# 1-Matériel et méthodes :

## 1-1- Matériel biologiques :

### 1-1-1-Matériel animal :

Dans notre étude expérimentale, nous avons travaillé sur 24 souris blanches males de la souche BALB/C, provenant de l'institut pasteur-Alger, d'un âge entre deux à trois mois et avec poids moyen de 30 g.

**Tableau 04** : Classification des souris **(Orsini *et al.*, 1983)**.

| Classification des souris | |
|---|---|
| Règne | Animale |
| Embranchement | Vertébrés |
| Classe | Mammifère |
| Ordre | Rongeurs |
| Sous-ordre | Myomorphes |
| Famille | Muridés |
| Genre | *Mus* |
| Espèce | *Musmusculus* |
| Nom commun | Souris domestiques |

### 1-1-2-Matériel végétal :

- ***salvia officinalis* :**

*Salvia officinalis* est une plante à racines ramifiées et ligneux, à tige quadrangulaire et très ramifiée peux atteindre de 20 à 60 cm de haut. **(Komet, 2011).** Elle est caractérisée par ces feuilles de 3 à 10 cm de long et de 1.5 cm de large sont opposées, ovales, et allongées, vert-gris, feutrées, avec des fleurs bleu-rose lilas, visibles de mai à août, se situent sur des hampes florales érigées, et sont regroupées en petits glomérules formant de grands épis.

Les feuilles de la Sauge officinale sont un condiment courant, apprécié depuis l'antiquité. Elles peuvent être consommée fraiches, mais leur parfum s'affine au séchage **(Loic, 2009),**

Il existe plus d'une centaine d'espèce du genre *salvia* dont beaucoup sont utilisées en phytothérapie. (**Komet, 2011).**



**Figure 10** : *salvia officinalis* **(Loic. 2009**)

✓ **Propriétés :**

*Salvia officinalis* a des propriétés digestives, astringentes, antiseptiques, cholérétiques, balsamique, aromatique, antioxydants, anti-inflammatoires, carminatives, expectorantes, anti sudorifiques et toniques. On lui prête aussi une action œstrogènique. **(Komet, 2011)**

**Tableau 05**:classification de la plante **(Loic, 2009) (Defayolle, 2005**).

| | |
|---|---|
| Règne | *Plantae* |
| Sous-règne | *Tracheobionta* |
| Division | *Magnoliophyta* |
| Classe | *Magnoliopsida* |
| Sous-classe | *Asteridae* |
| Ordre | *Lamiales* |
| Famille | *Lamiaceae* |
| Genre | *Salvia* |
| Espèce | *officinalis* |

La partie utilisée de la plante est la partie aérienne : Les feuilles moulues en poudre.

## 1-2-L'élevage :

Les animaux sont mis dans des cages spéciales pour les souris, celles-ci sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Elle est changée deux fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation suivie l'alimentation et l'eau est remplie dans des biberons.

La dose de chaque traitement est calculée selon le poids vif moyen des souris de chaque lot et donnée à la souris une fois par jour.

La méthionine et *salvia officinalis* sont utilisé sous forme poudre.

Chaque dose de méthionine ou d'extrait de la plante est incorporée dans une boule de farine (0.1g) puis administrée à la souris par voie orale.



**Figure 11:**l'élevage des souris

## 1-3-Lotissements :

Les souris sont reparties en (04) lots:

- **lot 1** : contient 06 souris témoins : ne subit aucun traitement.
- **lot 2** : contient 06 souris traitées par la méthionine de la dose 200mg/kg de poids vif incorporé dans la farine. (**Zerizer, 2006)**
- **lot 3 :** contient 06 souris traitées par *salvia officinalis* de la dose 100mg/kg de poids vif et méthionine de la dose 200mg/kg de poids vif incorporé dans la farine.
- **lot 4** : contient 06 souris traitées par la *salvia officinalis* de la dose 100 mg/kg de poids vif incorporé dans la farine**. (Sparg *et al*., 2004).**

