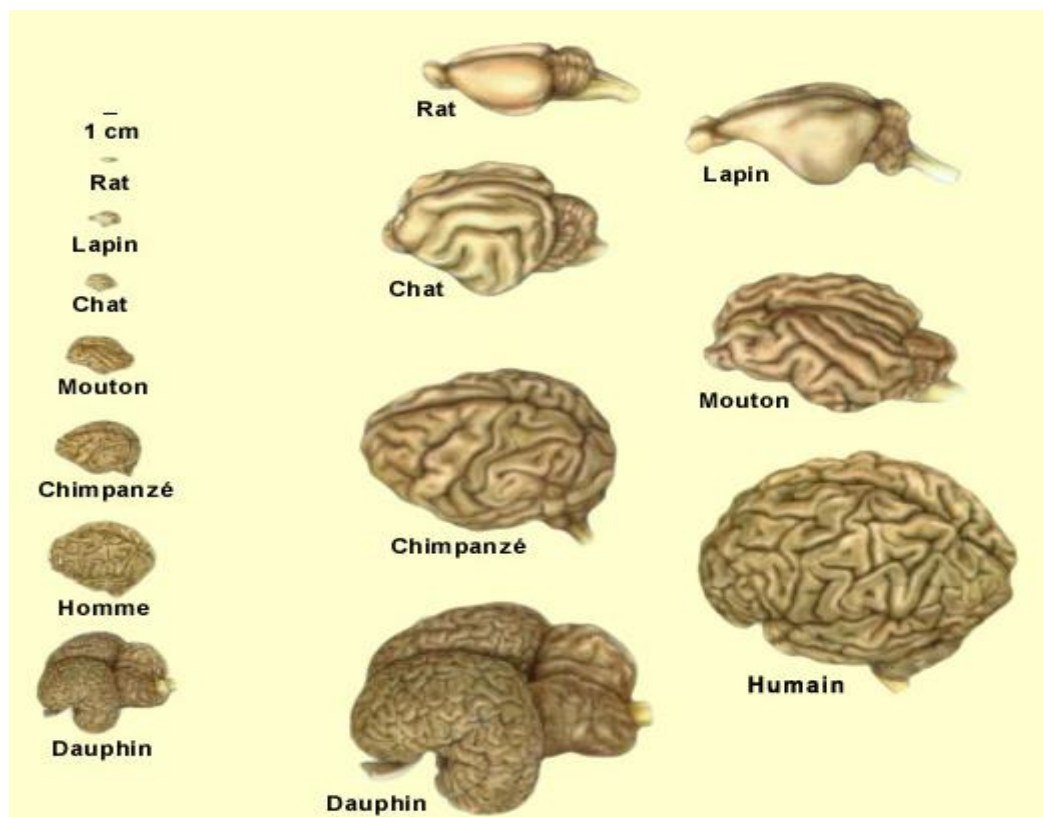


Figure03 : Les cerveaux de différentes espèces de mammifères, à la même échelle à gauche, et agrandis sans être à l'échelle à droite. [2]

▪ **Hémisphères cérébraux :**

Le cerveau est divisé en deux hémisphères cérébraux séparés par une profonde scissure sagittale ou scissure médiane. Normalement, l'hémisphère cérébral droit reçoit les sensations et contrôle les mouvements du côté gauche du corps ; et l'hémisphère cérébral gauche est associé aux sensations et au contrôle des mouvements de la partie droite du corps. (Bear .MF *et al.*, 2016).

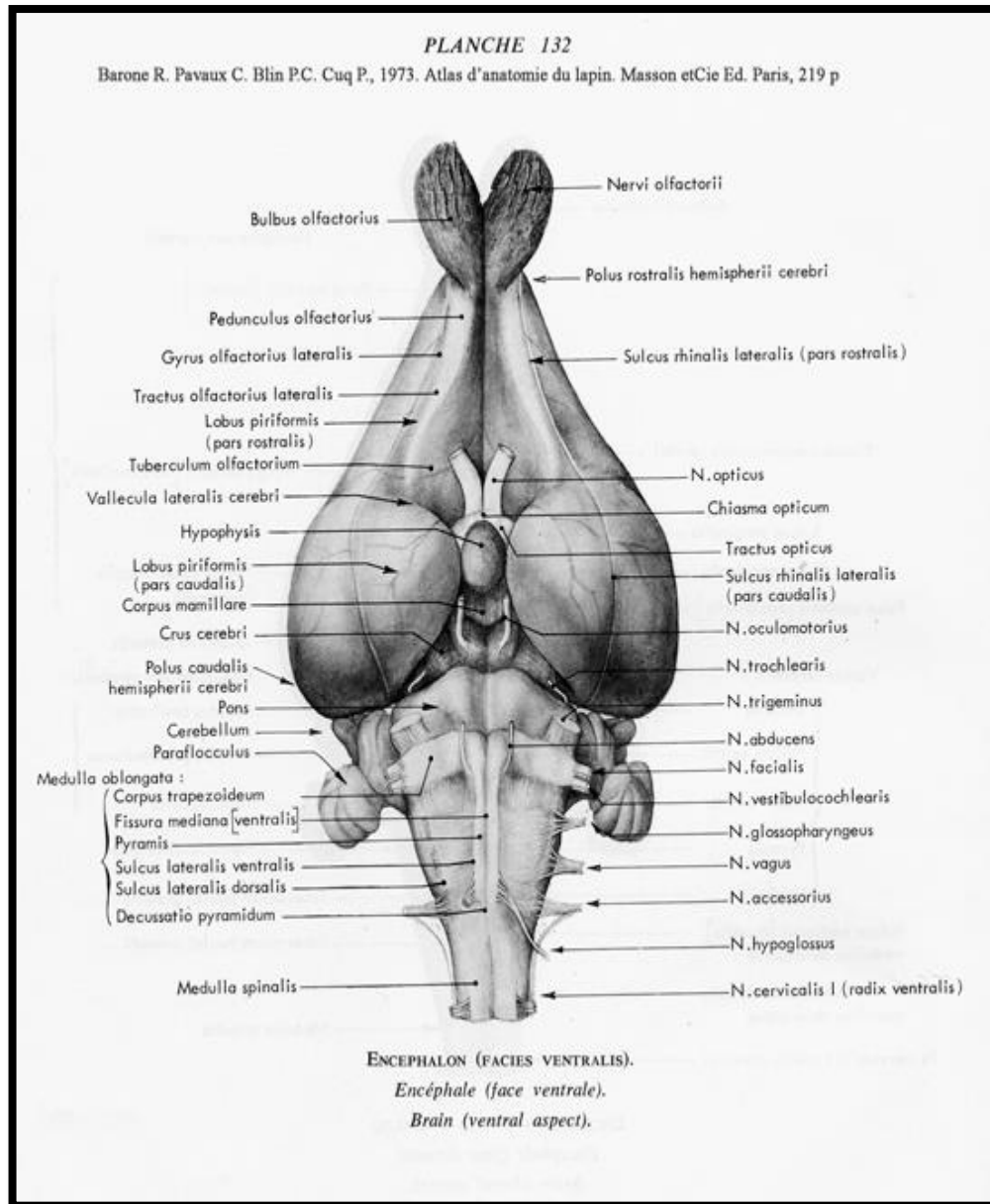


Figure04 : La face inférieure du cerveau du lapin (Barone *et al.* ,1973)

2) Le diencephale :

Partie de l'encéphale surmontant le tronc cérébral qui unit le mésencéphale et les hémisphères cérébraux. Il est creusé d'une cavité, le 3^{ème} ventricule, qui le partage en deux parties symétriques et qui divise le thalamus en deux. Il est constitué du thalamus, de l'épithalamus, des régions subthalamus, métathalamus et de l'hypothalamus. (Camirand.2019)

3) Le cervelet :

Le cervelet est une structure nerveuse appartenant à l'encéphale et représentant près de dix % du poids du cerveau. Il occupe la majeure partie de la fosse cérébrale postérieure en se plaçant en arrière du tronc cérébral auquel il est rattaché de manière symétrique par les pédoncules cérébelleux. Le cervelet est donc une structure située en dérivation du tronc cérébrale.

La face supérieure du cervelet est séparée des hémisphères cérébraux par une structure dure-mérienne. la tente du cervelet. (Vuillier. F *et al.*,2010)

4-Le tronc cérébral :

Le tronc cérébral ou tronc encéphalique : partie inféro-antérieure de l'encéphale qui prolonge la moelle épinière vers le cerveau. Il présente des centres vitaux importants, haut lieu de sécrétion des neurotransmetteurs et lieu de passage des voies viscéromotrices et sensitives. Il est constitué de trois parties :

a)- Le bulbe ou moelle allongée: unit la moelle spinale au pont.

b) - Le pont ou protubérance: portion comprise entre le bulbe et l'encéphale et située devant le cervelet dont il relie les deux hémisphères à la manière d'un pont.

c) - Le mésencéphale : Courte portion supérieure du tronc cérébral entre le pont et le cerveau, située au niveau de l'incisure de la tente du cervelet, chevauchant les fosses cérébelleuse et cérébrale. Le mésencéphale contribue au contrôle moteur, à la vision et à l'ouïe, ainsi qu'aux réflexes liés à la vue et à l'audition. (Camirand.2019)

III. Différents types de cellules nerveuses :

La structure des différents types de cellules du système nerveux : les neurones et les cellules gliales. Les neurones et les cellules gliales représentent de vastes catégories cellulaires. Dans chacune d'entre elles, de nombreuses sous-catégories peuvent être distinguées, avec des différences de structure, de chimie, ou simplement de fonction. (Takfarinas *et al.*, 2016)

1) **Les neurones** : forment les cellules microscopiques du système nerveux. Ils constituent l'élément de base pour les communications nerveuses et l'ensemble des fonctions cellulaires effectuées (Takfarinas *et al.*, 2016).

Les différentes parties des neurones :

- **Le soma**

Il abrite le noyau. Sa forme est variable suivant le type de neurone. Elle peut être pyramidal, ovoïde ou sphérique. La fonction principale du soma est le traitement des signaux qu'il reçoit des dendrites via les synapses et leur émissions le long des axones vers d'autres cellules cibles (Takfarinas *et al.*, 2016).

- **L'axone**

Généralement unique, il est un prolongement du noyau. L'axone conduit l'information du corps cellulaire vers d'autres neurones avec lesquels il réalise des connexions appelées synapses. Ils peuvent aussi stimuler directement d'autres types de cellules comme les cellules des muscles ou des glandes. Il peut être de simple ou myélinisé (Takfarinas *et al.*, 2016).

- **Les dendrites**

Ce sont de multiples prolongements qui prennent naissance au niveau des somas puis se ramifient et recueillent l'information et l'acheminent vers le corps de la cellule et se différencient de l'axone par des contours irréguliers et constituent la surface principale pour la réception de l'information (Takfarinas *et al.*, 2016).

