I. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Pour notre expérimentation, nous avons choisi de travailler sur les lapins de la race (*Oryctolagus cuniculus*), prouvent de l'animalerie de chalghom El-aid wilaya de Mila.

1.2. Matériel chimique

Dans ce travail, nous avons utilisé l'oxyde de fer, sous forme de poudre coloré rouge soluble dans l'eau distillé.



Figure (21): Les solutions de produit (Fe_3O_4) **(PP).**

2. Méthodes d'élevage et traitement

2.1. Description et élevage

Pour la réalisation de notre expérimentation, nous avons pris comme un modèle biologique 20 lapin (*Oryctolagus Cuniculus*). Tous les lapins sont pesés et leur poids voire entre 2.7kg et 4.8kg. Ils ont logés individuellement dans des cages métalliques pendant une période d'adaptation de 15 jours, ils sont devisés en 04 lots de 05 individus. L'alimentation des lapins était à base d'alimentation artificielle spécifique pour les lapins.



Figure (22) : L'élevage du lapin**. (PP)**

2.2. Mesure de poids : La mesure de poids est effectuée sur les lapins tout jour pendant la durée d'élevage, soit au cours de l'adaptation ou le traitement à l'aide de balance (Aston®).

2.3. Traitement

Après la période d'adaptation nous avons commencé le traitement. La période du traitement est pendant 2 moins, elle est par voie orale selon leurs poids corporel. Donc le lotissement et le traitement dans notre expérimentation réalisé comme suivant:

- ✓ *Lots n°1* **:** contient 05 lapins comme témoin ; gavage d'eau distillé seulement.
- ✓ *Lots n°2* **:** contient 05 lapins pour le traitement par Fe_3O_4 à dose de 50mg/kg/jour
- ✓ *Lots n°3* **:** contient 05 lapins pour le traitement par leFe_3O_4 à dose de 75mg/kg/jour
- ✓ *Lots n°4***:** contient 05 lapins pour le traitement par leFe_3O_4 à dose de 100 mg/kg/jour
- ✓ *Lots n°5***:** contient 05 lapins pour le traitement par leFe_3O_4 à dose de 125mg/kg/j

2.4. Sacrifice et prélèvement

Après 2 mois du traitement, on a sacrifié les lapins. Le prélèvement des organes a été fait au niveau de laboratoire de l'université de Tébessa, les foies et le sang sont récupérés et pesés (fig. 22).

3. Méthodes de dosage

3.1. Paramètres métaboliques

3.1.1. Dosage des glucides

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait au niveau de foie des lapins selon la méthode de **Dubois, (1956).** L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100mg de foie dans des tubes à essai puis à ajouter 2ml d'éthanol à 80%, le tout est laissé 48 H. Le dosage se fait par évaporation totale de l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 70°C. Après refroidissement, on complète le volume de chaque tube à essai à 20 ml avec de l'eau distillée ensuite en prélève 1ml de la solution et on joute 1ml de phénol à 5 % en prenant soin de bien agiter, puis on ajoute 2 ml d'acide sulfurique concentré dans des tubes déposés préalablement dans un bain de glace. Enfin le tout est laissé se reposer pendant 25 min, puis on procède à la lecture au spectrophotomètre (Shimadzu mini1240), à une longueur d'onde de 490 nm. Le calcul des concentrations réelles se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage préparé à partir d'une solution mère de glucose **(Annexes : Courbe.01).**

3.1.2. Dosages des lipides

Les lipides hépatiques sont dosées selon la méthode **(Goldsworthy et *al*., 1972),** l'extraction est selon **shibko et *al* .(1966)** chaque échantillon constitué de 0.5g de foie est découpée et macéré dans 10ml de l'acide trichloroacétique acide TCA (20%) après broyage et filtration et une première centrifugation (centrifugeuse Sigma 2-16P) à 5000 t/min pendant 10min on verse le surnageant et on garde dans le même tube le culot, on ajoute à ce dernier 1ml du mélange Ether/Chlorophorme (1/1), et après une seconde centrifugation (5000 t/min pendant 10min) qui donne deux phases : un culot (contenant les protéines) et un surnageant (contenant les lipides), on prélève 100µl du surnageant auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et en met après agitation les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 10min.

