# MATERIEL ET METHODES

## 1. Matériels

### 1.1. Produits chimiques

Dans ce travail, nous avons utilisé d'une part les nanoparticules à base de **l'oxyde de titane ($TiO_2$)** pour le traitement des rats sous forme de solution à une dose de 10mg/kg/jours **(Byoung et *al*., 2012)**, et d'autre parts la **curcumine (diféruloyl-méthane)** en solution aqueuse à une dose 20 ml/Kg/jours.

#### A. Préparation de la solution aqueuse de la curcumine

Pour la préparation de l'extrait de curcumine nous avons met 10g de curcum en poudre avec 100ml d'eau distillé dans le bain marie 60°C pendant 2 heure puis filtré par les papiers filtre. L'extrait va diluer (1 :10) et administrer aux rats par voie orale **(Asadi et *al*., 2014).**

### 1.2. Les animaux de laboratoire

Pour notre expérimentation, nous avons utilisé 20 rats blancs mâles appartiennent à l'espèce *Rattus rattus*. Souche *Wistar*, provenant de l'institut Pasteur (Centre d'élevages El Kouba, Alger) et sont élevés à l'animalerie de département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Tébessa. Ceux sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Entretien des animaux

Les rats ont été répartis en quatre (04) lots à raison de cinque (05) rats par lot. Ils ont été soumis à une période d'adaptation de 15 jours dans l'animalerie.

Ces animaux vivent dans des locaux aux conditions de l'animalerie, la température ambiante est de 23±2°C et une photopériode naturelle 12/12H avec une hygrométrie de 60%. âgés de neuf semaines et ayant un poids corporel entre 180 et 200g. Ils reçoivent de la nourriture et de l'eau a volonté et sont élevés dans des cages en polyéthylène (05 rats pour chaque cage) qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois par deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.



**Figure 12.** Schéma représente les conditions d'élevage des rats.

### 2.2. Répartition et traitement des rats

La répartition et le traitement des animaux sont illustrés comme suit :

**Lots 1:** Contient 5 rats comme témoin ne subissent aucun traitement .

**Lots 2:** Contient 5 rats traités par l'oxyde de titane à une dose 10 mg/Kg/jours par voie orale pendant 28 jours.

**Lots 3:** Contient 5 rats traités par le diféruloyl-methane à une dose 20 ml/Kg/jours par voie orale pendant 28 jours .

**Lots 4 :** Contient 5 rats combinée (traités par l'oxyde de titane et le diferylol-methane) à une dose (10 mg/Kg/jours et 20 ml/Kg/jours) par voie orale pendant 28 jours.

#### A. Mesure du poids

La mesure de poids est effectuée sur les rats touts les jours d'une façon régulièr pendant la durée d'élevage, soit au cours d'adaptation ou traitement à l'aide de balance électronique .

