PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel biologique

Nous avons utilisées des organes conservées a température (- 80°C), au niveau de laboratoire de l'université LArbi Tébessi de Tébessa . nous avons faires des expériences sur 20 cerveaux congelée des rats de ***Rattus rattus*** (blancs mâles) de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevages El Kouba, Alger) et traité au niveau de notre université l'année passée de Gasmi Salim.

I.1.2. Matériel chimique : Dans ce travail, nous avons utilisé la déltamethrine (pesticide) de dose 360 ppm/jr et le zinc à dose de 70 ppm/jr pour le traitement des rats.

I.2. Méthodes

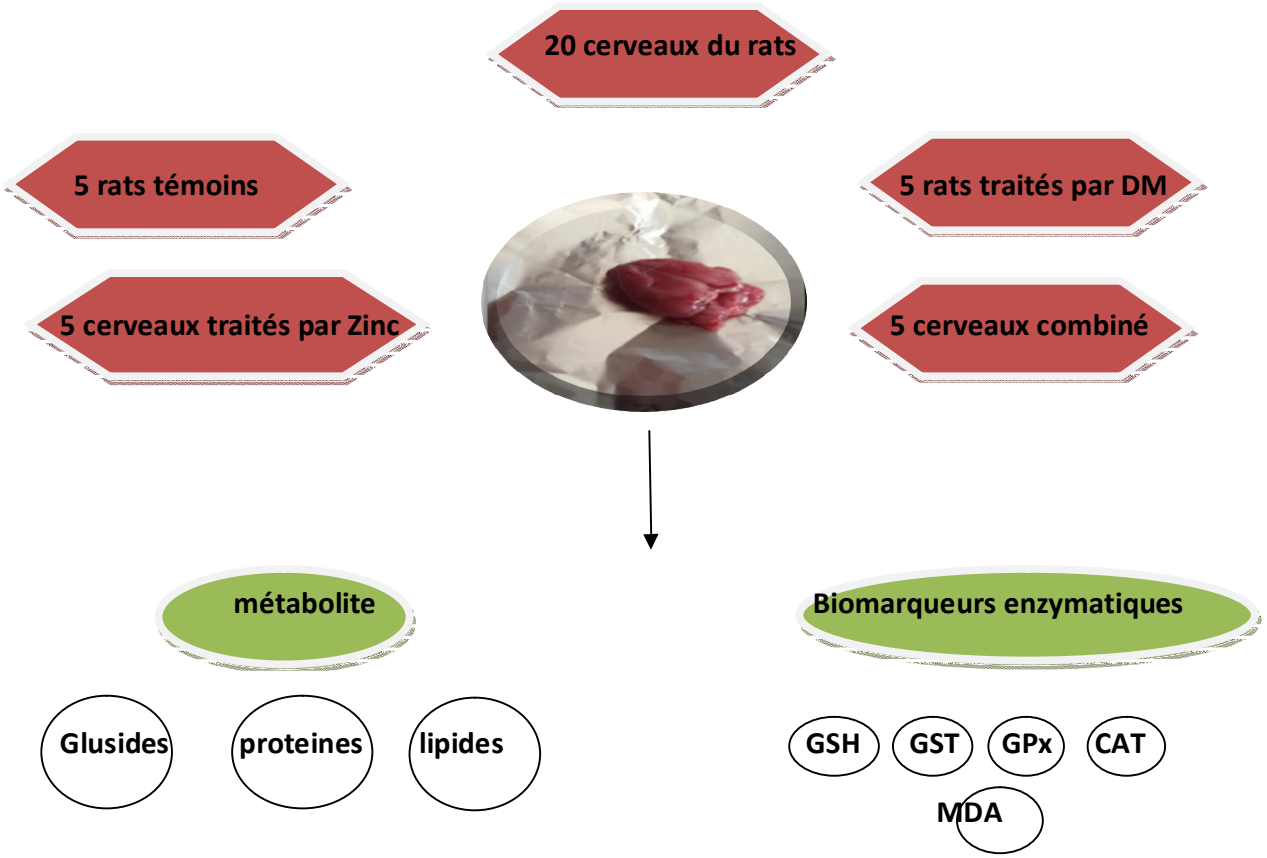


Figure 12: Protocole expérimental

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

ochimiques et enzymatiques

II.1. Dosage des métabolites

A. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de (**Bradford, 1976)** qui utilise le bleu brillant de coomassie (BBC) comme réactif et (B.S.A) comme standard. La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de B.S.A. (1 mg/ml) et le B.B.C (conservation environ 21 jours à 4°C) qui se prépare comme suit :