### 1-4-Prélèvement du foie :

Après 21jours du traitement quotidien, les souris sont sacrifiées. Après la dissection des animaux on a pris le sang et les organes**.**

- Le sang prélevé de chaque souris est posé dans des tubes EDTA qui subit une centrifugation 2800 tours/min pendant 10 min. le sérum obtenu a été récupéré dans des tubes éppendorff et conservé a -80°C.
- Le foie a été prélevé, rincer avec l'eau physiologique préparé comme suite: 0,9g de NaCl avec 100 ml d'eau distillée pour éliminer le sang et sécher avec un papier absorbant.
- Puis pesés 1g du foie et conservé dans le réfrigérateur -80°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant : GSH, GST, GPx et CAT.

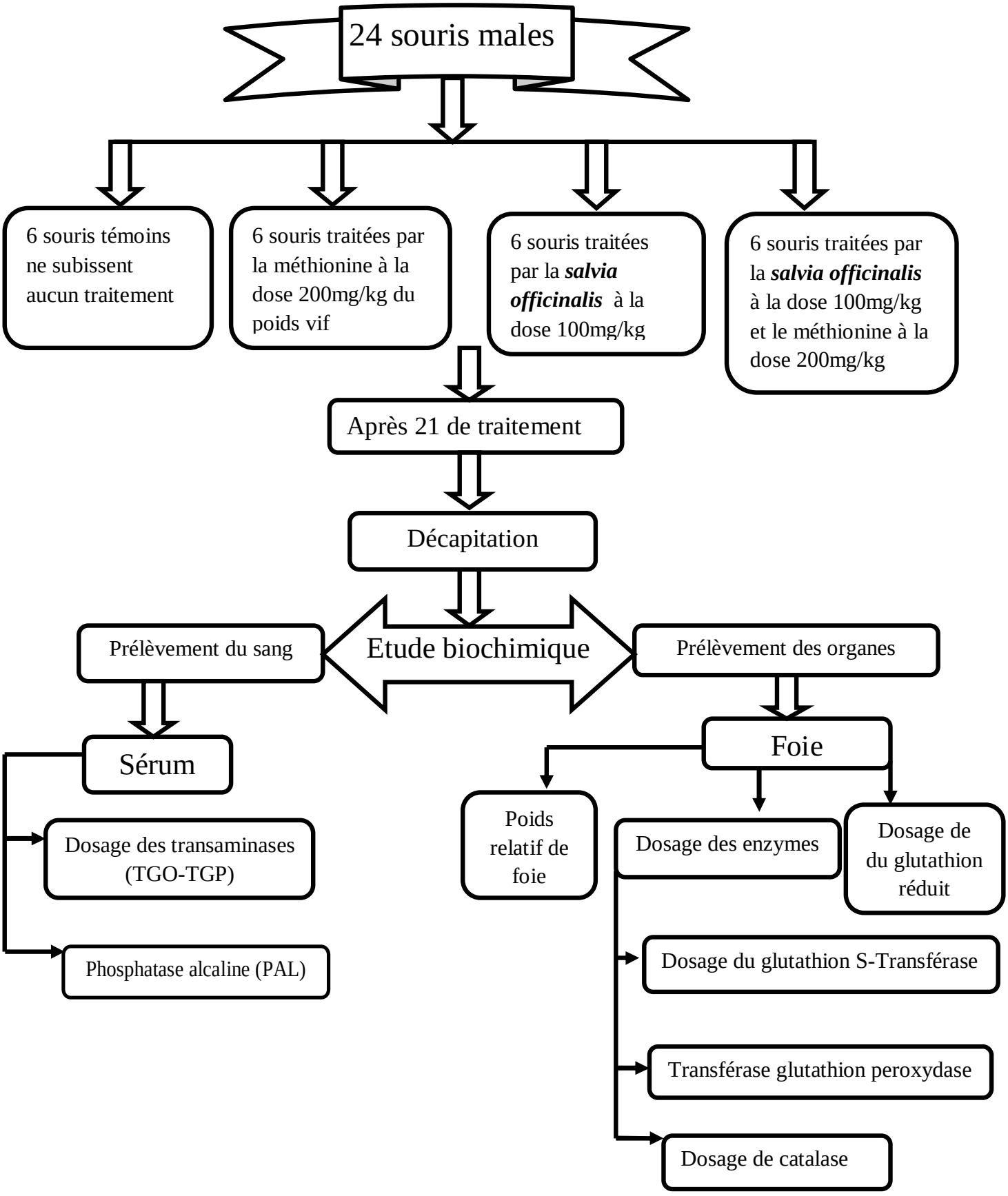



**Figure 12**: protocole expérimental

**1-5-Estimation du poids relatif du foie :**

Après le sacrifice des animaux, le foie a été rapidement prélevé et rincés dans l'eau physiologique préparé comme suite: 0,9g de NaCl avec 100 ml d'eau distillée. Puis séchée par un papier absorbant et pesés.

Le foie a été conservée à -80C pour le dosage des paramètres du stress oxydatif à savoir GSH, GST, GPx et CAT.

- **Calcul :**

- Calculer le poids relatif du foie (PRF (g/100g de pois corporel)) par rapport au poids total de la souris.

$$PRF\ (g/100gPC) = \frac{PF}{PS} \times 100$$

PF : poids du foie (g).

PS : poids de la souris (g).

**1-6- Méthodes de dosage des paramétrés biochimiques :**

**1-6-1-Transaminase glutamate oxaloacétate(TGO) :**

Méthode cinétique de dosage des transaminases sériques selon la fiche technique Spinreact.

- **Principe**

Transaminase glutamate oxaloacétate (TGO) appelée aussi aspartate aminotransferase (ASAT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α-cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, $H^+$

(**Murray**, **1984):**

$$\text{Aspartate} + \alpha\text{–cétoglutarate glutamate} \xrightarrow{\text{ASAT}} \text{oxaloacétate} + \text{oxaloacétate}$$