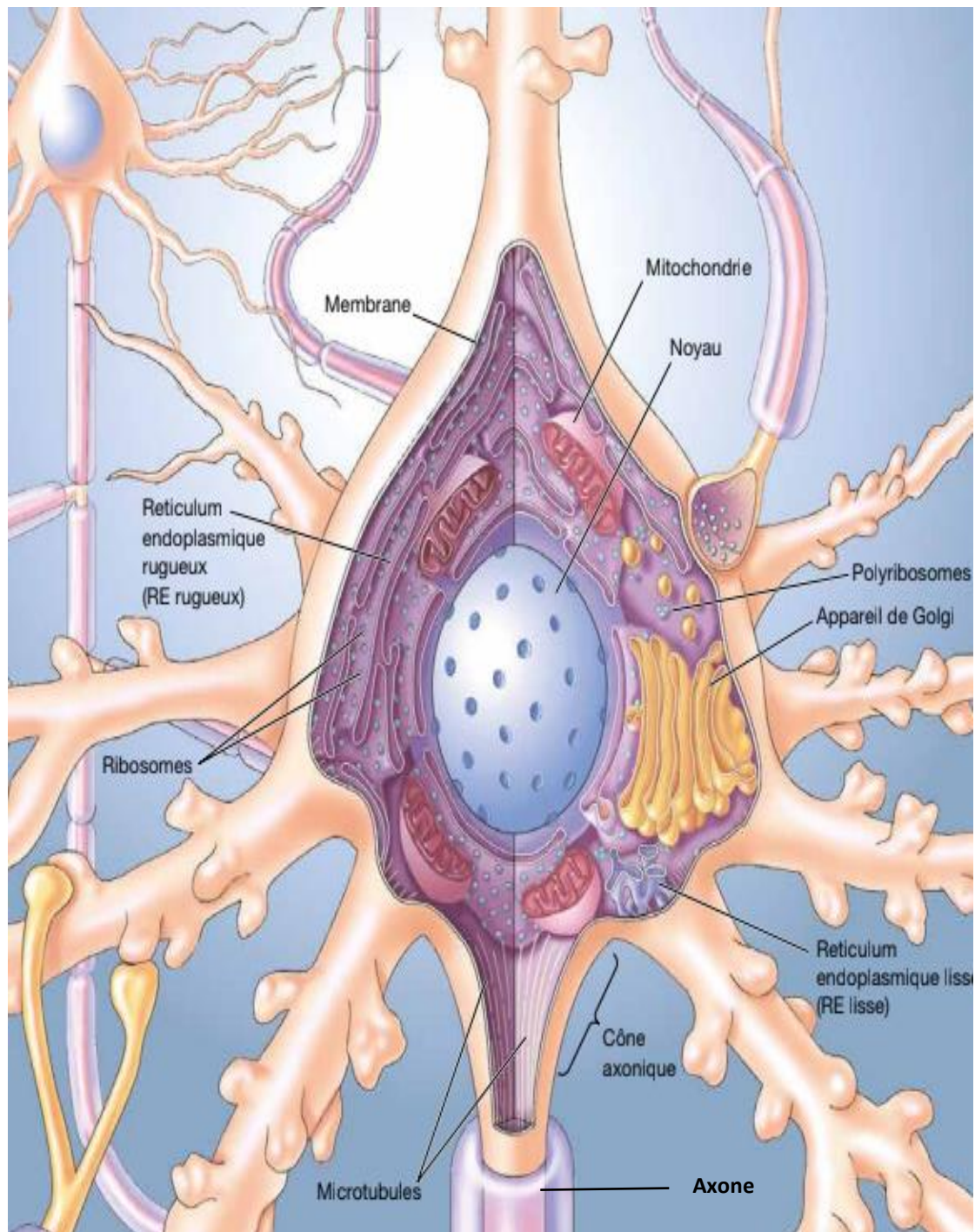


Figure05 : Structure du neurone (Bear .MF *et al.*, 2016).

- 2) **Les cellules gliales** : Les cellules spécialisées de soutien (cellules gliales) sont de quatre types : astrocytes, oligodendrocytes, cellules microgliales et cellules épendymaires.
- a) **Les astrocytes** : représentent environ 50 % de la population des cellules gliales et sont dix fois plus nombreux que les neurones. Ils forment un réseau de soutien pour les neurones et autres cellules du système nerveux central.
 - b) **Les oligodendrocytes** : sont responsables de la formation des gaines de myéline autour des axones.
 - c) **Les cellules microgliales** (ou microglie) proviennent des monocytes sanguins ayant pénétré dans le parenchyme du système nerveux central et peuvent, lors de lésions du tissu nerveux, s'activer et se transformer en macrophages.
 - d) **Les épendymocytes** (ou cellules épendymaires) forment un épithélium cubique ou prismatique simple cilié assurant le revêtement des cavités ventriculaires du système nerveux central (ventricules latéraux, troisième ventricule, aqueduc de Sylvius, quatrième ventricule, canal de l'épendyme) et jouent ainsi un rôle dans les échanges entre le liquide céphalorachidien et le système nerveux central. (**Haberer *et al.*, 2010**)

Matériel et

Méthode

I. Matériel :

1. Matériel biologique :

Lapins

Dans notre étude, nous avons utilisé cinq lapins de la race néo-zélandais qui ont été fournis par des éleveurs de lapins de la commune de Hammamet, Tébessa, le poids des lapins initial était variait entre 1,28 kg et 3.12 kg.



Figure 06 : Lapin de race néo-zélandais

2. Matériel de laboratoire :

Cette étude a été réalisée à l'aide de quelques appareils spécialisés dans notre laboratoire universitaire, en plus d'un ensemble d'instruments. (**Annexe 01**).

3. Produits d'administrés

Nitrite de sodium NaNO_2 se présente sous la forme d'une poudre, ou légèrement, inodores.

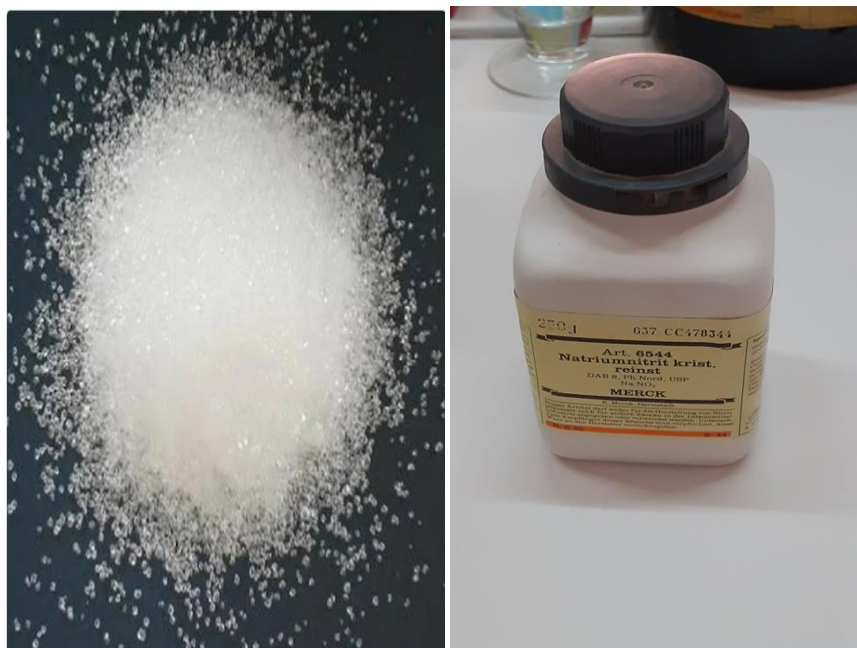


Figure 07: Nitrite de sodium

II. Méthode d'élevage :

1. Description d'élevage :

L'élevage des lapins a été réalisé dans l'animalerie du département de Biologie appliquée de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie de TEBESSA.

Les lapins ont été placés pendant la période d'adaptation et de traitement dans des cages métalliques spécialisées qui permettent un approvisionnement facile en nourriture et en eau nécessaires à la vie de l'animal.

Des mesures de poids corporel ont été faites pour les animaux pendant l'adaptation et le traitement jusqu'au sacrifice.

2. Mode de traitement :

Après une période d'adaptation de trois semaines, le traitement a été réalisé en gavant le lapin avec des gélules contenant du nitrite de sodium après avoir mesuré le poids corporel du lapin chaque semaine. Les lapins ont été traités avec une dose de nitrite de 100 mg/kg de poids corporel pendant six semaines.

Les lapins ont été divisés en deux groupes :

Groupe1 : Les témoins : les sains qui n'a reçu aucun traitement.

Groupe2 : Les traités : Les lapins qui gavée de NaNO_2 (100 mg/kg de poids corporel) pendant six semaines.

III. Dissection :

1) Préparation des échantillons :

Après six semaines de traitement, les lapins ont été sacrifiés par exsanguination. Le sang a été récupéré dans des tubes EDTA puis le plasma a été récupéré par centrifugation et congeler jusqu'au jour de l'utilisation. En parallèle, la tête du lapin a été récupérée et la boîte crânienne a été ouverte afin de récupérer le cerveau dans un délai très réduit pour éviter les altérations post mortem. Le cerveau du lapin a été divisé en deux parties : une a été mise dans le congélateur pour faire les dosages biochimiques à partir de broyage des tissus et l'autre a été mise dans le formol pour la réalisation de coupes histologiques.

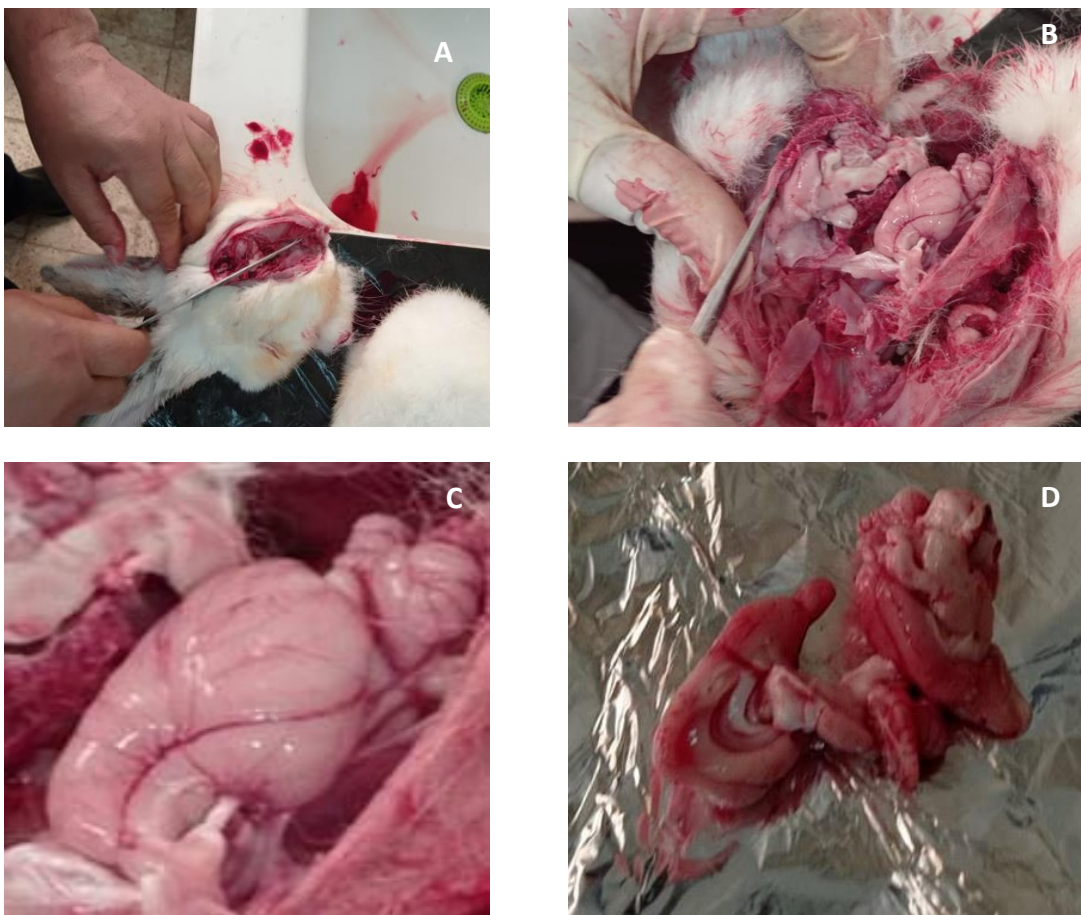


Figure 08 : Cerveau du lapin pendant du sacrifice

2) Broyages des tissus :

Un gramme (1g) de tissu cérébral a été mis dans 4ml de solution tampon phosphate, puis est mis dans un récipient rempli de glace durant toute la procédure. Le broyage est réalisé à l'aide d'un sonificateur pendant 150secondes divisée en 5 parties chaque partie 30 secondes. Après l'obtention d'un mélange homogène, une centrifugation a été faite afin d'obtenir la fraction cytosolique (le surnageant) qui a été conservé par congélation jusqu'au jour de l'utilisation.

