1.1. Matériel

1.1. 1. Matériel végétal

La poudre du curcuma est conservée à la température ambiante dans des contenants hermétiquement à fermés , l'abri de la lumière vive jusqu'à le début de l'expérimentation. Pour la préparation de l'extrait de curcuma, nous avons met 10g de curcuma en poudre avec 100ml d' eau distillée dans un bain marie à 60°C pendant 2 heures puis nous avons filtré par le papier filtre. L'extrait va etre dilué et administré aux rats par voie orale **(Asadi et al .,2014)**.



Figure 27 . Poudre de curcuma **(shahid , 2016).**

1.1.2. Matériel biologique animal

Les expérimentations ont été effectuées au niveau de laboratoire de l'université L'arbi Tébessi de Tébessa, sur 20 rats blancs mâles Rattus rattus de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Les rats utilisés âgés de neuf semaines et ayant un poids corporel entre 200 et 250 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans les recherches scientifiques.



Figure 28. Matériel animal.

1.1.3. Matériel chimique

Dans ce travail, nous avons utilisé d'une part , les nanoparticules à base d'oxyde de Fer (Fe_2O_3) sous forme de solution à une dose de 10mg/kg/jour **(Farid et al .,2015)** (pour le traitement des rats et , d'autre parts le curcume (diferylol-methan) en solution aqueuse à une dose 20 mg/Kg/jour **(Asadi et al .,2014).**

1.1.4. Elevage des rats

Les rats ont été répartis en quatre (04) lots à raison de cinq (05) rats par lot. Ils ont été soumis à une période d'adaptation de 15 jours dans l'animalerie de département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Tébessa. La température ambiante est de 23±2°C et une photopériode naturelle 12/12H avec une hygrométrie de 60 %. Les rats 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 sont nettoyées et la litière est changée une fois par deux jour dswjusqu'à la fin de l'expérimentation.



Figure 29. Elevage des rats.

1.1.5.Mesure de poids

La mesure de poids est effectuée sur les rats toujours pendant la durée d'élevage, au cours du traitement à l'aide de balance (Aston®).



Figure 30. Mesure de poids**.**

1.1.6. Traitement des rats

Après la période d'adaptation de tous les rats (15 jours), les rats ont été répartis au hasard en quatre groupes de cinq (5) rats, les rats ont été traités pendant 28 jours comme suit :

- **Groupe 1 :** le groupe témoin.
- **Groupe 2 :** les rats ont été traités par Fe_2O_3 en raison de 10 mg/Kg par voie orale.
- **Groupe 3 :** les rats ont été traité par la mixture de Fe_2O_3 et le diferylol-methane (10mg/Kg et 20 mg /Kg) par voie orale.
- **Groupe 4 :** les rats ont été traités par le diferylol-methane en raison 20 mg/Kg par voie orale.



Figure 31 . Traitement des rats.

1.1.7. Sacrifice et prélèvements des échantillons

❖ **Sacrifices des animaux**

A la fin de la période du traitement, les rats sont mis à jeun pendant une nuit. Ils sont sacrifiés par décapitation, le sang a été immédiatement recueilli dans les tubes héparinés (vert):

- Le sang contenu dans des tubes héparinés a subit une centrifugation à 5000 tours/min pendant 15 minutes . Le sérum est utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques (TGO, TGP).



Figure 32 . Sacrifices des rats.

❖ **Prélèvement de certains organes**

Après la dissection, le foie est soigneusement prélevé, rincé avec NaCl et ensuite pesé . Une partie du foie est utilisé pour la préparation de l'homogénat et l'autre est conservée pour faire des coupes histologiques. Les homogénats des organes sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (protéines, lipides, glucides, MDA, GSH et GPx).