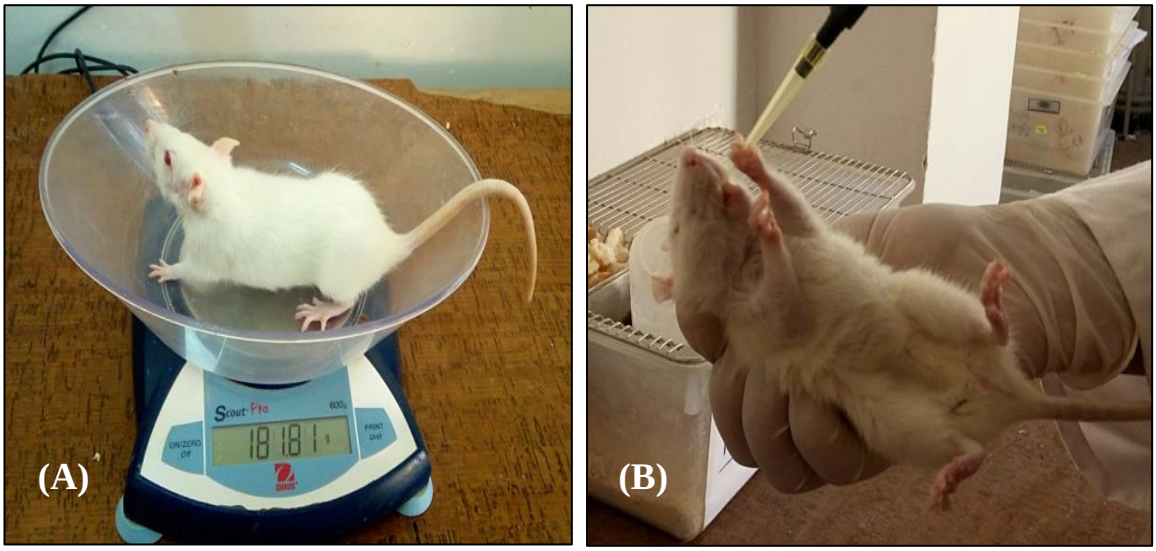



**Figure 13.** Schéma représente **(A)** Mesure du poids **(B)** Traitement des rats·

### 2.3. Sacrifice et prélèvement des reins

Après 28 jours de traitement les (4) lots ont été sacrifiés, les reins ont été rapidement prélevés et rincés dans une solution de NaCl a 0,9% puis pesé et conservé pour les dosages des différents paramètres.

