MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Matériels biologiques

Nous avons utilisé des organes conservées a température (-80°C), au niveau de laboratoire de l'université Larbi Tébessi de Tébessa. Nous avons faires des expériences sur 15 foies conservées des rats de ***Rattus rattus*** (blancs mâles) de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevages El Kouba, Alger) qu'ont été traités par l'oxyde de fer [Fe_3O_4] à dose de 7µg/Kg/jours et traités par la curcumine à dose de 82 ppm/jours . Ce traitement adaptée l'année passée au niveau de notre université par les étudiants Difallah A et Cherf S dans un projet de master 2 toxicologie intitulé par variation des paramètres mitochondriaux après une neurotoxicité par [Fe_3O_4] (NPs) chez les rats

Nous avons organisé ses organes à 03 groupes d'échantillons qui sont comme suite :

Groupe 01 : témoin

Groupe 02 : traités par l'oxyde de fer [Fe_3O_4]

Groupe 03 : combinée (traité par l'oxyde de fer et la curcumine)

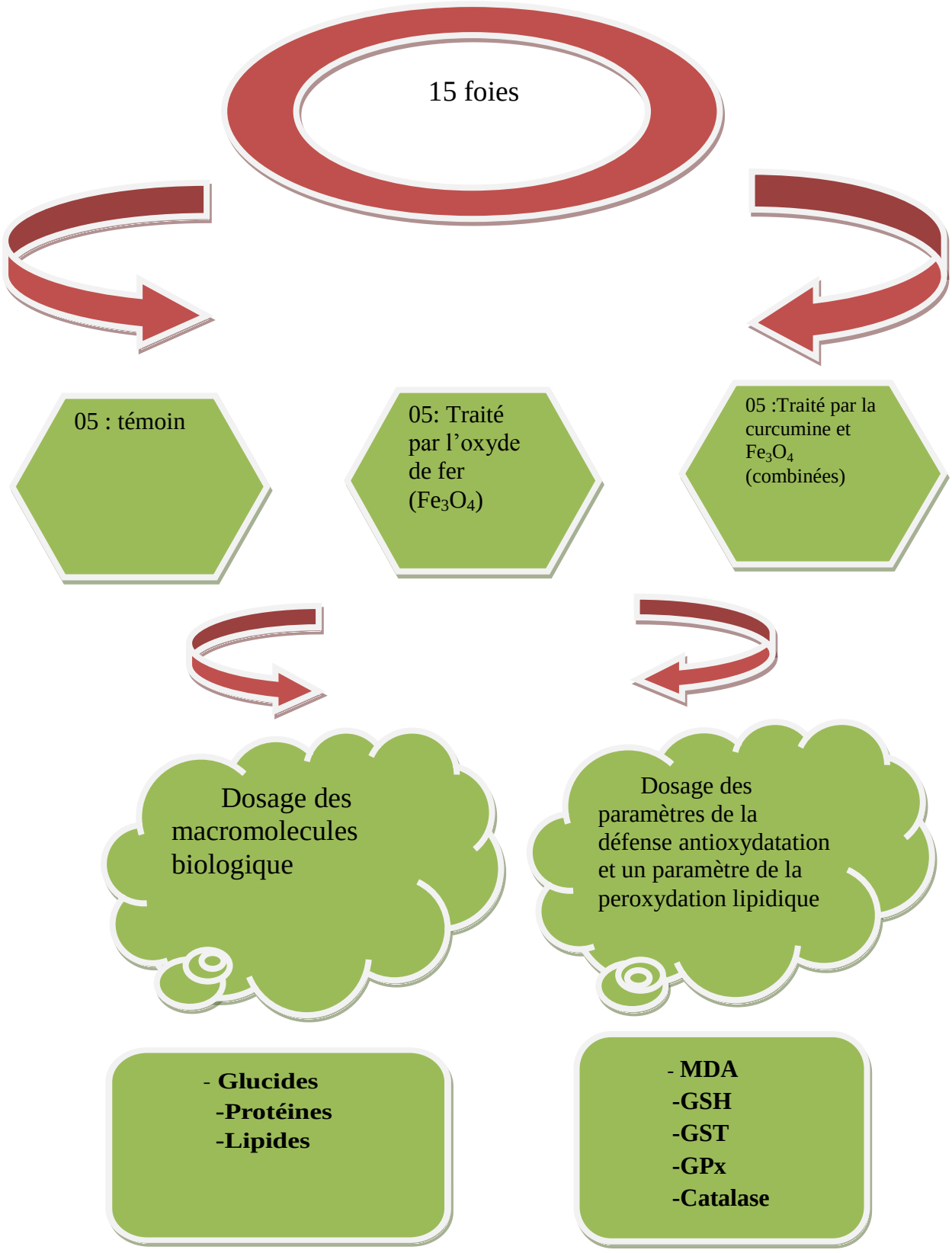


Figure 11 : Protocole expérimental.