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

- **Réactifs :**

| | | |
|---|---|---|
| Réactif 1 : Substrat TGO | Tampon phosphate<br>ph7,5AspartateA-cétoglutarate | 85 mmol/l<br>200 mmol/l<br>2 mmol/l |
| Réactif 2 : Réactif de Coloration | 2,4 dinitrophénylhydrazone | 1 mmol/l |
| Réactif 3 | Etalon pyruvate | - |
| Réactif auxiliarie | Soude 0,4 N - | - |

Les réactifs sont stables plusieurs années à 2-8°C. Les réactif 3 est à conserver à l'abri de la lumière.

*Pour obtenir le réactif de travaille(RT) il faut :

-Mélanger 1 ml de réactif 2 avec 1 ml de Réactif, et laisser 20 mn à température ambiante.

- Ajouter 10 ml de soude 0,4 N.

- **Mode opératoire :**

| | |
|---|---|
| **RT** (mL) | 1.0 |
| Incuber 5 min à 37 °C | |
| Sérum (µL) | 100 |

Incubation pendant 01 minute. Lecture de l'absorbance (A) à λ=340 nm chaque minute pendant 03 minutes.

- **Calcul :**

$$\Delta A/min \times 1750 = U/L \text{ de TGO}$$

U/L : unité international/L est la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de substrat par minute

**1-6-2-Dosage du Glutamopyruvate Transférase (TGP) :**

Le dosage du Glutamopyruvate Transférase **(TGP)** appelée aussi alanine aminotransférase sérique (ALAT) est fait selon la méthode de **(Reitmans et Frankels, 1957).**

- **Principe**

Détermination cinétique de l'activité **TGP** selon les réactions suivantes /

$$\text{L-alanine} + a\text{-cétoglutarate} \xrightarrow{\text{TGP}} \text{glytamate} + \text{pyruvate}$$

Le pyruvate formé est dosé sous forme de leur dérivé 2,4 dinitrophénylhydrazone

- **Réactifs :**

| | | |
|---|---|---|
| Réactif 01 : Substrat TGP | Tampon phosphate ph7,5<br>Alanine A-cétoglutarate | 95 mmol/l<br>200 mmol/l<br>2 mmol |
| Réactif 02 : Réactif de Coloration | 2,4 dinitrophénylhydrazone | 1mmol /L |
| Réactif 03 | Etalon pyruvate | |
| Réactif auxiliaries | Soude0,4 N | |

Les réactifs sont stables plusieurs années à 2-8°C. Les réactif 3 est à conserver à l'abri de la lumière.