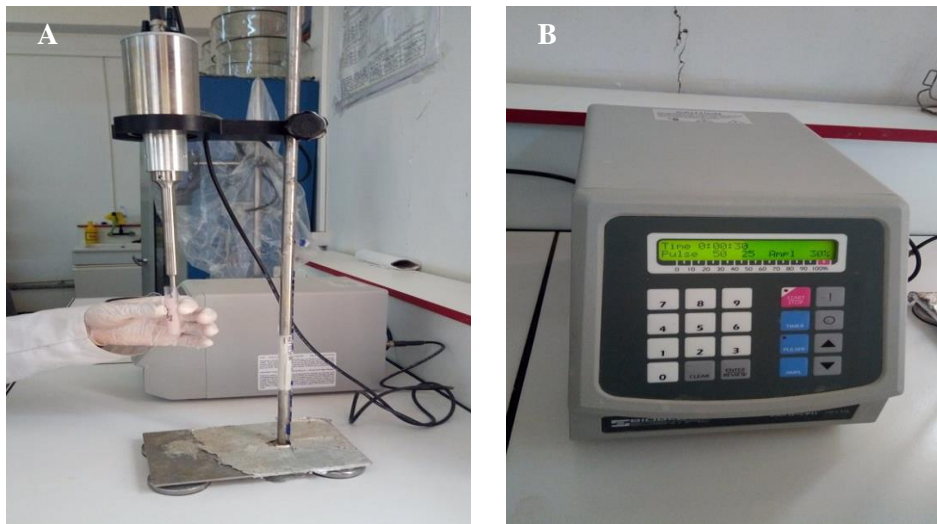


Figure09 : Le sonificateur

IV. Analyses biochimique :

1) Dosage des protéines par la méthode de Bradford :

➤ Principe :

Le dosage de protéines Bradford est le dosage colorimétrique privilégié pour quantifier la concentration totale en protéines. Basée sur la formation complexe entre les résidus d'acides aminés basiques et aromatiques avec le colorant Coomassie® bleu brillant G-250, la méthode de Bradford est plus facile, plus rapide.

➤ Protocol:

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution de BSA 0.1% un volume de 3ml de réactif de Bradford est ajoutée dans chaque tube .la lecture des DO se fait à 595nm.

La concentration protéique est déterminée par extrapolation de la DO sur le courbe étalon $DO=f(BSA)$ qui est préalablement établie.

2) Albumine oxydée :

L'albumine oxydée est une protéine qui a perdu sa propriété antioxydante en raison de son association de son groupement SH avec les radicaux libres.

➤ **Protocol:**

Uniquement au sang : 50 µl CoCl₂ 200 µl plasma, 10 min au Température ambiante après on ajoute 50 µl DTT après 2min 1ml Na Cl au DO = 470.

Cobalt liée au groupement SH d'albumine .ça veut dire le DTT non liée, pas de coloration. Et dans le cas non liée au groupement SH d'albumine, le DTT liée au CoCl₂, Il y a une coloration.

3) Dosage MDA:

Les échantillons contenant des MDA ou des standards MDA réagissent avec le TBA. Cette méthode permet de déterminer la teneur relative en peroxydes lipidiques des échantillons, incluant plasma, sérum, culture cellulaire, surnageants et échantillons d'urine.

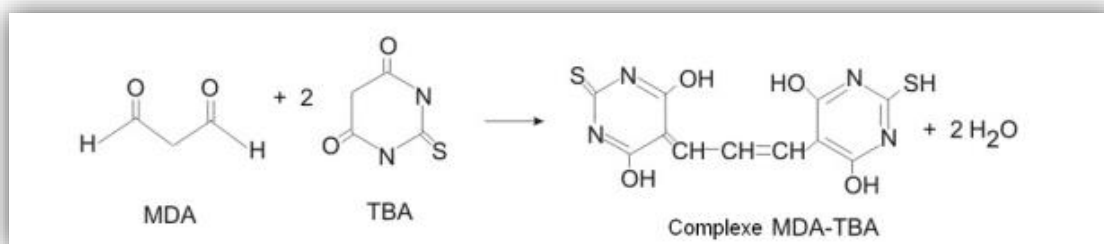


Figure10 : Formation du complexe colorée Malondialdéhyde/thiobarbiturique

(Coloré en rose) (Jeuge *et al.*, 2012)

➤ **Protocol:**

0.5ml de plasma plus 1ml TCA (10 min pour précipitations des protéines) le mélange est centrifugé à 3000G pdt 10 min.

➤ **MDA libre :**

Pour le MDA libre prenons-le surnageant en ajoutant 1ml TBA incubée à 100 C pendant 45 min. Après refroidissement, l'absorbance est lui a 535 nm dans cuve en verre et le résultat exprimée µM/l :

$$\varepsilon = 1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Nous avons obtenu cette formule pour les mesures de la concentration du MDA = $DO/\varepsilon \cdot L$

C : Concentration = $\mu\text{M/L}$

DO : L'absorbance = (535)

ε : Coefficient d'absorption molaire = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

L : Largeur de cuve = 1 cm

➤ **MDA liée ou protéines:**

Dans ce cas on utilise le culot on ajoute 0.6 ml de NaOH après lavé à l'eau distillée en suit dissoudre l'échantillon puis en ajoutant 1ml de TBA incubée à 100 C pdt 45 min. Après refroidissement, l'absorbance est lui a 535 nm dans cuve en verre et le résultat exprimée $\mu\text{M/l}$: $\varepsilon = 1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Nous avons obtenu cette formule pour les mesures de la concentration du MDA.

$$C = DO/\varepsilon \cdot L$$

C : Concentration = $\mu\text{M/L}$

DO : L'absorbance = (535)

ε : coefficient d'absorption molaire = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

L : largeur de cuve = 1 cm

4) **Dosage de protéines carbonylées :**

Protéines carbonylées est l'un des marqueurs les plus couramment trouvés sur les dommages oxydatifs dans les protéines. Il est un marqueur stable extrêmement fiable de l'oxydation des protéines et peut souvent être mesurée de façon fiable dans les échantillons congelés. Le principe de cette méthode est basé sur la réaction entre la 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH) et les composés carbonyles pour former de la 2,4 dinitrophényle (DNP) hydrazone, complexe de couleur jaune qui présente un pic d'absorbance maximum à environ 370nm.

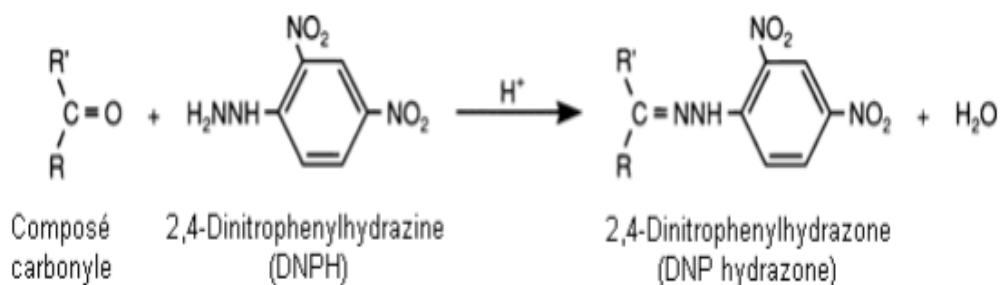


Figure11 : Réaction mise en jeu pour le dosage des carbonyles totaux par la méthode au DNPH (Jeuge *et al.*, 2012)

➤ **Protocol:**

(200ul) de sérum d'échantillons avec 1ml DNPH dans 2M HCL, incubé à température ambiante pendant 1H .Présentation des protéines avec 1ml de TCA froid 10% après on centrifuge à3000 pendant 10 min, laver deux fois avec 1ml éthanol / éthyle acétate (v/v), dissoudre le culot des 1,5 ml de guanidine. n moles des protéines hydrazone / mg des protéines ε hydrazone à 370 nm. Pour les mesures de concentration de protéine carbonylée nous avons utilisé la formule suivante : $C = DO / \epsilon * L$.

C : Concentration = n M/ mg

DO : L'absorbance = (370)

ε : Coefficient d'absorption molaire = 22000 M⁻¹ cm⁻¹

L : largeur de cuve = 1cm

V. Technique histologie :

L'histologie a pour but d'explorer la structure. En effet, la connaissance des tissus normaux, sur le plan structural et ultra structural, permet d'assurer le lien entre structure et fonction. Toute activité histologique a en commun l'action d'observer et d'interpréter ce qui est vu. Dans toute démarche d'ordre histologique, trois étapes se succèdent : le choix du matériel à étudier, La technique permettant de visualiser les structures que l'on veut étudier et la production d'images de ces structures, par des moyens optiques et l'interprétation de ces images. Les étapes de technique histologie :

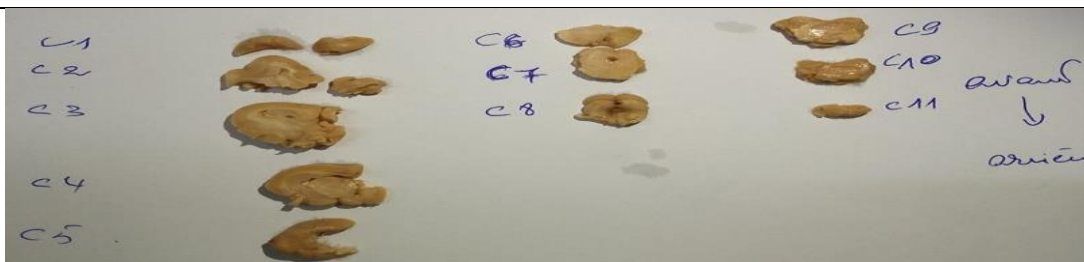
1) Fixation :

Le travail est fait sur la partie qui reste dans le formol sept jours (étape de fixation) le but de cette étape est de conserver les structures .Le prélèvement des tissus provoque leur

mort .les cellules déversent leurs enzymes .ce qui provoque une autodigestion du tissu al 'air ambiant .les prélèvement peuvent être contaminés par des bactéries, cette partie se divise en trois parties principales (front cérébrale, tronc cérébrale, cervelet).