Après refroidissement, on prélève encore une fois au moyen d'une micropipette 200µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfophospho-vanillinique à 85% (0.38g vanilline + 195ml acide orthphosphorique + 55ml H2O) et laisser 30 minutes à l'obscurité,la lecture spectrophotomètrique (Shimadzu-mini1240), est réalisée à une longueur d'onde 530nm. Le calcul des concentrations réelles se fait à partir de

L'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère préparée en utilisant de l'huile de tournesol **(Annexes : Courbe.02).**

3.1.3. Extraction et dosage des protéines

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de **Bradford (1976)** qui utilis**e** la BSA (Sérum Albumine Bovine) comme standard, sur le même échantillon utilisé pour doser les lipides, on récupère le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1ml du NaOH (0.1N) et on agite énergétiquement pour la dissolution des protéines. Après, on prélève, au moyen d'une micropipette, un volume de 100µl auquel on ajoute 4ml du réactif BBC (Bleu Brillant de Coumassie) (50mg BBC +50ml d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 500ml avec l'eau distillée). Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les échantillons pour lecture à une longueur d'onde 595nm. Le calcul des concentrations se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisé à partir d'une solution d'albumine de sérum de boeuf **(Annexes : Courbe.03).**

3.2. Paramètres enzymatiques et non enzymatiques

3.2.1. Dosage du glutathion GSH

Principe

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **Weckbeker et Cory (1988).** Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (réactif d'Elleman) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l`homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalycilique 0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion.

Protocole expérimental

Les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à0.2M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine.

-Une fois prépare, l' homogénat est déprotéinisé ; 0.8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalycilique (SSA) à 0.25%.

-Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace. -Centrifugé pendant 5min à1000 t/min.

-Prélever 0.5 ml du surnagent.

-Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), PH=9.6.

-Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (DTNB) a 0.01M dissous dans le méthanol absolu.

-Laisser pendant 5min à température ambiante.

-Mesurer l'absorbance (A) à 412nm.

Calcul

La concentration en GSH est obtenue par la formule suivante :

$$[\mathrm{GSH}] = \frac{\mathrm{DOX1X1.525}}{\mathrm{131000X0.8X0.5mgdeprotéine}}$$

DO : Densité1 optique.

1 : Volume total des solutions utilisées de la déprotéinisation. (0.8 ml homogénat +0.2ml SSA).

1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris-EDTA+0.025 ml DTNB).

131000 : Coefficient d absorbance (contenant le groupement-SH à412 nm).

0.8 : Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.

0.5 : Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

On que la concentration de GSH est mesuré par apport à 1 mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagne par le dosage des protéines.

3.2.2. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de Flohe et Gunzler (1984). En utilisation l'H_2O_2 comme substrat.

- L'extraction de l'enzyme : homogénéisation par le tampon phosphate) pH7.8.
- Centrifugation 10 min a 3000t/min.
- Récupération de surnageant (extrait enzymatique).
- 0.2 ml de surnageant +0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) a0.1 MM (réaction enzymatique) + 0.2 ml TP a 0.067M (tampon d'extraction pH7.8).
- Préparer un blanc avec 0.4 ml de GSH +0.2 de TP (réaction non enzymatique), Incubation au bain marie à 25°C pendant 05 min.
- 0.2 ml d'H_2O_2 (1.3MM) pour initier la réaction.

- Laisser agir 10 min.
- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1%(acide tri chloro-acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 3000t/min.
- 0.48 ml de surnageant et place dans une cuve+2.2 ml de Na2HPO4 (0.32M) +0.32 ml de DNTB (1MM).
- Formation d'un composé colore, mesurer la densité optique à 412 nm dans le 05 min.
- La détermination (calcule) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivant :
    - Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.
    - Blanc=0.04 micro mole de GSH réduit →DOb
    - Extrait=0.04 micro mole de GSH réduit → DOe

Donc la concentration de GSH réduit qui sera oxydée (disparue)= DOe-DOb

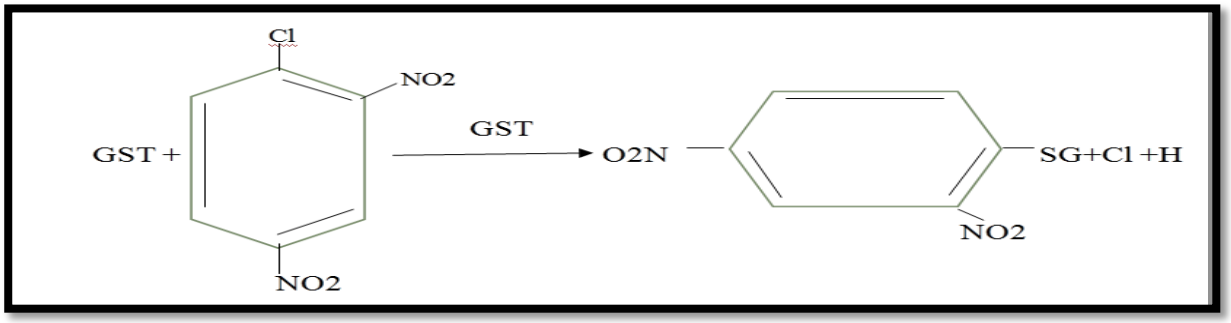
X= $(DOe-DOb)$ 0.04 DOb = quantité de GSH réduit disparue (oxydée) dans 0.2 extrait dans 1ml