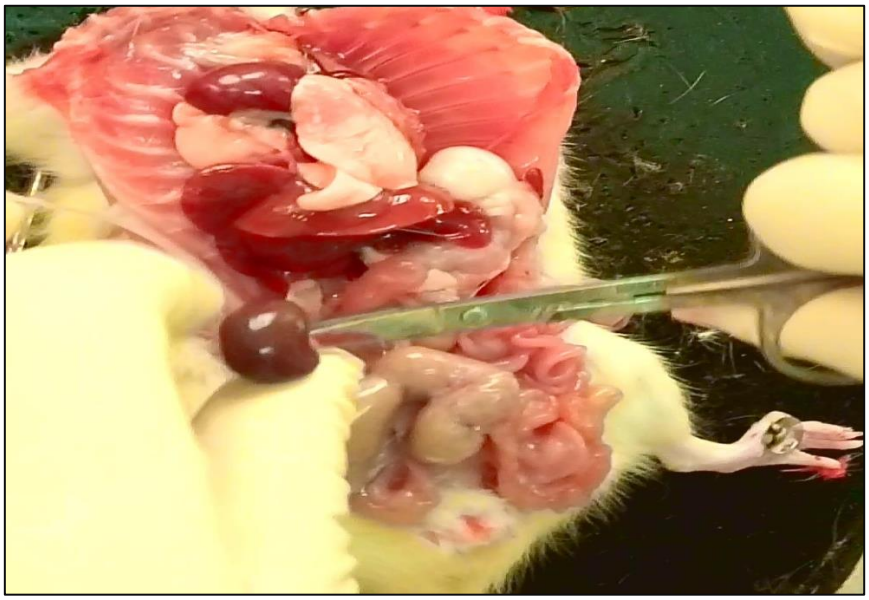


**Figure 14.** Schéma représente le prélèvement des reins.

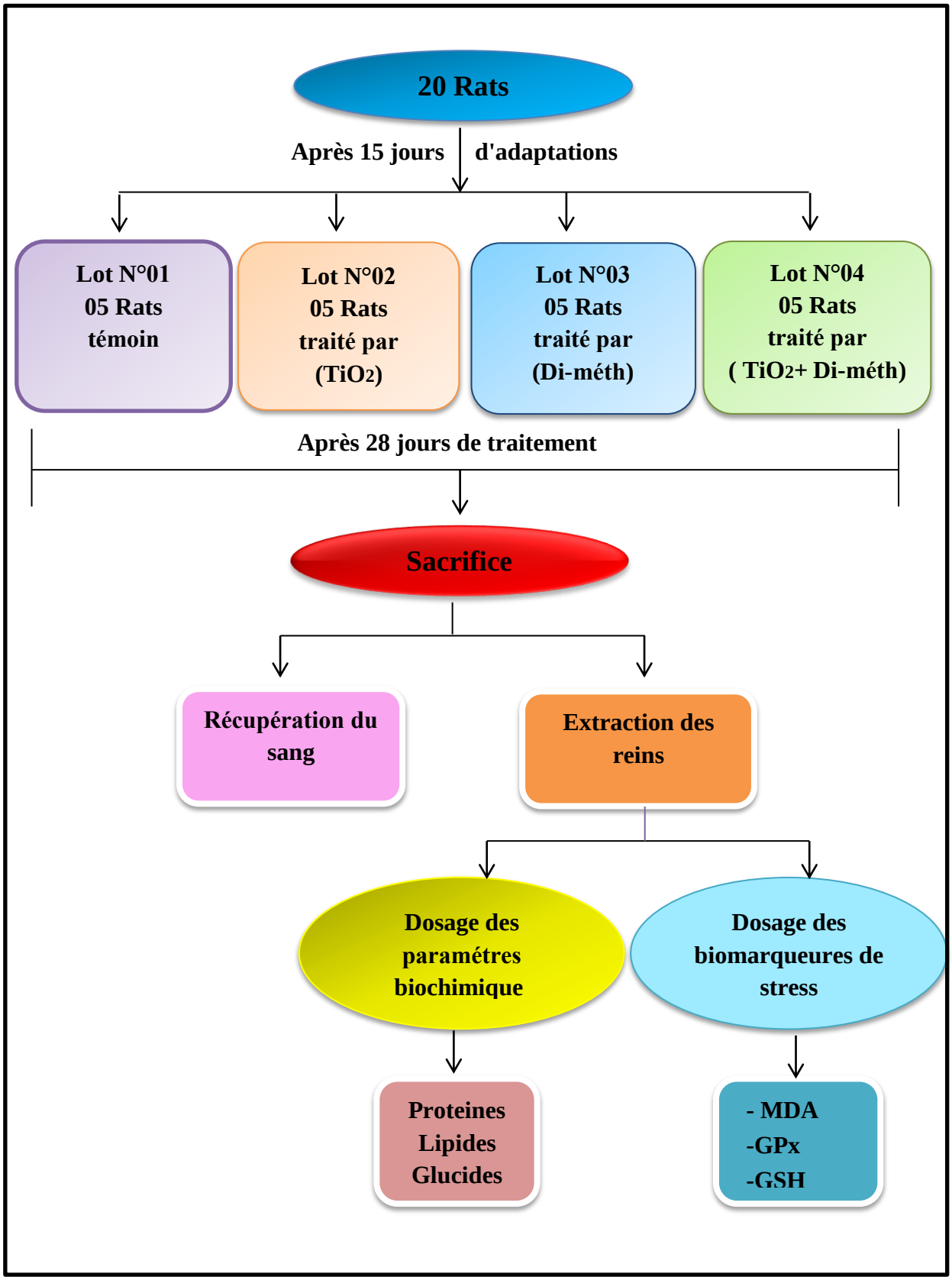



**Figure 15.** Schéma récapitulative du protocole expérimental.

## 3. Méthode de dosage

### 3.1. Evaluation des paramètres biochimiques

#### 3.1.1. Dosage des glucides

Le dosage des glucides solubles totaux a été fait selon la méthode de **(Duchateau et Florkin, 1959)** L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100ul d'homogénat dans des tubes à essai puis à ajouter 4ml d'Anthrone (dissoudre 150mg d'Anthrone dans 75ml d'acide sulfurique puis ajouter 25ml d'eau distillée, couleur verte, stockée à l'obscurité) ,en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 80°C pendant 10 min . Après refroidissement, on procède à la lecture à une longueur d'onde de 620nm. 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.

#### 3.1.2. Dosages des lipides

Les lipides tissulaires sont évaluée selon la méthode, **(Goldsworthy et *al*., 1972)** on utilise 100µl d'homogénat dans 1ml de TCA 20% ( 20g TCA+100ml d'eaux distillée ), on broyé et ont filter ce mélange ; et directement ont appliqué une centrifugation à 5000tours/min pendant 10min. Le culot est gardé dans tube contient 100ml du mélange Ether/Chlorophorme, et après centrifugé ce mélange a 5000tours/min pendant 10min, 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 sulfophosphovanillinique à 85% (0.38g vanilline+195ml acide orthphosphorique+55ml $H_2O$) et laissé ce mélange 30min à l'obscurité, la lecture 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).**

#### 3.1.3. Dosage des protéines

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est celle de **(Bradford, 1976)** qui utilis**e** la BSA 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 (10%) 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 (100mg BBC +50ml d'éthanol à 95%+ 100ml d'acide phosphorique à 85% et on complète avec l'eau distillée jusqua 1l). 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).**

### 3.2.Evaluation des paramètres de stress oxydatif

#### 3.2.1.Dosage du Malondialdéhyde (MDA)

Le dosage du MDA est réalisé selon la method de **(Buege and Aust, 1984)** Le principe de ce dosage est base sur la mesure colorimétrique de la réaction entre (TBA) et le (MDA) dans un milieu acide et chaud (100°C) , pour former un pigment roge.

**A. Préparation des homogénats**

A partir de 200mg d'organe avec tampon d'homogénation TP(Ph 7,4) puis centrifugation à 3000tours/min pendant 10min.