Figure 12: cerveau dans le Formol



**Figure 13: Ensembles des fragments du cerveau dans le formol : (C1, C2, C3, C4, C5 : front cérébrale
C6, C7, C8 : tronc cérébrale, C9, C10, C11 : cervelet)**

2) Déshydratation :

Dans cette étape a été préparé les flacons qui contiennent l'Alcool (éthanol) à des degrés croissants .on à commencer par la concentration d'alcool 70% (deux bains) on laisser l'échantillon pendant une demi-heure dans chaque bain. Puis une autre demi-heure à la concentration 96% (deus bains) et finalement en terminant avec l'alcool de 100%(trois bains) sans oublier la demi-heure entre chaque bain et autre.

3) Eclaircissement :

On a utilisé le Xylène comme solvant organique dans cette étape on met des échantillons dans trois bains d'xylène. Les deux premiers bains on le laissé pendant un quart d'heure et le dernier une demie heure.

4) Inclusion à la paraffine :

Dans l'étuve : deux bain, chaque bain deux heures. A l'aide de paraffine fondue par chauffage ; il est formé les blocs dans barre de Leuckart. Après refroidissement .on obtient un bloc de paraffine dur.



Figure14 : les bains des paraffines

5) Les coupes:

Utilisé l'appareille « Microtome » qui Copé quelque des sections (coupes histologiques) de 3 à 5 microns d'épaisseur.



Figure 15: Microtome

6) Collage et montage :

On chauffe sur une plaque chauffante la paraffine qui colle à la lame, et prépare un réactif (l'eau gélatinée) pour fixer lame et la malle (est confirmé qu'il n'y a pas de bulles d'air avant l'installation)

7) Déparaffinage et réhydratation :

La paraffine doit être éliminé (passer les lames dans des bains de xylène) .On effectue ensuite une Réhydratation (on passe les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant).

8) Coloration :

La coloration la plus utilisée est HE : hématoxyne /éosine ; L'hématoxyne est une substance basique .qui coloré les acides nucléiques en violet et l'éosine est une substance acide qui colore les protéines cytoplasmique en rose.



Figure16 : Les étapes de coloration

VI.Analyse statistique :

Nous avons utilisé logiciel Excel 2007 pour saisir les données DO, nous avons appliqué une analyse de test T avec une valeur $\alpha = 0.05$ pour comparer la réponse des différents groupe (traité et témoins) à nos traitements en utilisant GraphPad Prism 8.0.2(263).

Résultats

Résultats

1. Résultats de la mesure du poids:

1.1 Poids corporel :

Trois lapins ont été traités avec du nitrite de sodium, et deux lapins ont été gardés comme témoins.

Le poids corporel des lapins a été mesuré tous les dimanches pendant six semaines.

Les lapins traités par nitrite de sodium et les témoins son profil de croissance était stable jusqu'au jour du sacrifice.

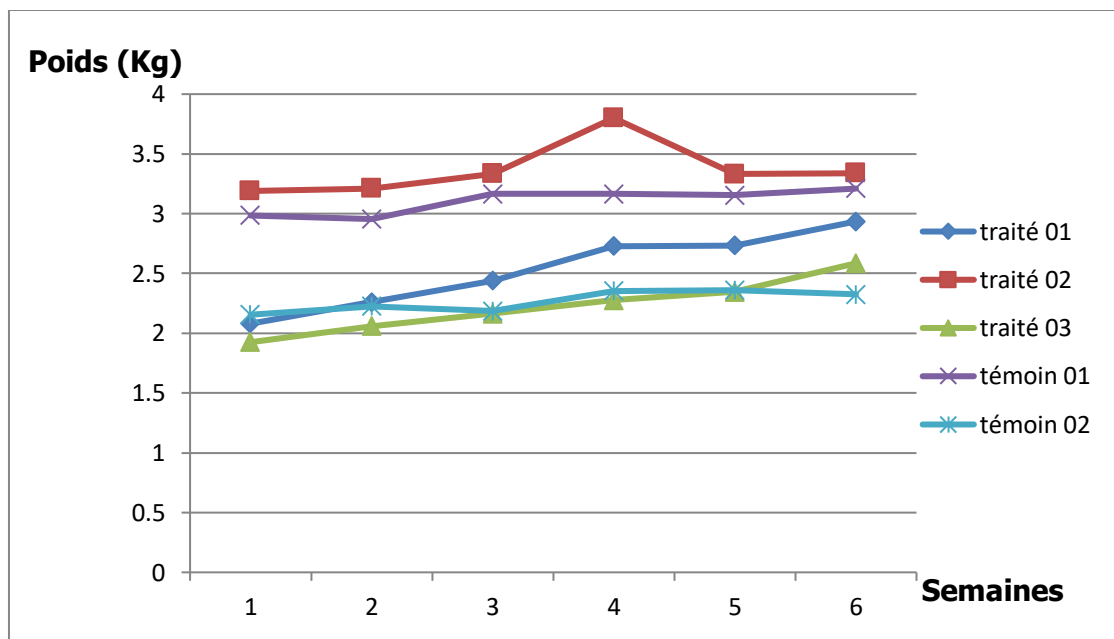


Figure 17: Les variations des poids corporel des lapins pendant la période du traitement

1.2 Poids des cerveaux :

Nos résultats lors de la mesure des organes immédiatement après le sacrifice, montré qu'il n'y a aucune différence significative ($p=0.2950$). Tandis qu'ont montré une légère baisse du niveau de poids des lapins traités par rapport aux témoins. (traité : $8,247 \pm 1,421$), (témoins : $9,630 \pm 0.5091$)

Lapins	Traité01	Traité02	Traité03	Témoin01	Témoin02
Poids	8.81g	6.63g	9.30g	9.99g	9.27g

Figure 18: Résultats des mesures du poids du cerveau chez le lapin

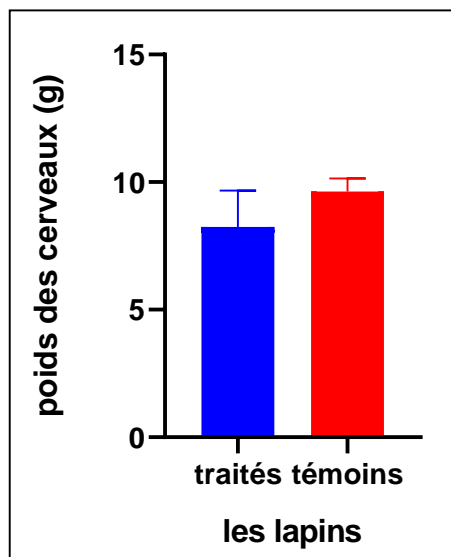


Figure 19: Les variations des poids des cerveaux des lapins traité par rapport des lapins témoins

2 Résultats des analyses biochimie :

Pour les analyses biochimie on a fait deux cas : dans le sang (Albumine oxydée, MDA libre et liée à la protéine, protéine carbonylé) et dans les tissu de cerveau (protéine totale, MDA libre et protéine carbonylé).

2.1 Résultats des analyses biochimie dans le sang :

2.1.1 .Albumine oxydée :

Les lapins traités avec le nitrite de sodium ont présenté des taux élevés d'albumine oxydée par rapport aux témoins dans le sang, donc, les résultats du dosage albumine oxydée montre il y a différent significative ($p=0.0491$), (**traité** : $0,2627 \pm 0,1407$), (**témoins** : $0,1737 \pm 0,05572$). Alor nous concluons trouve d'altérations sur la fonction protéines au niveau des plasmas. Où l'on peut dire le groupement SH est un occupée par une radical libre.

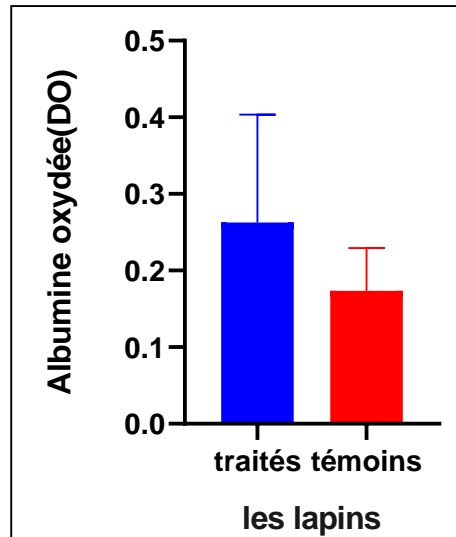


Figure 20: Comparaison la variation Albumine oxydée dans le sang entre les lapins témoins et traités.

2.1.2 MDA libre :

Les lapins traités avec le nitrite de sodium ont présenté des taux élevés de MDA par rapport aux témoins dans le sang, donc, les résultats du dosage MDA montre il y a différent significative ($p=0.0459$). (**traité** : $0,1133\pm 0,05919$) , (**témoins** : $0,05628\pm 0,02185$) . Alor nous concluons trouve d'altérations sur la fonction des lipides.

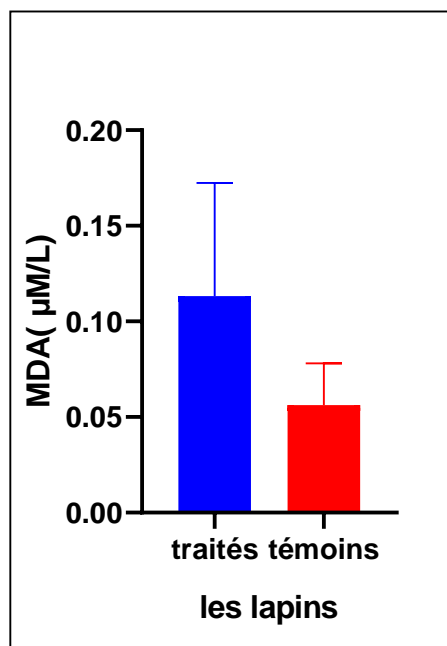


Figure21 : Comparaison la variation du MDA libre dans le sang entre les lapins témoins et traités.

Résultats

2.1.3 MDA liée à la protéine :

Les lapins traités avec le nitrite de sodium ont présenté des taux élevés de MDA liée à la protéine par rapport aux témoins dans le sang, donc, les résultats du dosage MDA montre il y a différent significative ($p=0.0370$). (**Traité** = $0,5171\pm 0,3816$)(**Témoins** : $0,1729 \pm 0,1942$)

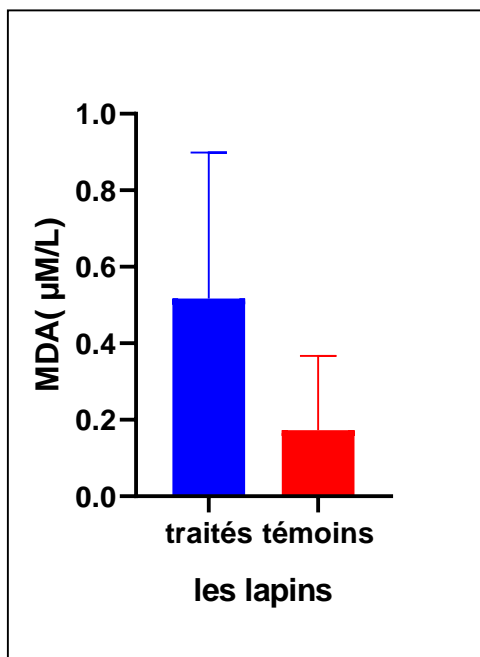


Figure22 : Comparaison la variation du MDA liée à la protéine dans le sang entre les lapins témoins et traités.