2. Méthode de dosage

2.1. Paramètres métaboliques

2.1.1. Dosage des glucides

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait au niveau de foie des rats selon la méthode de [25] L'extraction des sucres solubles se fait à mettre 100 mg de foie dans des tubes à essai puis en ajouter 2 ml d'éthanol à 80 %, le tout est laissé 48h. Le dosage se fait par évaporation du 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 1 ml 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 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.

2.2.2. Dosage des protéines

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de [13] 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 (0.1 N) et on agite énergétiquement pour la dissolution des protéines. Après, on prélève, au moyen d'une micropipette, un volume de 100 µl auquel on ajoute 4 ml du réactif BBC (Bleu Brillant de Coumassie) (50 mg BBC +50 ml d'acide orthophosphorique à 85 % et on complète à 500 ml avec l'eau distillée). Ainsi une couleur bleue se développe et on passe directement les échantillons pour lecture à une longueur d'onde 595 nm. 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 bœuf.

2.1.3. Dosages des lipides

Les lipides hépatiques sont dosées selon la méthode [33] et l'extraction est selon [76], ont posé 0.5 g de foie est découpée et macéré dans 10 ml de l'acide trichloracétique acide TCA (20 %) après broyage et filtration et une première centrifugation (centrifugeuse Sigma 2-16P) à 5000 t/min pendant 10 min on verse le surnageant et on garde dans le même tube le culot, on ajoute à ce dernier 1 ml du mélange Ether/Chloroforme (1/1), et après une seconde centrifugation (5000 t/min pendant 10 min) qui donne deux phases: un culot (contenant les protéines) et un surnageant

(contenant les lipides), on prélève 100 µl 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 10 min.

Après refroidissement, on prélève encore une fois au moyen d'une micropipette 200 µl de l'extrait auquel on ajoute 2.5 ml du mélange sulfophospho-vanillinique à 85 % (0.38 g vanilline + 195 ml acide orthphosphorique + 55 ml H_2O) et laisser 30 minutes à l'obscurité, ensuite la lecture spectrophotométrique (Shimadzu-mini1240), à une longueur d'onde 530 nm.

Le calcul des concentrations réelles se fait à partir d'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère préparée en utilisant de l'huile de tournesol.

2.2. Paramètre de stress

2.2.1. Dosage du Malondialdéhyde MDA

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditées par les radicaux libres.

Le dosage du MDA est réalisé selon la méthode [27] **.**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 3ou 4 double liaisons peroxydées, constitue une méthode très sensible pour déterminer une lipopéroxydation in vitro.

- **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). La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique .Ce chromogène peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.

- **Protocole**

- ✓ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant).
- ✓ Ajouter 150 µl de la solution TBS (tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- ✓ Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20 %, BHT 1 %).
- ✓ Vortexer et centrifuger à 1000 tour/min pendant 10 min.
- ✓ Prélever 400 µl du surnageant.
- ✓ Ajouter 80 µl du HCL 0.6 M.
- ✓ Ajouter 320 µl de la solution tris-TBA (tris 26 mM, TBA 120 mM).
- ✓ 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):

$$[C]\ (\text{nmol/mg protéine}) = \frac{DO.10^6}{\varepsilon.L.X.Fd}$$

C: Concentration en nmol/mg de protéines; DO: Densité optique lue à 530 nm.

E: Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.5610^5 M^{-1} cm^{-1}$.

L: Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

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

Fd: Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

2.2.2. Dosage du glutathion (GSH)

Le taux du (GSH) est quantifié selon la méthode de [29].

Le principe de ce dosage repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique résulte de la réduction de l'acide5, 5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (réactif d'Elleman DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois l`homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalycilique 0.25 %) afin de protéger les groupements-SH du glutathion mésuré a une longeur d'onde de 412 nm.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante:

- Ont posé 200 mg de tissu sont mis individuellement en présence de 8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0.2 M.
- Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine.
- Une fois prépare, l' homogénat est déprotéinisé, Prélever 0.8 ml de ce dernier auquel on ajoute 0.2 ml d'une solution d'acide sulfosalycilique (SSA) à 0.25 %.
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02 M), PH 9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (DTNB) a 0.01 M dissous dans le méthanol absolu.
- Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:

$$\text{GSH (nmol GSH/ mg protéine)} = \frac{\text{DO x 1 x 1.525}}{\text{13100 x 0.8 x 0.5 x mg}}$$

- **DO:** Densité optique
- **1:** Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- **1.525:** Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).
- **13100:** Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.
- **0.8:** Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans 1 ml.
- **0.5:** Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

La concentration de GSH est mesurée par rapport à 1mg de protéine. C'est pour cela ce dosage doit être accompagne par le dosage des protéines.

2.2.3. Dosage de glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de [37]**.** Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme substrat en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px.