- ✓ 100 mg de BBC + 50 ml d'éthanol Agitation pendant deux heures.
- ✓ 100 ml d'acide orthophosphorique sont alors ajoutés et le tout est complété à1000 ml avec de l'eau distillée.
- ✓ Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote (100m l).
- ✓ Les absorbances ont été lue à une longueur d'onde de 595 nm.

B. Dosage des glucides

Le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de **(Duchateau et Florkin, 1959)**. Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard

La méthode consiste à :

- ✓ additionner à une fraction aliquote de 100 µl de surnageant des différents échantillons, 4 ml de réactif d'anthrone.
- ✓ chauffager le mélange dans un bain marie (80°C pendant 10 min) une coloration verte se développe.
- ✓ L'intensité de la coloration mesurée à une longueur d'onde de 620 nm .

C. Dosage des lipides

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de **(Goldsworthy et *al.*, 1972)**. Cette méthode utilise la vanilline comme réactif (0,38 g de vanilline, 195 ml d'acide orthophosphorique à 85% et 55 ml d'eau distillée) et une solution mère de lipides (2,5 mg/ml) comme standard .

Et additionné 1 ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les tubes sont chauffés un bain marie (100°C pendant 10 min); de chaque tube 200 µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5 ml de réactif.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

curité à une longueur dôonde de 530 nm.

II.2. Dosage du biomarqueur du stress oxydatif

A. Malonaldéhyde (MDA)

Les malondialdéhydes (MDA) sont dosé selon la méthode de **(Buege and Aust, 1984)** Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre lôacide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) dans un milieu acide et chaud(100°C) en donnant un produit rouge brun dont lôintensité de la coloration est mesurée à une longueur dôonde de 530 nm.

- **Protocole expérimental :**

- Prélever 375 µl de surnageant.
- Ajouter 150 µl de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- Ajouter 375 µl de solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%).
- Agiter et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min.
- Prélever 400 µl de surnageant.
- Ajouter 80 µl dôHCl 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM).
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes.
- Lue La densité optique à λ = 530 nm.

Lôabsorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés. La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L) :

$$[C](\text{nmol/mg de protéines}) = \frac{\square\square \times \square\square}{\square\square \times \square\square \times \square\square \times \square\square}$$

C : la concentration en nmole/mg de protéines

DO : densité optique lue à 530 nm

$\square$: Coefficient dôextinction molaire du MDA = **1,56.10**

L **:** Longueur de la cuve utilisée (1cm).

X **:** concentration de lôextrait en protéines (mg/ml)

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

83).

B. dosage du glutathion (GSH):

- Principe de la méthode :

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de la densité optique de lôacide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de lôacide 5,5ô-dithio-2-nitrobenzoïque (réactif dôEllman ou DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, lôhomogénat doit subir une déprotéinisation par lôacide sulfosalicylique à 0,25% afin de protéger les groupements (-SH) du glutathion (**Weeckbeker et Cory, 1988**).

- **Protocole expérimental :**

- Prélever 0,8ml de lôhomogénat auquel y ajouter 0,2ml dôune solution dôacide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à la vitesse de 1000tours/min pendant 5minutes.
- Prélever 0 ,5 de surnagent
- Ajouter au mélange : 1ml de tampon Tris-EDTA (0,02M dôEDTA pH = 9,6), 0,025ml de DTNB et 0,5ml du surnageant.
- Laisser reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément.
- Mesurer les absorbances à 412 nm contre le blanc

La concentration du glutathion est obtenue après application de la formule suivante

$$\text{GSH [M GSH/mg des protéines]} = \frac{\square\,\square \times \square \times \square,\square\square\square}{\square\square\square\square\square \times \square,\square \times \square,\square}$$

DO : la densité optique

1 : Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation(0 ,8 ml de lôhomogénat+0,2ml de lôacide salicylique).