2.1.4 Protéines carbonylées :

Les lapins traités avec le nitrite de sodium ont présenté des taux élevés de Protéines carbonylées par rapport aux témoins dans le sang, donc, les résultats du dosage Protéines carbonylées montre il y a différent significative ($p=0.0330$),(**traité** : $0,0001610\pm 0.8713*10^{-5}$)(**témoins** : $0,0001480\pm 0.1225*10^{-4}$). Alor nous concluons trouve des composés carbonylés.

Résultats

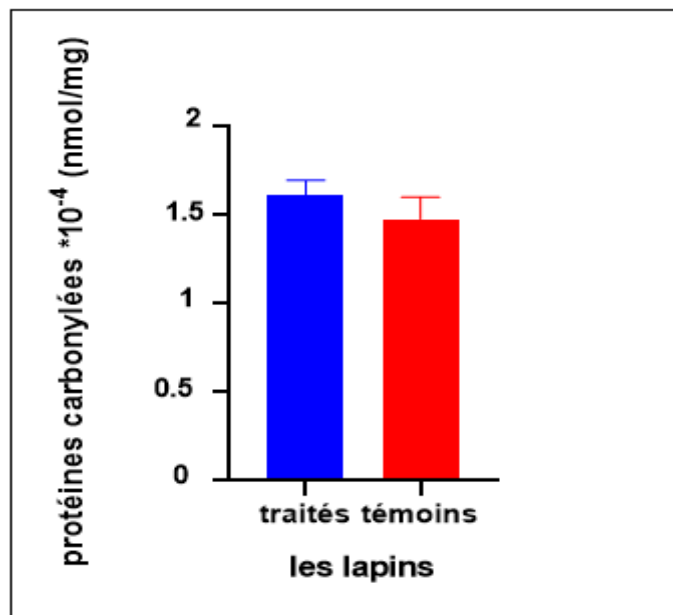


Figure 23: Comparaison la variation protéines carbonylées dans le sang entre les lapins témoins et traités

2.2 Résultats des analyses biochimie dans le tissu cérébral:

2.2.1 Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford :

Les résultats de l'analyse des protéines totale dans le cerveau de chacun des lapins traité et témoin ont montré qu'ils sont similaires d'une certaine manière, il montre qu'il n'y a aucune différence significative ($p=0.8017$), (**traité** = $2,464 \pm 0,05170$; **témoins** $2,481 \pm 0,1337$) ce qui indique que les protéines du tissu cérébral n'ont pas été affectées par la dose de nitrite prise .Alors ; pas d'altération au niveau de protéines partirai de concentration.

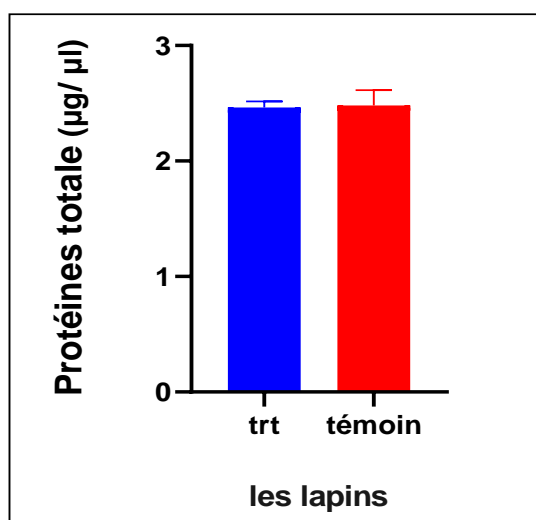


Figure 24: Comparaison la variation des protéines totales dans le tissu cérébrale entre les lapins témoins et traités

Résultats

2.2.2 MDA libre :

Les lapins traités avec le nitrite de sodium ont présenté des taux élevés de MDA par rapport aux témoins dans le tissu cérébrale, donc, les résultats du dosage MDA montre il y a différent significative ($p=0.0302$), (traité : $0,1686 \pm 0,07130$) ; témoins : $0,07019 \pm 0,007772$) il y a une altération des lipides.

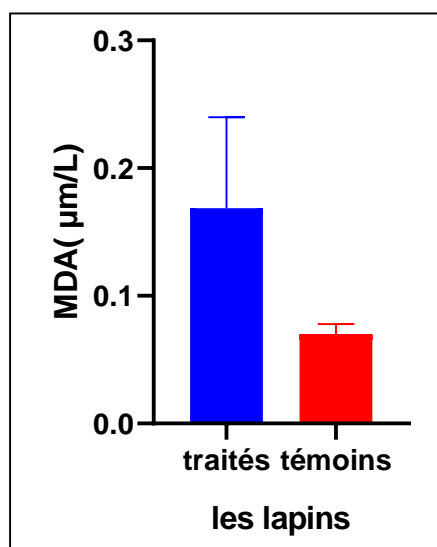


Figure 25: Comparaison la variation du MDA libre dans le tissu cérébrale entre les lapins témoins et traités.

2.2.3 Protéines carbonylées :

Les lapins traités avec le nitrite de sodium ont présenté des taux élevés de Protéine carbonylé par rapport aux témoins dans le tissu cérébrale, donc, les résultats du dosage Protéine carbonylé montre il y a différent significative ($p=0.0301$) (traité : $1,278 \cdot 10^{-3} \pm 0,2423 \cdot 10^{-4}$) (témoins : $0,7967 \cdot 10^{-4} \pm 0,2138 \cdot 10^{-4}$), Alor nous concluons trouve une fonction carbonylée.

Résultats

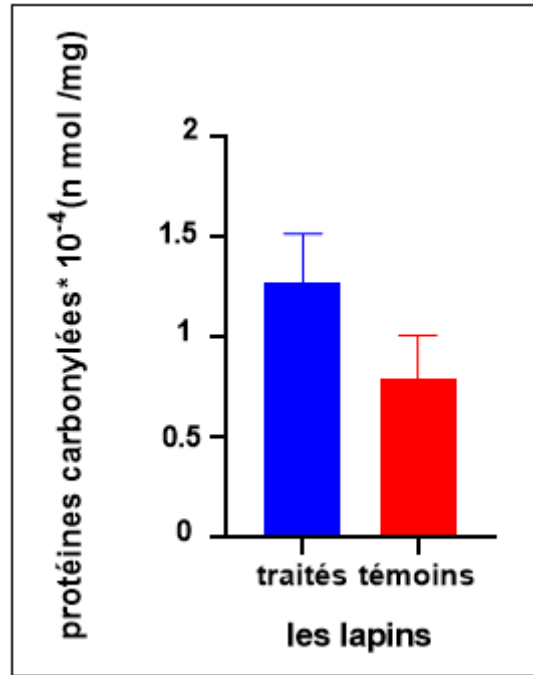


Figure26: Comparaison la variation protéines carbonylées dans le tissu cérébral entre les lapins témoins et traités

Résultats

3. Résultats des coupes histologiques :

3.1.1 Cortex cérébral chez témoins :

Les résultats de l'observation microscopique du cortex cérébral de lapins sains ont montré une forme normale sans déchirure ni lésion tissulaire.

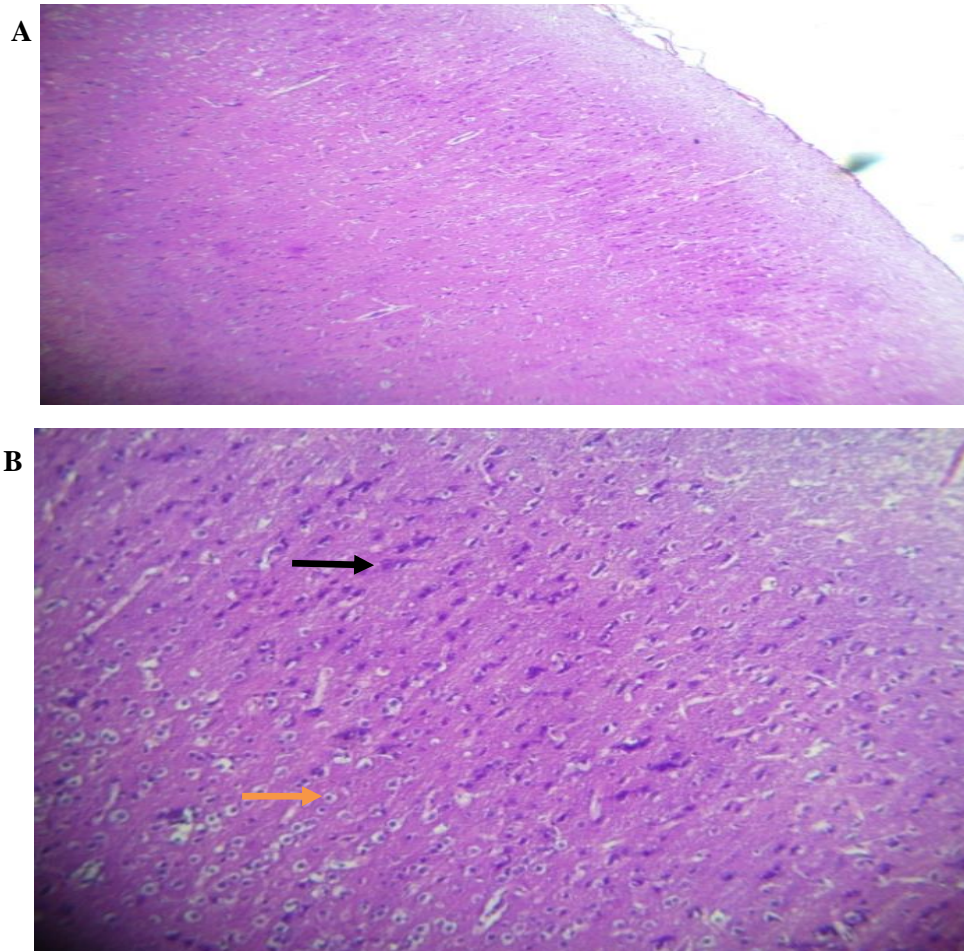


Figure 27: Structure histologique du cortex cérébral chez lapin témoins ; Coloration HE ; (A) faible grossissement, (B) fort grossissement. ,

Flèche noire : les neurones, Flèche orangé : cellules gliales.

3.1.2 Cortex cérébral des traités :

Concernant la forme du cortex cérébral des lapins traités au nitrite de sodium, on remarque des dommages et des ruptures au niveau du tissu cérébral, et une inflammation de vaisseau sanguin.