✓ **Préparation des solutions**

- Solution du GSH (0.1 mM): Dissoudre 3.073 mg GSH dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution TCA (1 %): Dissoudre 1 g TCA dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution DTNB (1.0 mM): Dissoudre 100 mg DTNB dans 250 ml de méthanol absolu.

✓ **Mode opératoire**

- Homogénéisation par le tampon phosphate pH 7.8 (Pour L'extraction de l'enzyme).
- Centrifugation 10 min a 3000 t/min.
- Récupération de surnageant (extrait enzymatique).
- 0.2 ml de surnageant + 0.4 ml de GSH (glutathion forme réduite) à 0.1 mM (réaction enzymatique) + 0.2 ml TP a 0.067 M (tampon d'extraction pH 7.8).
- 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 (1.3 mM) pour initier la réaction.
- Laisser agir 10 min.

- Arrêter la réaction par addition de 1 ml de TCA 1 % (acide trichloro-acétique).
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min.
- Centrifuger durant 10 min a 3000 t/min.

- Prélever 0.48 ml de surnageant et place dans une cuve + 2.2 ml de Na_2HPO_4 (0.32 M) +0.32 ml de DNTB (1 mM).

- Mélanger et formation d'un composé colore et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

✓ **Calcule l'activité GPx**

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= $(DOe-DOb)$ x0.04/D0 b = quantité de GSH réduit disparue (oxydée) dans 0.2 extrait dans 1ml.

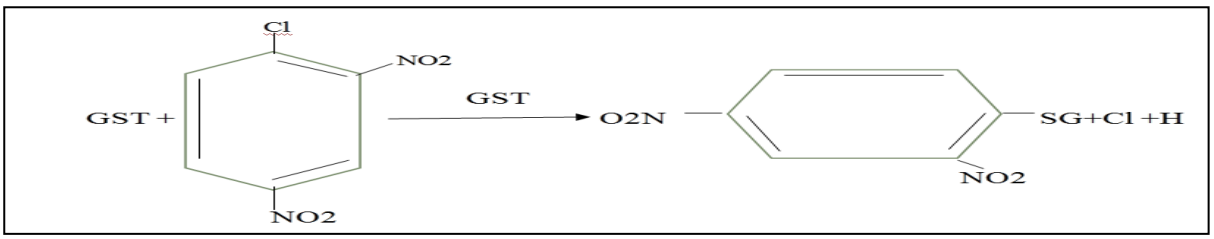
L'activité de la GPx = la quantité de GSH réduit oxydée disparue X$\frac{5}{[Protéine]}$.

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

Les glutathion S-transférases appartiennent à une famille d'enzyme multifonctionnelle essentiellement cytosolique, impliqués dans le transport et la biosynthèse intracellulaire, elles catalysent des réactions de conjugaison entre un peptide endogène, le glutathion, et des molécules réactives comportant des sites électrophiles.

La mesure de l'activité de glutathion S-Transférase (GST) est déterminée selon la méthode [19] elle mesure la cinétique de formation entre un substrat modèle, le chlorodinitrobenzene (C-DNB) et le glutathion; 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 2-4 Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante:



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.

Pour cela, nous avons procédés aux étapes suivantes:

- Homogénéisation par 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 06).
- 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 200 µl du surnageant avec 1.2 ml du mélange CDNB (1 mM), GSH (5 mM) [20.26 mg CDNB, 153.65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0.1 M, pH 06)].
- 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 lecture de l'absorbance se fait à 340 nm après 30 s en intervalle de 3 min.

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

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

- **Δ DO échantillon – Δ DO blanc** : moyenne des DO des échantillons par minute – moyenne des DO des Blancs par minute.
- **ε:** Coefficient d'extinction moléculaire du C-DNB, $\varepsilon_{C\text{-}DNB} = 9.6\ mM^{-1}.cm^{-1}$
- **L:** Trajet optique de la cuve = 1cm.

2.2.5. Dosage de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT)

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les

espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène.

Le dosage spéctrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé selon la méthode de [18] la décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre pour une longueur d'onde de 240 nm 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_2 à 0,3 % et 2850 µl de tampon phosphate (50 mM, 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:

$$\mathbf{Act} = \frac{\mathbf{\Delta A \,.\, Vt}}{\boldsymbol{\varepsilon} \,.\, \mathbf{\Delta t.\, L.\, Ve.\, p}}$$

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.

✓ est due à la longueur d'onde 520 nm.

3. Études statistiques

Les résultats obtenus sont représentés sous la forme (moyenne ± écartype), et pour mieux visualiser les résultats obtenus la représentation graphique choisie est celle des histogrammes en utilisant Microsoft office 2013.

Nous avons déterminé les paramètres statistiques pour chaque lot expérimental. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance avec un taux de signification de **$\alpha \leq$ 0.05**, et comparés par rapport aux témoins par test de dunnett et entre eux par le test student. Ces calculs ont été effectués à l'aide de logiciel MINITAB® 17.01.