* Pour obtenir le réactif de travaille(RT) il faut :

-Mélanger 1 ml de réactif 2 avec 1 ml de Réactif 1, et laisser 20 mn à température ambiante.

6 Ajouter 10 ml de soude 0,4 N.

- **Mode opératoire :**

| | |
|---|---|
| RT (mL) | 1.1 |
| Incuber 5 min à 37 °C | |
| Sérum (µL) | 100 |

Incubation pendant 01 minute. Lecture de l'absorbance (A) à λ=340 nm chaque minute pendant 03 minutes.

- **Calcul :**

$$\Delta A/min \times 1750 = U/L \text{ de TGP}$$

U/L : unité international/L est la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de substrat par minute

**1-6-3-Dosage de phosphatase alcaline :**

La phosphatase alcaline (PALc) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate à pH 10.4, en libérant p-nitrophenol et le phosphate **(Wenger et al, 1984**), selon la réaction :

$$\text{p-nitrophenyl phosphate} + H_2O \xrightarrow{\text{PAL}} \text{p-nitrophenol} + \text{phosphate}$$

La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans le sérum selon la fiche technique Spinreact :

- **Réactifs**

| | | |
|---|---|---|
| **R1**<br>Tampon | Diéthanolamine (DEA) pH 10.4<br>Chlorure de magnésium | 1mmol /L<br>0.5mmol/L |
| **R2**<br>Substrat | p-Nitrophenylphosphate (pNPP) | 10mmol/L |

Pour obtenir le réactif de travaille(RT), il faut que dissolvez un comprimée de R2 dans un 15mL de tampon R1 et laisser le mélange 1 heure de temps.

La stabilisation de réactif de travaille 21 jour après la préparation et la conservation en 2-8°C.

- **Mode opératoire** :

| | |
|---|---|
| **RT** (mL) | 1.2 |
| Incuber 5 min à 37 °C | |
| Sérum (µL) | 20 |

Incubation pendant 01 minute. Lecture de l'absorbance (A) à λ=405 nm chaque minute pendant 03 minutes.

- **Calculs** :

**(**ΔA)/min X 3300 = U/L de PAL

U/L : unité international/L est la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de substrat par minute.

**1-7-Dosage des paramètres enzymatiques :**

**1-7-1-Dosage du glutathion réduit (GSH) :**

Le dosage du glutathion réduit hépatique (GSH) est fait selon la technique de **(Weckbeker et Cory., 1988).**

- **Principe**

La mesure de la concentration du GSH intracellulaire repose sur l'absorbance optique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitriobenzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion.

- **Mode opératoire**

- On obtient un homogénat par broyage de 200 mg de tissu hépatique congelé avec 0,8ml de solution EDTA (0,02M).
- On procède à la déprotéinisation de l'homogénat pour le glutathion avec 0,2 ml de l'acide sulfosalycilique (0,25%).

L'homogénats obtenue se laisse reposer 15 min au congélateur, puis on centrifuge 5 min à 1000 tours/min.

- A 0,5 ml de surnagent, on ajoute 1 ml de tampon tris/EDTA d'un ph 6,9 (contenant 0,02 M d'EDTA) et 0,025 ml d'acide 5,5'-dithio-bis-2- nitriobenzoïque (DTNB) à 0,01M.
- Laisser 5 min pour l'incubation.