Résultats

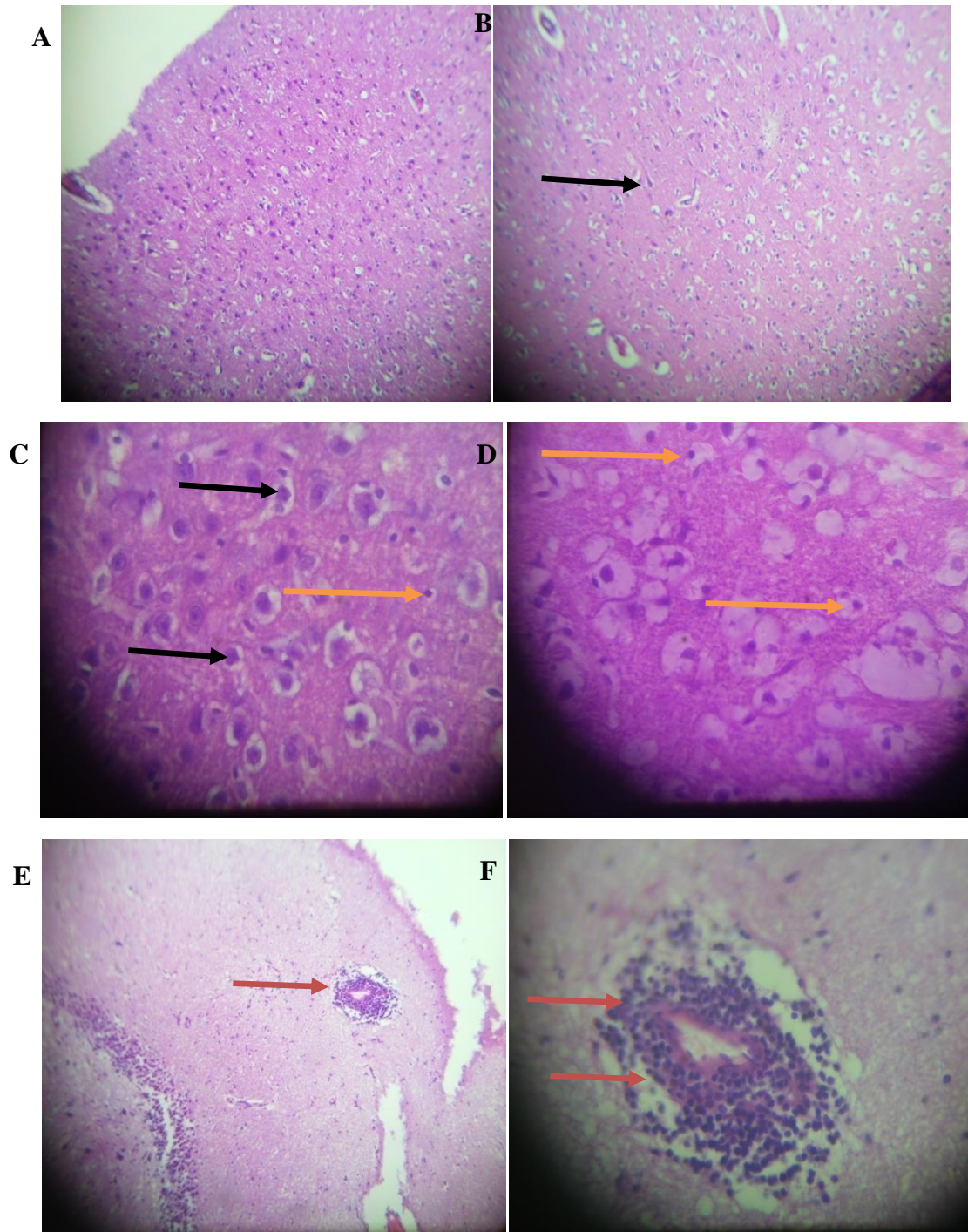


Figure 28: Structure histologique du cortex cérébral chez lapin traité ; Coloration HE ; (A), (B) et (E) faible grossissement, (C), (D) et (F) fort grossissement.

Flèches noire : les neurones, **Flèches orangé** : cellules gliales. **Flèches rouge** : Inflammation de vaisseau sanguin.

Résultats

3.2.1 Hippocampe chez les lapins témoins :

L'observation microscopique de l'hippocampe des lapins témoins a montré des tissus normaux, où il y a un vaisseau sanguin, des neurones et cellules gliales.

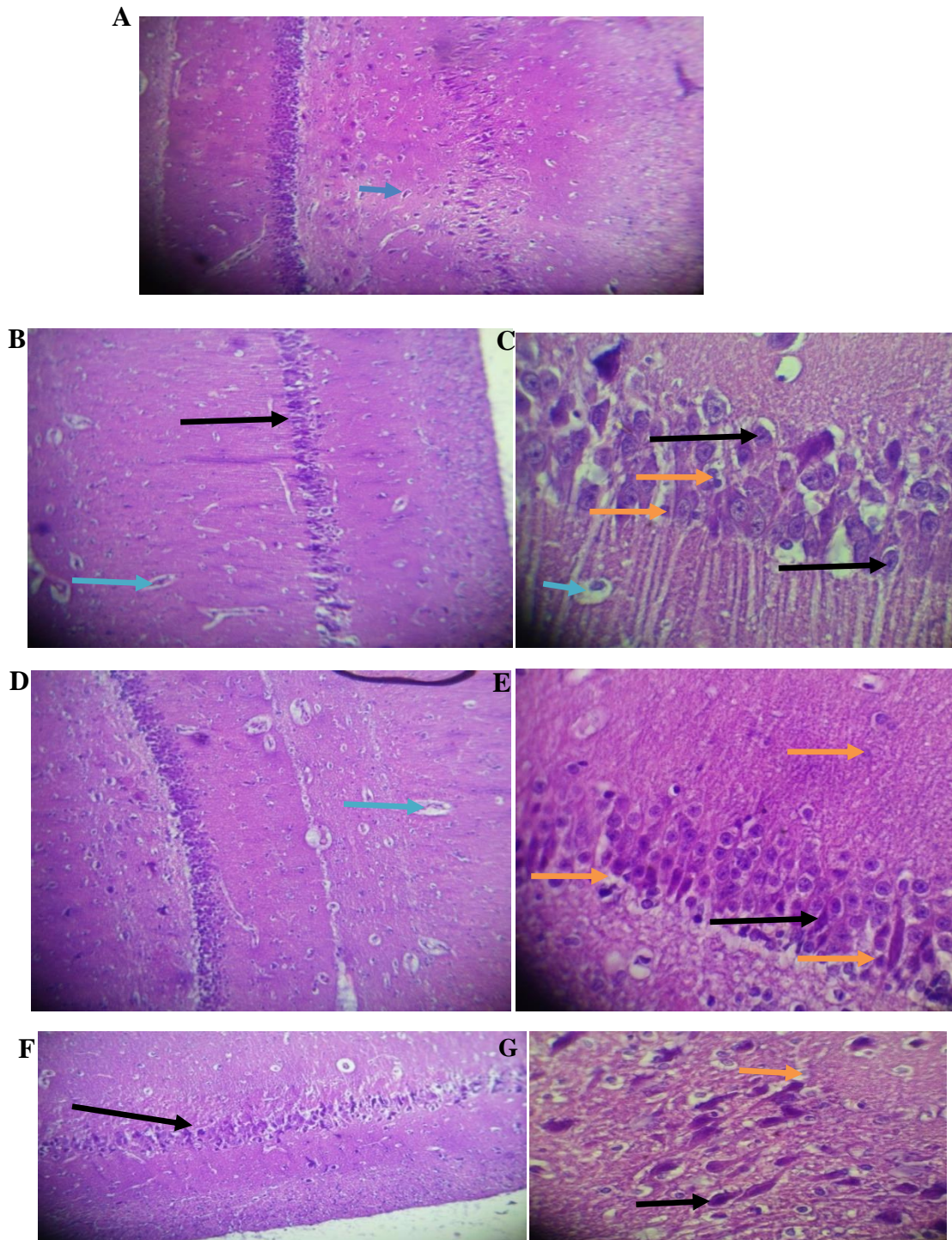


Figure 29: Structure histologique de l'hippocampe chez lapin témoins ; Coloration HE ; (A), (B), (D) et (F) faible grossissement, (C), (E) et (G) fort grossissement.

Flèches bleu : vaisseau sanguin, **Flèches noire** : les neurones, **Flèches orangé** : cellules gliales.

Résultats

3.2.2 Hippocampe chez les lapins traité :

L'observation microscopique de l'hippocampe du lapin traité a montré qu'il y a un foyer de dégénérescence et nécrose des neurones et montre quelques cellules gliales également avec des noyaux vésiculaires.

Résultats

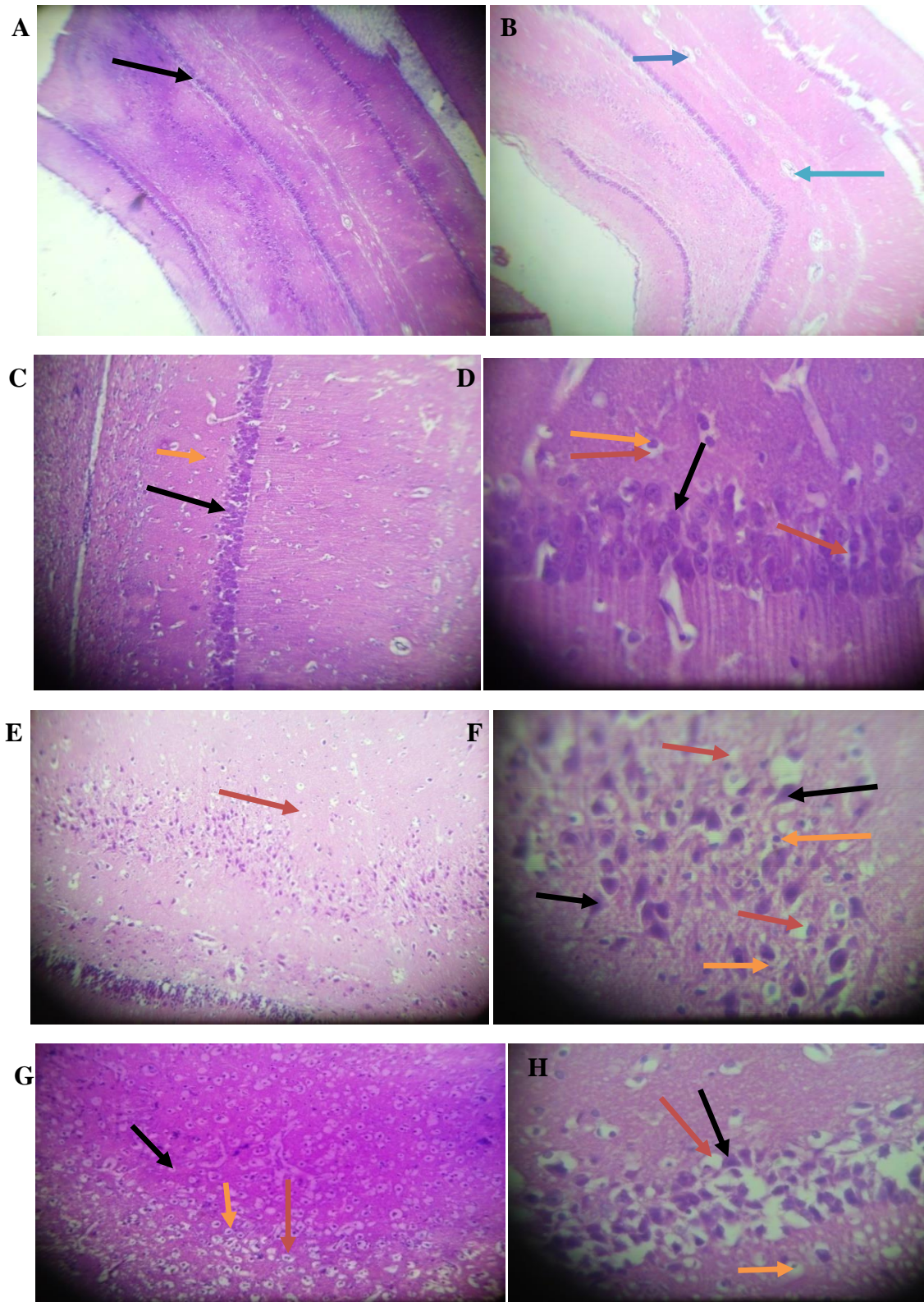


Figure 30 : Structure histologique de l'hippocampe chez lapin témoins ; Coloration HE ; (A), (B), (E) et (G) faible grossissement, (C), (D), (F) et (H) fort grossissement.