Une quantité de 375µl de surnageant est prélevée dans un tube sec, auquel est ajouté un volume de 150µl de la solution TBS (tris 50mM, NaCl (150mM ; pH7.4) et 375µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%), le mélange est Vortexé et centrifugé à 1000t/min pendant 10min. Un volume de 400µl est prélevé du surnageant auquel on ajoute 80µl du HCL 0.6M et 320µl de la solution tris-TBA (tris 26mM, TBA120mM). En fin, le mélange est vortexé et est ensuite incubé au bain marie à 80°C pendant 10minutes. La lecture de la densité optique des échantillons est mesurée par spectrophotométrie à 530 nm.

L'absorbance 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) :

$$[C]\left[\frac{nmol}{mg}\ \text{de protiènes}\right] = \frac{DO \times 10}{\varepsilon \times L \times X \times Fd}$$

- **C** : la concentration en nmole/mg de proteins.
- **DO** : densité optique lue à 530 nm.
- $\varepsilon$ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1{,}56.10^5$ M-/cm.
- **L** : Longueur de la cuve utilisée (1cm).
- **X** : concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).
- **Fd** : Facteur de dilution (Fd = 0.2083).

#### 3.2.2.Dosage de glutathion peroxydase (GPx)

L'activité enzymatique de la GPx est mesurée par la méthode de **(Flohe et Gunzler, 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 :

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

Un volume de 0.2ml de cytosol/matrice est récupéré dans un tube contenant 0.4ml de GSH 0.1mM et 0.2ml de tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150 Mm,PH , 7.4). Le mélange est incubé au bain marie à 25°C pendant 05min. 0.2ml d'H2O2 1.3mM est ajouté pour initier la réaction. Après 10min 1ml de TCA 1% (acide tri chloro-acétique) est rajouté dans le but d'arrêter la réaction et le mélange est mis dans la glace pendant 30min et centrifugé durant 10min a 3000tours/min. Un volume de 0.48 ml de surnageant est placé dans une cuve auquel on ajoute 2.2ml de solution tampon TBS avec 0.32ml de DNTB 1mM. Ce mélange formé un composé coloré et sa densité optique est mesurée à 412nm chaque 30sec pendant 05min.

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

$$\text{GPx ( µmol.mg de protéine)} = \frac{(DOe - DOb).0{,}04}{DOb}$$

• **DO**: échantillon : Densité optique de l'échantillon.

• **DO:** étalon: Densité optique de l'étalon.

• **0.04**: Concentration de substrat (GPx).

### 3.2.3.Dosage de glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode 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'acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'échantillon (cytosol/matrice) doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalycilique (0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion. Brièvement ; les échantillons (200mg de tissu) sont mis individuellement en présence de 0,8 ml de solution d'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) à 0,02M. Le mélange mis dans des glaçons est broyé à l'aide d'un pilon en porcelaine. L'homogénat est ensuite déprotéinisé en prenant 0.8ml de ce dernier

auquel on ajoute 0.2ml d'une solution d'acide sulfosalycilique (SSA) à 0.25%. Le mélange est vortexé et laissé pendant 15min dans un bain de glace, et centrifugé ensuite pendant 5min à 1000tours/min. 0.5ml du surnagent est prélevé auquel est ajouté 1ml de tampon tris-HCL+EDTA (0.02M), pH 9.6. Au mélange est ajouté 0.025ml de l'acide 5,5`-dithio-bis-2-nitrobenzoique (DTNB) à 0.01M dissous dans le méthanol absolu. Le mélange est laissé reposer pendant 5min à température ambiante et l'absorbance (A) est mesurée à 412nm.

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

$$\text{GSH}\left[\text{M}\ \frac{\text{GSH}}{\text{mg}}\ \text{GSH/mg des protiénes}\right]\frac{\text{DO}\times 1\times 1{,}525}{13100\times 0{,}8\times 0{,}5}$$

- **DO :** la densité optique.
- **1:** Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0,8 ml de l'homogénat + 0,2ml de l'acide 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 d'absorbance (concernant le groupement (–SH) à 412 nm) .
- **0,8 :** Le volume de l'homogénat.
- **0,5 :** Le volume du surnageant trouvé dans un 1,25ml.

## 4. Analyses statistique

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 tukay. Ces calcules ont été effectués à l'aide de logiciel MINITAB® 18.01.

- le résultat de comparaison comme suivant :

- **p > 0,05 =** la différence n'est pas significative,
- **(*) 0,05 > P > 0,01 =** la différence est significative,
- **(**) 0,01> P > 0,001 =** la différence est hautement significative,
- **(***) P < 0,001 =** la différence est très hautement significative.