- **Lecture**

La lecture se fait à la spectrophotométrie à λ = 412 nm, contre un blanc préparé comme suite : 0,5 ml d'eau distillée avec 1 ml de tampon tris/EDTA et 0,025 ml de DTNB.

- **Calcule de concentration**

La concentration en glutathion réduit est obtenue par la formule suivante :

$$GSH = \frac{DO \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5} / mg\ de\ protéine$$

**DO :** Densité optique ;

**1 :** Volume totale de solution utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml de solution EDTA + 0,2 ml d'acide sulfosalycilique) ;

**1.525 :** Volume totale des utilisées dans le dosage de GSH (1ml de tris/EDTA+0,025 ml DTNB+ 0,5 ml de surnageant) ;

**13100 :** Coefficient d'absorbance de groupement thiol (-SH) à 412 nm ;

**0,8 :** Volume de l'homogénat trouvé dans 1 ml ;

**0,5 :** Volume de surnageant.

### 1-7-3- Dosage du glutathion S-Transférase (GST) :

Le dosage de glutathion S-Transférase (GST) est réalisé selon la méthode de **(Habig et *al* . 1974).**

- **Principe**

Le dosage de GST est basé sur la mesure spectrophotométrique de la cinétique de la conjugaison du produit formé avec des substrats tels que le glutathion réduit et le 1- chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB).

- **Mode opératoire**

La procédure expérimentale du dosage de la GST se fait comme suit :

- Le tissu hépatique est homogénéisé dans 1ml de tampon phosphate sodique (0,1 M, ph 6);

- Puis l'homogénat est centrifugé pendant 30 mn à 14000 tours/ mn ;
- Le surnageant récupéré sert comme source d'enzymes (GST et GPX) et il est conservé au congélateur à -80°C jusqu'au moment de dosage.
- A 200 µl de surnageant, on ajoute 1,2 ml du mélange [(CDNB1mM, GSH 5mM) dans tampon phosphate sodique (0,1 M, ph 6)].

- **Lecture**

La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 mn pendant 5 mn à λ = 340 nm, contre un blanc préparé comme suit : 200 µL d'eau distillée avec 1,2 ml du mélange [(CDNB 1mm, GSH 5mm) dans tampon phosphate sodique (0,1 M, ph 6)

- **Calcul de la concentration**

L'activité enzymatique de la GST est déterminée par la formule suivante :

$$GST(\mu mol/mg\ de\ protéine) = \frac{A \times v}{e \times d \times v} /min/mg\ de\ protéine$$

**A :** Absorbance.

**V':** Volume totale de la cuve = 1400 µl [200 µl de surnageant + 1200 µl du mélange CDNB (1mm)/GSH (5mm)/tampon phosphate sodique (0,1 M, ph 6)].

**E :** Coefficient d'extinction = 9,6 mm-1cm-1.

**D :** Épaisseur de la cuve = 1 cm.

**V :** Volume du surnageant = 200 µl.

**Mg de protéine :** Concentration des protéines dans l'échantillon.

**1-7-2- Dosage du glutathion peroxydase (GPx) :**

- **Principe**

L'activité enzymatique de la GPx a été mesurée par la méthode de **(Flohe *et al,* 1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène en présence de GSH. Ce dernier est transformé en GSSG sous l'influence de la GPX :

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

- **Mode opératoire**

- Prélever 200 µl de l' homogénat.
- Ajouter 400 µl de GSH (0,1mm).
- Ajouter 200 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mm, nacl150 mm, ph 7,4).
- Incuber au bain marie (25°C/5min).

- Ajouter 200 µl de H2O2 (1,3 mm) pour initier la réaction et laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours/min.
- Prélever 480 µl de surnageant et mélanger avec 2,2 ml de tampon TBS et 320 µl de DTNB (1,0 mm).

- **Lecture:**

La lecture de la densité optique est faite après 5 minutes à λ = 412 nm, le blanc : 480 µl de l'eau distillée avec 2,2 ml de tampon TBS et 320 µl de DTNB (1,0 mm).