1,525 : Le volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du Surnageant (0,5ml surnageant + 1ml Tris-EDTA + 0,025ml DTNB).

13100 : Coefficient dôabsorbance (concernant le groupement (ï SH) à 412 nm).

0,8 : Le volume de lôhomogénat.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

dans un 1,25ml.

II.3. Dosage des paramètres de stress oxydatif

A. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **(Flohe and Gunzle, 1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence du glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de GPx selon la réaction suivante :

$$H_2O_2 + 2\,GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2\,H_2O$$

- **Protocole expérimental :**

- Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant) ;
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM) ;
- Ajouter 0.2 ml de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) ;
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min ;
- Ajouter 0.2 ml de H_2O_2 (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes ;
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction ;
- Mettre le mélange dans un bain de glace pendant 30 minutes ;
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes ;
- Prélever 0.48 ml de surnageant ;
- Ajouter 2.2 ml de solution tampon TBS ;
- Ajouter 0.32 ml de DTNB (1mM) ;
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{activité enzymatique} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}}{\text{DO étalon}}$$

- DO échantillon : Densité optique de l'échantillon.
- DO étalon : Densité optique de l'étalon.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

ut (GSH).

B. Dosage de l'activité du glutathion-S-transférase (GST)

- **Principe de la méthode**

La mesure de l'activité de GST, consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du (CDNB) 1-chloro, 2.4-dinitrobenzène, qui réagit facilement avec des glutathion sous l'action de nombreuses forms de GST. La réaction de ces deux produits entraîne la formation d'une nouvelle molécule qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.

- **Protocole expérimental**

La méthode utilisée dans cette étude pour doser le GST est celle de **(Habig et *al*.,1974)** celle-ci consiste à faire agir le GST contenue dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6.5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 15 minutes durant 1 minute à une longueur d'onde de 340 nm. Selon les étapes suivantes :

- ✓ Les échantillons sont homogénéisés dans un 1ml de TP (0,1 M, PH=6)
- ✓ Centrifuger à 1400 tours/min.
- ✓ Récupérer le surnageant comme source d'enzyme.
- ✓ Prélever 200µl de surnageant et ajoute 1,2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM).
- ✓ Le blanc contenant 200µl d'eau distillé remplaçant la quantité de surnageant.

$$\text{L'activité de la GST} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc}}{9{,}6\text{mg de protéine}}$$

DO échantillon/min : densité optique de l'échantillon par minute

DO blanc/min : densité optique du blanc par minute

9,6 : coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en $mM^{-1}.cm^{-1}$

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

atalase (CAT)

Lôactivité du catalase est déterminée selon la méthode de **(Cakmak et Horst, 2003)** Le principe repose sur la disparition de lôH_2O_2 à 25°C par la présence du catalase.

- **Protocole expérimental**

✓ On prélève 100µl de lôextrait enzymatique brute + 500µl de péroxyde dôhydrogène H_2O_2 à 0,3 ml

✓ On ajoute 2850µl de TP (50mM, PH= 7,2)

✓ La réaction est déclenchée par lôaddition dôeau oxygénée. Lôactivité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

La réaction est contrôlée par une lecture continue pendant 15 minutes durant 1 minute à une longueur dôonde à 240 nm.

Lôactivité de CAT (M H_2O_2/min/m protéines) $= \frac{\Delta \square\square.\square\square}{\square\square.\square.\square\square}$

$\Delta\square\square$: Variation de la densité optique par minutes en fonction du temps

$\square$: Coefficient dôextinction du H_2O_2 (3900 $\mu M^{-1}.Cm^{-1}$. L)

L : largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1cm)

X : quantité des protéines en mg/ml

Vt : volume totale du mélange réactionnel en ml

Ve : volume de lôextrait enzymatique en ml

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.
Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features