I. Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de l'hôpital Bougrara Fouad-Ouenza- et au niveau de laboratoire de Toxicologie du département de biologie de l'université Larbi Tébessi de Tébessa.

I. Matériel

Notre recherche a été menée sur 26 patients, 12 hommes et 14 femmes programmée pour l'intervention chirurgicale, d'âge entre (40-70 ans), de poids (entre 70-112 kg) et de certains pathologies (diabète, hypertension artériels…) , auxquels nous avons prendre des prélèvements sanguins pour dosé les paramètres de la défense antioxydants dans le plasma et les globules rouges (les érythrocytes) : le GSH, GPx, et GST et un marqueur de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA) et ceux-ci pré et postopératoire.

L'objectif de travail : est d'évaluer les changements de statut redox chez les patients postopératoire.

1. Prélèvement et préparation des échantillons

Les prélèvements sanguins sont réalisés au niveau des veines de pli du coude. Le sang prélevé est recueilli dans des tubes anti coagulant (EDTA) et des tubes secs, étiquetés pour chaque patient (avant et après l'intervention), puis centrifugés à 2000 tours /10 min.

Le culot est récupéré pour préparer, le lysat érythrocytaire on diluant dix fois avec l'eau distillé, puis incubé pendant 15 min au réfrigérateur (2-8C°). Celui-ci est centrifugé à 4000 tours pendant 15 min afin d'éliminer les débris cellulaire.

Le surnageant récupéré constitue le lysat érythrocytaire qui servira pour le dosage des marqueurs érythrocytaire du statut oxydant/antioxydant.

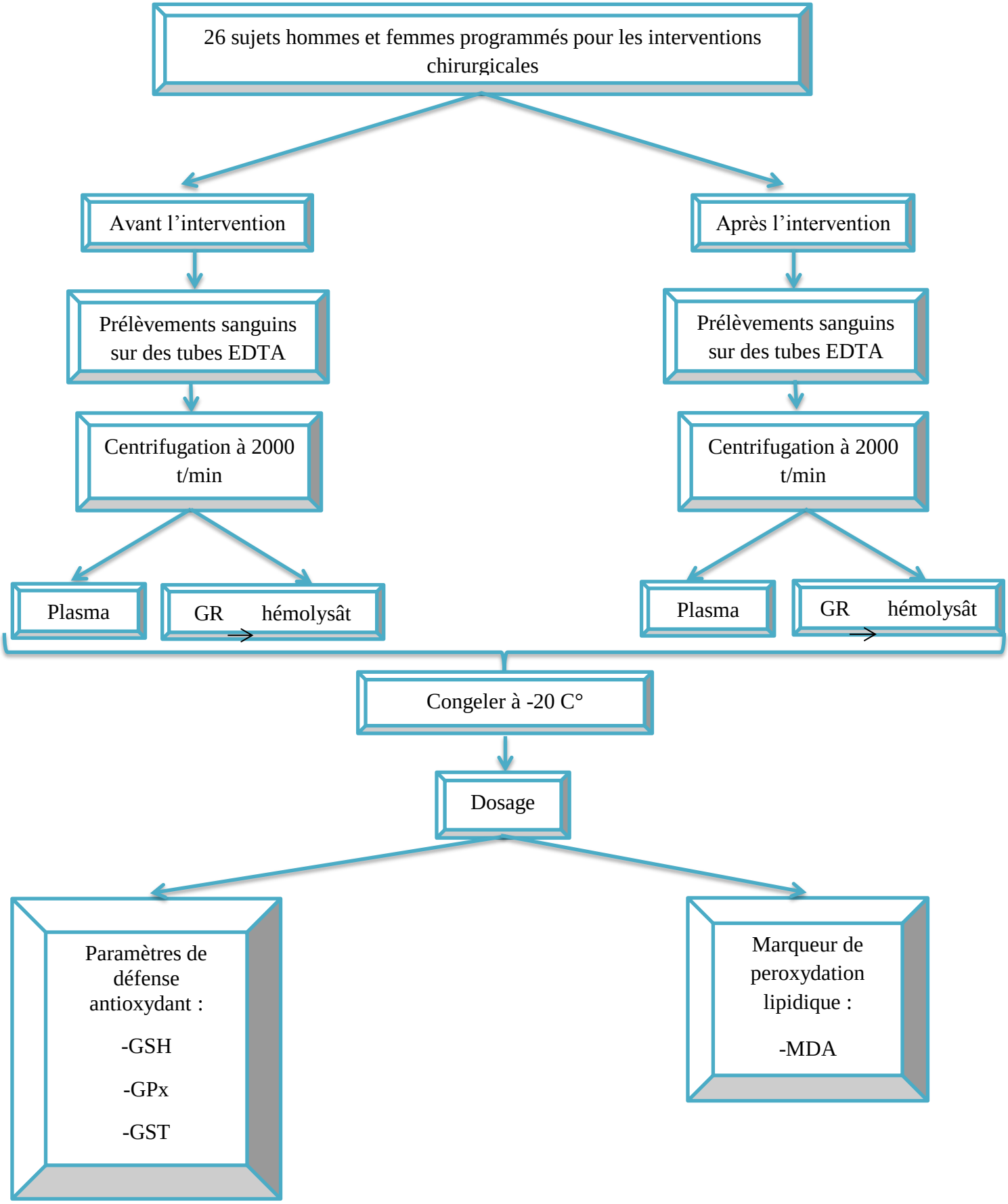


Figure 12 : Schéma récapitulatif de protocole expérimental.

II. Méthodes

1. Détermination de statut oxydant/antioxydant

1.1. Dosage de Glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion est réalisé selon le procédé de **(Weckberker et Cory, 1988)**. Le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2- nitro 5 mercapturique résultant de la réduction de l'acide5-5'-dithio-bis-2- nitrobénzoique (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré a une longueur d'onde de 412 nm.

Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation (par l'acide sulfosalycilique 0.25%) afin de protéger les groupements-SH du glutathion.

-Protocole expérimentale :

-l'échantillon 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) a412nm.

1.2. Dosage de Glutathion peroxdase (GPx)

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

-Protocole expérimentale :

-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) a 0.1 MM (réaction enzymatique) +0.2 ml TPa 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/mi n.

-0.48 ml de surnageant et place dans une cuve+2.2 ml de Na2HPO4 (0.32M) +0.32 ml de DNTB (1MM).

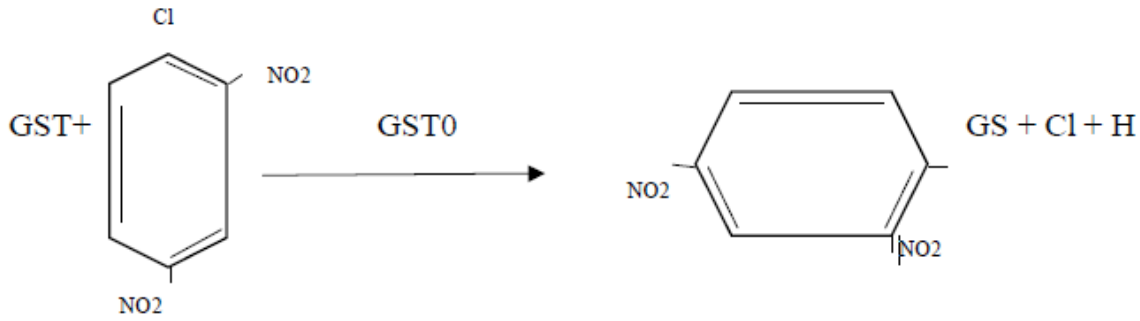
-Formation d'un composé colore, mesurer la densité optique à 412 nm dans les 05 min.

-La détermination (calcule) de l'activité de la GPx se fait de la façon suivant :

Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.

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

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 2-4 Di nitrobenzène permettant de mesurer l'activité de GST selon la réaction suivante :



-Protocole expérimentale :

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 éthanol, 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.

1.4. Dosage de 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 3ou 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**.

Le 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 (voir figure 13).

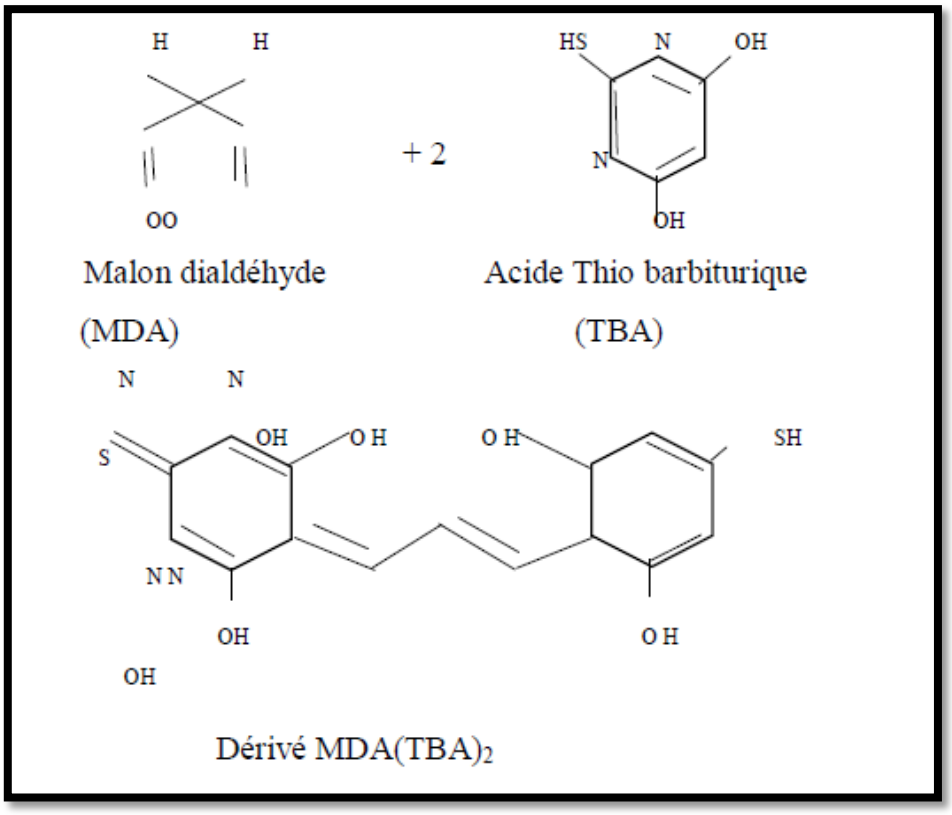


Figure 13 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide Thiobarbiturique.

-Protocole expérimental :

- ✓ Prélever 375 µl de l'échantillon (plasma ou hémolysat).
- ✓ Ajouter 150 µl de la solution tampon 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 tours/min pendant 10 min.

- ✓ Prélever 400 µl de 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 min.

La densité optique a été enregistrée à une longueur d'onde de 530 nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

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 nmoles/mg de protéines ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56\ 10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

III. Méthode statistique

La saisie des données a été réalisée à l'aide du logiciel Excel 2010. Les tests statistiques ont été réalisés par le logiciel de Minitab version 13.0.

Nous avons utilisé le test (*t*) de Student pour les comparaisons statistiques. Les résultats sont exprimer en moyenne ± un écart type moyen (SEM), avec un seuil de significativité $p < 0.05$.