**Calcul de la concentration :**

- Activité de GSH consommée/mn/g de protéine (x)

$$x = \frac{(\text{DOe} - DOb) \times 0.04}{\text{DOb}} / \text{min/mg de protéine}$$

**X :** la quantité de glutathion réduit disparus (oxydée) dans 0,2 ml de l'échantillon.
**Doe :** densité optique de l'échantillon.
**Dob :** densité optique du blanc.

- **Activité de GPX :**

$$\text{GPx}(\mu\text{mol/min/mg de protéine} = \frac{\text{x} \times 5}{[\text{protéine}]}$$

**[Protéine] :** Concentration des protéines dans l'échantillon.

**1-7-4- Dosage de la catalase (CAT)**

- **Principe**

L'activité enzymatique de CAT est déterminée par la méthode de Clairborne (1985). Le principe est basé sur la disparition de l'H2O2 en présence de la source enzymatique à 25°C selon la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O+O_2$$

- **Mode opératoire**

- Préparation d'une fraction enzymatique selon la méthode d'Iqbal et al. (2003) comme suite :
- Un volume de tissu hépatique est homogénéisé dans 3 volumes de tampon phosphate de (0,1M, pH 7,4)
- L'homogénat est centrifugé durant 15 min à 2000 tours/ min à 4°C
- Le surnageant obtenu est centrifugé 30 min à 9600 tours/ min à 4°C
- Le surnageant final est la source utilisée pour l'évaluation de l'activité enzymatique du CAT
- L'évaluation de l'activité enzymatique du CAT :

A 0,025 ml de surnageant, on ajoute 1 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2) et 0,975 ml de H2O2 fraichement préparé (0,091 M).

- **Lecture**

L'absorbance est lue à 560 nm chaque minute pendant 2 minutes.

- **Calcul de la concentration**

L'activité enzymatique de CAT est calculée en termes d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI/min/g de protéine), selon la formule :

$$\textbf{L'activité de CAT (µmol/mg de protéine)} = (2.3033/T) \times (\log A_1/A_2)/\text{min/mg de protéine}$$

A1 : Absorbance de la première minute

A2 : Absorbance de la deuxième minute

T : Intervalle de temps en minute

g de protéine : Concentration des protéines dans la solution.

1-8- **Dosage des protéines:**

Les dosages des (GSH), (GST), d (GPX) dépend toujours aux dosages des protéines. Pour cela, On utilise la méthode de **(Bradford., 1976).** Pour déterminer la concentration totale de protéines dans un mélange complexe par spectrophotométrie d'absorption.

Cette méthode se fonde sur l'ajout du colorant, le (BBC), à une solution contenant des protéines (surnagent) à fin de déterminer la concentration en protéines totales. Le BBC en solution acide possède la particularité de se lier aux protéines, par des interactions non-covalente (ponts hydrogène, interactions hydrophobes et interactions ioniques), avec un effet

immédiat sur son spectre d'absorption (interaction du colorant principalement avec des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine et aromatiques).

- **Mode opératoire**

* A 100 µl de l'échantillon, on ajoute 4 ml de réactif de Bradford.

* La lecture se fait à la spectrophotométrie à $\lambda$ = 595 nm, contre un blanc préparé comme suite : 100 µl d'eau distillée avec 4 ml de réactif de Bradford.

- **Courbe d'étalonnage**

A partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml), une gamme d'étalonnage allant de 1 mg/ml de BSA a été préparée.

**Tableau 06** : gamme d'étalonnage pour dosage des protéines.

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Solution mére BSA (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| H2O (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Réactif de Bradford (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

- **Lecture**

La lecture de la DO est faite à 595 nm.

✓ **Analyse statistique des résultats**

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type et analysés statistiquement avec le logiciel «statistica » par le test de student et lorsque :

- $p \geq 0.05$ : la différence n'est pas significative

- $0.05 \geq p \geq 0.01$ : la différence est significative *

- $0.01 \geq 0.001$ : la différence est hautement significative **

- $p \leq 0.001$ : la différence est très hautement significative ***