Flèches bleu : vaisseau sanguin, **Flèches noire** : les neurones, **Flèches orangé** : cellules gliales, **Flèches rouge** : noyaux vésiculaires

Discussion

Discussion

Notre étude a été réalisée dans le but d'explorer les effets des taux élevés de nitrite de sodium sur les tissus cérébraux des lapins après un gavage de 100mg/kg de NaNO₂ durant six semaines. Cette évaluation a été réalisée au niveau sérique et tissulaire aussi bien sur le plan biochimique que sur le plan histologique; ceci étant fait en parallèle avec des lapins témoins n'ayant pas reçu de NaNO₂.

Le nitrite est une molécule toxique retrouvée au niveau de l'environnement et qui affecte la santé humaine et animale. Des travaux antécédents ont montré que l'administration de nitrite de sodium est susceptible d'induire des toxicités cellulaires et génétiques de manière dose-dépendante et qu'elle pouvait provoquer des perturbations d'ordre biochimique, agir sur l'équilibre oxydatif et antioxydant et pouvait également induire une méthémoglobinémie. De plus, le NaNO₂ provoquerait également des altérations histopathologiques (**El-Nabarawy et al., 2020**).

Nos résultats ont montré que les nitrites n'affectaient pas la croissance des lapins, car aucun changement pondéral de manière négatif n'a été relevé chez les lapins traités avec le NaNO₂ par rapport aux témoins. Les études antérieures sur le changement de poids après administration de NaNO₂ ont montré des résultats variables selon le modèle animal, la voie d'administration, la concentration des nitrites ainsi que la durée de traitement. Ainsi, les travaux de (**Jouini et Rahmani, 2020**) qui réalisée sur lapins de race néo-zélandais montré que l'analyse des résultats obtenus au que le lot traité par le nitrite de sodium seul et le lot traité par le nitrite de sodium et par le Tanakan n'ont pas subi un changement dans l'ensemble ni dans le poids total des animaux ni dans le poids du foie au cours de la période d'expérimentation. (**Miller et ses coll. 2021**) sont en accord avec nos résultats où aucun changement de poids corporel n'a été perçu chez des rats Sprague Dawley et des chiens Beagle après l'injection de NaNO₂ à raison de : ≤ 30 mg/kg pour les rats et 1-10 mg/kg pour les chiens (**Miller et al. 2021**). Par contre, une étude réalisée sur les souris traitée avec 0,055 mg/ml, 0,110 mg/ml et 0,220 mg/ml pendant 02 semaines a montré la présence d'une diminution du poids corporel des souris (**Zhang et al., 2017**).

De même, le poids du cerveau des lapins traités au nitrite de sodium n'était significativement différent de celui des témoins même s'il avait tendance à être inférieur à celui du cerveau des lapins témoins. Cette légère diminution est liée à une dégénérescence neuronale observées histologiquement au niveau de l'hippocampe et au niveau du cortex cérébral. Cette dernière est accompagnée d'une inflammation vasculaire.

Discussion

Dans ce travail, les résultats présentés ci-dessus ont montré que le nitrite était causé des altérations au niveau des lipides et des protéines. C'est ce que l'observation microscopique de la coupe histologiques également mis en évidence.

Au niveau des lipides, les résultats ont montré des taux élevés de MDA dans le sang aussi que lipides tissulaires, sur la base de ces données, nous avons conclu qu'il y a une peroxydation lipidique des échantillons. **en 2014, Özen et al** ont observé que les effets de la consommation à long terme de nitrite de sodium NaNO_2 (0, 10 et 20 mg/kg/jour) chez des souris albinos suisses provoqueraient une peroxydation lipidique dans le foie et les reins. et selon (**Bargnoux et al ., 2009**) montré que une élévation des marqueurs de la peroxydation lipidique, en particulier des aldéhydes comme les substances réagissant avec l'acide Thio barbiturique (TBARS pour thiobarbituric acide réactive substances). (**Gonchar et al.,2006**) aussi observé que l'administration aiguë de NaNO_2 (60 mg/kg) chez des rats Wistar a entraîné une augmentation de 34 % de la MetHb circulante dans le sang et une augmentation significative de la peroxydation lipidique dans le foie (56 %), le cœur (42 %) et l'encéphale (86 %). Les cibles de l'oxydation des lipides sont les acides gras polyinsaturés (AGPI). Du fait que l'oxygène peut exister sous deux états, un état fondamental (3O_2) et un état excité (1O_2), le processus d'oxydation des lipides peut se dérouler selon deux réactions différentes. L'une impliquant (3O_2), est une réaction en chaîne en trois étapes de radicaux libres (initiation par les radicaux libres, reproduction et terminaison), et l'autre impliquant (1O_2) est une réaction rapide avec addition directe d'oxygène aux doubles liaisons des acides gras. Les deux réactions conduisent à la formation d'hydro peroxydes comme produits primaires. Les hydro peroxydes se décomposent rapidement pour donner divers sous-produits tels que des radicaux libres de lipides qui contribuent à l'oxydation supplémentaire d'autres molécules telles que les protéines, et d'autres lipides. Des aldéhydes (MDA) sont également formés par la décomposition de l'hydro peroxyde. (**Cillard et al ., 2006**) Les aldéhydes (Malon dialdéhyde) produits au cours de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec les fonctions amines des lipides, des protéines et ainsi qu'avec les fonctions thiols des protéines. (**Sergent et al ., 2001**) Sur la base de l'interaction des protéines avec les aldéhydes, on peut dire qu'il existe des dommages oxydatifs au niveau des protéines, et c'est ce qui a été démontré par les taux élevés d'albumine oxydé dans le sang. Selon (**Benjamin G et al**) l'albumine, protéine circulant la plus abondante, présente une activité antioxydant très importante puisqu'elle présente de nombreux sites lui permettant de piéger des radicaux libres. Cette propriété vaut à l'albumine de subir d'importantes modifications oxydatives. Si les modifications structurales et

Discussion

fonctionnelles de l'albumine au cours d'un stress oxydatif prolongé n'ont pas toutes fait l'objet d'une description détaillée, l'albumine modifiée par l'ischémie encore appelée IM A (Ischémie modifiée Albumine), premièrement décrite lors d'épisode ischémiques du type syndrome coronarien aigu (SCA) ou infarctus du myocarde (IM), est aujourd'hui communément reconnue comme un marqueur du stress oxydant. Cette forme d'albumine est caractérisée par une capacité de liaison d'ions bivalents diminués, plus particulièrement le Co_2^+ . L'IM A est donc mise en évidence dans le plasma par mesure de la capacité de liaison de Cobalt en excès rapporté à la concentration plasmatique d'albumine. La concentration d'IM A est inversement proportionnelle à la concentration de Cobalt non lié à l'albumine et est le reflet de l'impact du stress oxydant dans le compartiment plasmatique. De nombreuses études ont mis en évidence ces dernières années l'augmentation de l'IM A dans des pathologies chroniques sujettes à un fort stress oxydant (diabète, athérosclérose. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes comme par exemple le non reconnaissance d'un récepteur par un ligand ou une perte d'activité enzymatique. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire. Les protéines modifiées par le stress oxydant présentent très certainement un rôle dans les mécanismes physiopathologiques impliqués dans des pathologies chroniques comme le diabète. Et aussi que les taux élevés des protéines carbonylées au niveau du sang et tissu, de **(Tezel *et al.* , 2005)** ont noté que la formation de carbonyles protéiques est un marqueur majeur de l'oxydation des protéines, tandis que l'étude de **(Bargnoux *et al.*, 2009)** qui montrés l'oxydation directe des acides aminés peut également générer des composés carbonylés. Contrairement aux protéines totales dans les tissus, qui présentaient des taux similaires chez les lapins traités et témoins, on peut dire que les protéines totales n'ont pas été affectées par le NaNO_2 . Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). **(fonc J *et al.* ;2007)**. Selon **(Bargnoux *et al.*, 2009)** Les protéines peuvent être modifiées directement par espèces réactives de l'oxygène conduisant ainsi à l'oxydation des acides aminés. Par exemple, les acides aminés possédant une fonction thiol (cystéine, méthionine) vont donner des sulfoxydes et pouvoir

Discussion

former des ponts disulfures. L'oxydation directe des acides aminés peut également générer des composés carbonylés. Concernant l'étude histologique au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe, qui a montré la présence de dégénérescence et nécrose des neurones et une inflammation de vaisseau sanguin. Nous concluons que le nitrite affecte le cerveau. Dans une étude (**Ribeiro et al., 2017**) réalisée en administrant 60 mg/kg de NaNO₂ à 10 rats Wistar âgés de 3 mois pendant 15 jours consécutifs, des dommages ont été détectés dans l'hippocampe et le cervelet. Comme le montre l'étude de (**Zaidi, 2010**) une heure après l'injection de nitrite de sodium (75 mg/kg) sous-cutanée des rats albinos mâles adultes hypoxiques, pesant 180-200 g montré une dégénérescence de l'hippocampe et du gyrus denté.

Le nitrite est absorbé par voie orale puis transféré dans l'estomac, dans un milieu acide et par des voies non enzymatiques, se décomposant pour former des oxydes nitriques (NO) et d'autres oxydes d'azote bioactifs, qui régulent d'importantes fonctions physiologiques. (**Lundberg et al., 2008**). Le reste de cet ion est absorbé par l'intestin grêle et excrété dans l'urine, bien qu'une partie soit transférée dans la circulation sanguine. dans des érythrocytes incubés avec du nitrite de sodium dans des conditions isotoniques, les ions nitrite réagissent avec l'hémoglobine. Ils forment un complexe avec l'hème, déplacent l'oxygène et provoquent l'oxydation de Fe²⁺ en Fe³⁺. (**Bonnard .N et al, 2021**). La méthémoglobinémie par injection de NaNO₂ est un agent puissant qui favorise la formation de radicaux libres. Les actions métaboliques des espèces réactives de l'oxygène sont associées à une grande variété de réactions oxydatives toxiques. Ce processus comprend : l'oxydation des graisses, les modifications oxydatives des protéines, l'inactivation des protéines et des enzymes membranaires et la dérégulation du système de défense antioxydant du corps. (**Ribeiro et al, 2017**).L'effet du nitrite sur l'hémoglobine est réversible. La méthémoglobine est rapidement et complètement réduit en hémoglobine par la NADH-cytochrome-b5 réductase (NADH-méthémoglobine réductase) des érythrocytes (N Bonnard et al 2021); Il est également réduit en NO et passe par de nombreuses voies enzymatiques et non enzymatiques entraînant la génération d'autres oxydes d'azote (N₂O₃) et (NO₃⁻). (**Lundberg et al., 2008**)

Conclusion

Conclusion

Le nitrite de sodium est un composé faisant partie de la famille des nitrites il est utilisé comme additif alimentaire, un sous-produit lors de la synthèse industrielle de l'acide nitrique, il s'agit donc plus précisément du sel de l'acide nitreux combiné au sodium. Sa formule chimique est NaNO_2 .

Notre étude vise à évaluer l'effet du taux élevé du nitrite de sodium sur le cerveau de lapin, les effets ont été observés des analyses biochimique et l'étude histologique.