L'activité de la GPx = la quantité de GSH réduit oxydée disparue X/5[*Protéine*]

3.2.3. Dosage de l'activité de glutathion S-Transférase (GST)

Principe

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode de **Habig et *al.* (1974),** Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-Chloro2, 4 di nitrobenzène) en d'un cofacteur le glutathion (GST), la conjugaison entraine la formation d'une molécule novelle ; 1-S-Glutathionyle 2-4Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



Protocole

La valeur de la densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé elle-même liée à l'intensité de l'activité GST .Les échantillons sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH6).L'homogénat est centrifugé à 14000 t/min pendant 30 min et le surnageant récupéré servira comme source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM) [20.26 mg CDNB, 153.65mg GSH, 1 ml ethanol, 100 ml tampon phosphate (0.1M, Ph 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute et chaque 15 secondes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST(nmol GST/min/mg protéine)} = \frac{(\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min})}{9{,}6 \times \text{mg de protéine}}$$

Do : Densité optique de l'échantillon /min.

Do/min blanc : Densité optique du blanc /min

9.6 : Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en mM. Cm

3.2.4. Dosage du malondialdéhyde MDA

La MDA Peut être détecté par une réaction colorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). La détection du MDA issue de la dégradation des acides gras polyinsaturés à 3 ou 4 double liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation *in vitro*. Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode d'**Esterbauer et *al* (1992)**

Principe

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique, pour former un pigment (rose).Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à530 nm.

Protocole

- Prélever 375µl de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 150 µl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl150mM pH7.4).
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%)
- Vortexer et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10min.
- Prélever 400 µl du surnageant.
- Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M.
- Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM).

Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 minutes

La concentration de MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO =E.C.L) :

$$[\mathrm{C}](\mathrm{nmol/mg\ protéine}) = \frac{\mathrm{DO}.106}{\varepsilon.\mathrm{L}.\mathrm{X}.\mathrm{Fd}}$$

C : Concentration en nmoles/mg de protéines ; DO : Densité optique lue à530nm ;

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA =1.56 $105M{-}1cm{-}1$;

L : Longueur du trajet optique=0.779 cm ;

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;

Fd: Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

3.2.5. Dosage de l'activité Catalase (CAT)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de **Cakmak et Horst (1991).** La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire ε =39400 µM-1.cm-1.L pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100µl de l'extrait enzymatique brut, 50µl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2à 0,3% et 2850µl de tampon phosphate (50mM, pH 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique (Jenway 6300).La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité de catalase est calculée selon la loi suivant :

$$Acat = \frac{\Delta\mathrm{A}\,.\,\mathrm{Vt}}{\varepsilon\,.\,\Delta\mathrm{t}.\,\mathrm{L}.\,\mathrm{Ve}.\,\mathrm{p}}$$

Act: Activité enzymatique en µmole/min/mg de Protéines.

ε : Coefficient d'extinction linéique molaire en. µM-1. cm-1

ΔA : pente de la droite de régression (variation de la densité optique en fonction du temps)**.**

Vt : Volume total du mélange réactionnel en ml.

Ve : Volume de l'extrait enzymatique en ml.

L : Largeur de la cuve de mesure en cm.

P : Teneur en protéines en mg

T : temps de lecture en min.

4- Dosage des transaminases TGO, TGP

TGO (Transaminase Glutamate Oxaloacétique) **: Selon la méthode Biomaghreb**

Principe : détermination cinétique de l'activité aspartate aminotransferase, la réaction est initiée par addition de l'échantillon de patient au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :

$$2\text{ oxogluturate} + \text{L-Aspartate} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{Glutamate} + \text{oxaloacetate}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{MDH}} \text{Malate} + NAD^+$$

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité aspartate aminotransferase dans l'enchantion **(Berghmeyer et *al.*, 1976).**

TGP (Transaminase Glutamate) **: Selon la méthode Biomaghreb**

Principe : détermination cinétique de l'activité alanine aminotransferase, la réaction est initiée par addition de l'échantillon de patient au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :

$$2\text{ oxogluturate} + \text{Alanine} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{Glutamate} + \text{Pyruvate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactate} + NAD^+$$

Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité Alanine transferase dans l'enchantion **(Berghmeyer et *al.*, 1978).**

5-Etudes statistique

Les résultats obtenus à partir d'un test à un critère présent sous forme (moyenne de cinq répétitions ± l'écart type), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Excell'office 2013.

Nous avons déterminé les paramètres statistiques pour chaque lot expérimental. Chaque paramètre mesuré à fait l'objet d'une analyse de variance avec un taux de signification $\alpha \leq 0.05$. Et comparer par rapport au témoin par test de Dunett si $P \leq \alpha$ / $\alpha = 0.05$ il y a des différences significatives entre les moyennes, ces calcules ont été effectués à l'aide de logiciel MINITAB 17.