Sur la base des résultats obtenus on a observé :

- ❖ Du taux élève du MDA au niveau du sang et tissu du lapin traité par apport au témoin montre une différence significative c'est-à-dire une altération à la fonction des lipides
- ❖ Du taux élève des protéines analysées ; l'albumine au sang et protéines carbonylées au niveau du sang et tissu, contrairement le taux des protéines totales dans le tissu n'est pas affecté.

Concernons L'étude histologique on a trouvé présence d'une nécrose et dégénérescence au l'hippocampe et cortex cérébrale accompagnée d'une inflammation des vaisseaux sanguins.

En fin ; il ressort de cette étude que le nitrite de sodium possède un stress oxydant qui est reflété par la peroxydation des lipides et par l'oxydation des protéines. Ce stress aurait pour conséquence des altérations cellulaires au niveau du tissu cérébrale induisant la mort des neurones et une inflammation locale.

Bibliographie

B

- **Bargnoux A-S, M Morena, S Badiou, A-M Dupuy, B Canaud, J-P Cristol.(2009).** Stress carbonylé et modifications oxydatives des protéines au cours de l'insuffisance rénale chronique. Article. 67(2) ,153-8
- **Barone R, C. Pavaux, P.C. Blin et P. (1973) .**Atlas d'Anatomie du Lapin. Livre. (Volume 219 p.-169 pl). Paris : Masson & Cie
- **Bear MF. , Barry W. Connors, Michael A, Paradiso.(2016).** NEUROSCIENCES à la découverte du cerveau. Livre. (Volum 21cm x 30cm).Pardel. Pp: 988.
- **Bonnard .N, M.T Brondeau, D. Jargot, D. Lafon, F. Marc, S. Miraval, N. Nikolova-Pageau, S. Robert, O. Schneider. avec la collaboration de N. Carabin et V. Matera. (2021).** Nitrite de sodium. Fiche toxicologique n°169, 231-555-9

C

- **Camirand. (2019).**Axe Cerveau-Intestin-pelvis et Ostéopathie. Livre. (Approche Intégrative du Stress.(Volume 170 x 240 mm).: Elsevier Masson
- **Cillard Josiane, Cillard Pierre.(2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. Article. 13 (1), 24-29
- **Crowe William, Christopher T. Elliott and Brian D. Green. (2019).** A Review of the In Vivo Evidence Investigating the Role of Nitrite Exposure from Processed Meat Consumption in the Development of Colorectal Cancer). Article. 5;11(11), 2673
- **Chazelas.E,F.Pierre, N.Druesne-Pecollo,Y.Essedik,F.Szabo DeEdelenyi ,C.Agaesse,A.DeSa,R.Lutchia,S.Gigandet,B.Srour,C.Debras,I.Huybrechts,C.Julia,E.KesseGuyot,B.Allès,P.Galan,S.Hercberg,M.Deschasaux,M.Touvier.(2022).** Nitrites et nitrates provenant d'additifs alimentaires et de sources naturelles et risque de cancer : résultats de la cohorte NutriNet-Santé. Article. 36(1), S17.
- **Corriveau J e. (2009).** Étude des concentrations toxiques de nitrite dans les cours d'eau d'un bassin versant agricole. Thèse de doctorat en Sciences de l'eau, Université du Québec.
- **Cosby1 K, Kristine S Partovi, Jack H Crawford, Rakesh P Patel3, Christopher D Reiter, Sabrina Martyr, Benjamin K Yang,Myron A Waclawiw , Gloria Zalos1, Xiuli Xu6, Kris T Huang7, Howard Shields6, Daniel B Kim-Shapiro, Alan N Schechter, Richard O Cannon III1,8, and Mark T Gladwin. (2003).**Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. Article. 9,1498–1505

E

- **Eytcheson S & Gerald A. LeBlanc.(2018).** Hemoglobin Levels Modulate Nitrite Toxicity to *Daphnia magna*. Article. 8, 7172.
- **El-Nabarawy NA. & Ahmed S. Gouda & Mohamed A. Khattab & Laila A. Rashed.(2020).** Effects of nitrite graded doses on hepatotoxicity and nephrotoxicity, histopathological alterations, and activation of apoptosis in adult rats. Article. 27, 14019–14032

G

- **Gonchar O, I Mankovskaya, E Klyuchko.(2006).** Role of complex nucleosides in the reversal of oxidative stress and metabolic disorders induced by acute nitrite poisoning. *Indian Journal of Pharmacology*. Article. 38 (6), 414.

H

- **Haberer. S., A. Assouline , J.-J. Mazon.(2010).** Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : encéphale et hypophyse. Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: Brain and hypophysis. *Research Gate*. Article. 4(4–5) ,263-268.
- **Haleng. J, J. Pincemail , J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle .(2007).** Le stress oxydant. *ORBI*. Article. 62 (10), 628-38.

J

- **Jouini et Rahmani, (2020).** Modulation pharmacologique de la réponse hépatique induite par des nitrites chez les lapins. Mémoire de master 2 biochimie appliquée.

K

- **Kahle. W • Michael Frotscher.(2015).** Atlas de poche anatomie. Livre. (Volume 3). : Lavoisier.

L

- **Lahmar-Belguendouza. k , H. Belguendouza, D. Hartanib, O.S. Lahlou-Boukoffac, Z. Djerabaa, A. Lammalia, C. Touil-Boukoffaa.(2009).** Effets délétères des dérivés stables du monoxyde d'azote, marqueur inflammatoire des uvéites, sur les différentes tuniques de l'œil de bœuf en culture. *Science Direct*. Article. 32(4), 247-256.

- **Lundberg . JO, Eddie Weitzberg , Mark T, Gladwin.(2008).** The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Article.7, 156–167.

M

- **M. MONGENS. (2013).** Origine et conséquences du stress oxydant. Thèse Pour le doctorat vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire D'ALFORT.
- **M. M de Mecca, E.G. Diaz, J.A. Castro. (2002).** Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. Article. 136(1), 1-8.
- **Miller L.a, Charles D. H´ebert b, Sheila D. Grimes b, James S. Toomey b, Joo-Yeun Oh c, Jason J. Rose d, Rakesh P. Patel.2021.)** Safety and toxicology assessment of sodium nitrite administered by intramuscular injection. Article. 429, 115702.

N

- **Neth. M.R, Jennifer S Love , B Zane Horowitz , Michael D Shertz , Ritu Sahni , Mohamud R Daya.(2020).** Fatal Sodium Nitrite Poisoning: Key Considerations for Prehospital Providers. Article. 25(6), 844-850.
- **Nie M, Zhenlun Li . (2020).** Bioprocess of nitrite accumulation in water - a review .Article. 36(8), 1493-1503.

O

- **Özen H , Ufuk Kamber , Musa Karaman , Süleyman Gül , Emine Atakişi , Kadir Özcan , Onur Atakişi.(2014).** Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations ochronicsodium nitrite toxicity in mice. Article. 66(8), 367-75.

R

- **Ribeiroa.MC, Thiago dos Santos Bezerraa , Alúzio Carlos Soaresa, Raphael Boechat-Ramosa, Fabiana Pirani Carneiroa , Leonora Maciel de Souza Viannaa, Lilian Rosana Ferreira Farob, Mônica Valero da Silvaa, Matheus Papa Vieiraa, Isabelle de Oliveira Monteiroa, Vania Moraes Ferreiraa,(2017).** Hippocampal and cerebellar histological changes and their behavioural repercussions caused by brain ischaemic hypoxia experimentally induced by sodium nitrit. Article. 14 (332), 223-232.

S

- **Sandarine Fleur –Chébékoué. (2008).** Évaluation du risque cancérigène associé à la contamination de l'eau potable de puits municipaux par les nitrates/nitrites dans certaines régions rurales du Québec. Mémoire de maîtrise ès sciences en santé environnementale et santé au travail .Université de Montréal.
- **Scanlan. RA. (1983).**Formation and occurrence of nitrosamines in food. Article. 43(5),2435-2440
- **Sergent .O. B.Griffon P.Cillard J.Cillard.(2001).** Alcool et stress oxydatif. Article. 49(9), 689-695.

T

- **Takfarinas Medani, Gérard Sou et M, Zhuoxiang Ren.(2016).**contribution a l'amélioration du modèle des éléments finis pour la résolution du problème direct en électroencéphalographie. Thèse électronique. Université Pierre et Marie Curie.
- **Tezel G; Xiangjun Yang; Jian Cai.(2005).** Proteomic Identification of Oxidatively Modified Retinal Proteins in a Chronic Pressure-Induced Rat Model of Glaucoma.Article. 46, 3177-3187

V

- **Vuillier. F, E. Medeiros de Bustos , L. Tatu.(2010).**Organisation fonctionnelle du cervelet : approche neuro-anatomique. Article. 167(5), 361-369

W

- **Wang L, Luis E.F. Almeida, Sayuri Kamimura, Jack H. van der Meulen, Kanneboyina Nagaraju, Martha Quezado, Paul Wakim, Zenaide M.N. Quezado, 2018.**The role of nitrites in muscle function susceptibility to contraction injury and fatigability in sickel cell mice. Article. 80(1), 70-81.

Z

- **Zeenat Fatima Zaidi.2010.** Sodium nitrite-induced hypoxic injury in rat hippocampus. Article. 26 (3), 532-537
- **Zhang ZQ, Lin L, Zhang C Z.2017.**Influence of sodium nitrite exposure on sulfhemoglobin and hydroxyl radicals in mice. Article. 35(5), 366-368.

Les références web :

- [1]. <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0917-2.c015>
- [2]. https://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_05/i_05_cr/i_05_cr_her/i_05_cr_her.html
- **Benjamin G. Chousterman et Didier Payen.** L'albumine en anesthésie-réanimation Article. https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/L_albumine_en_anesthesie-reanimation.pdf
- **CMC : (CANADIAN MEAT COUNCIL) = CVC :** association commerciale basée à Ottawa. Journal. <https://cmc-cvc.com/fr/accueil/>
- **Dréo.J.** La chimie en agriculture : les tensions et les défis pour l'agronomie. Article. <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1051/978-2-7598-0917-2.c015/html>
- **INSPQ :** Centre d'expertise et de référence en santé publique. Journal. <https://www.inspq.qc.ca>
- **Jeuge S, Martine Carlier, Jean-Luc, Vendevre, Gilles Nassy.(2012).**l'oxydation des produits carnés : Méthodes de mesure et moyens de maitrise. Rapport d'étude, Pôle viandes et charcuteries. Livre.
https://raw-feeding-prey-model.fr/wp-content/uploads/2019/10/fichiers_jeuge_oxydation.pdf
- **Woessner MN, Luke C. McIlvenna, Joaquin Ortiz de Zevallos, Christopher J. Neil, and Jason D. Allen. (2017).** Dietary nitrate supplementation in cardiovascular health: an ergogenic aid or exercise therapeutic? Journal. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00414.2017>

ANNEXES

Annexex01 : matérielle de laboratoire

L'appareille :

- Centrifugeuses
- Spectrophotomètres
- Etuve
- Vortex
- Bain marie
- Agitateurs
- Réfrigérateur
- Balance précisé
- Sonificateur
- Microtome
- plaque chauffante
- appareil d'inclusion en paraffine
- Microscope optique

Les instruments:

- Les tubes + support
- Micropipettes
- L'embout plastique micropipettes
- Pissette
- Poire
- Bécher
- Fiole
- Pipette garduée
- Pince
- Entonnoire
- Lame et lamelles
- Lame silanisé
- Histo-cassette
- barre de Leuckart
- Trousse de dissection