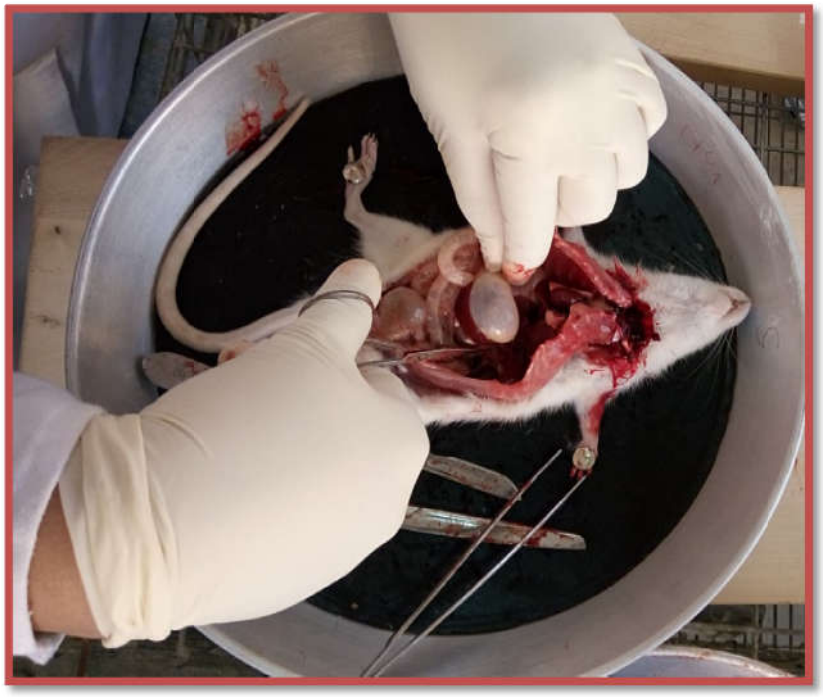


Figure 33. Prélèvement de certains organes des rats**.**

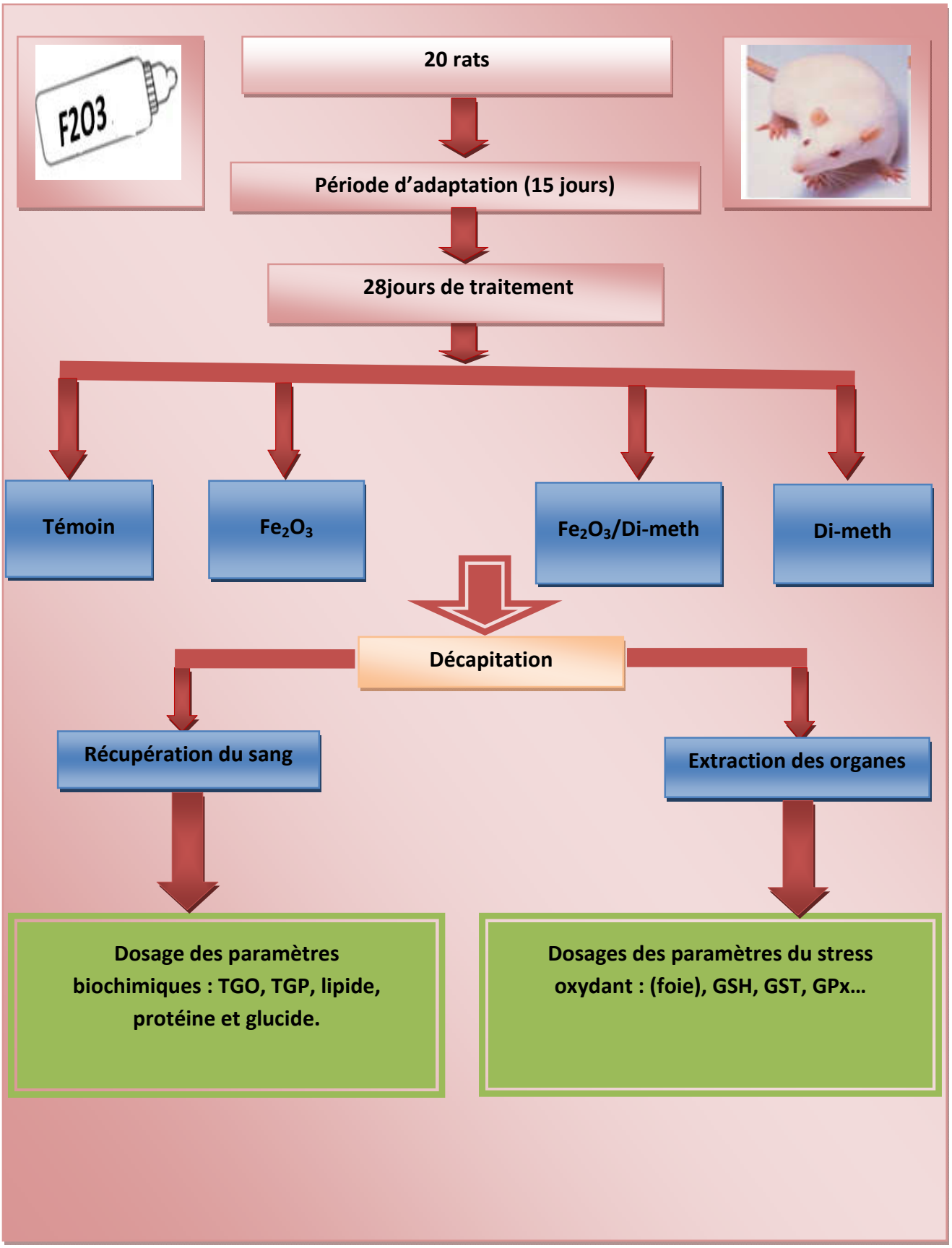


Figure 34 .Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

1.2. Méthodes

1.2.1. Dosage des paramètres biochimiques

1.2.1.1. Enzymes sériques

Les paramètres biochimiques mesurés sont : aspartate aminotransférase (TGO), alanine aminotransférase (TGP).

L'aspartate aminotransférase (TGO)

❖ **Principe** : selon kit de Biomaghreb

Détermination cinétique de l'activité Aspartate aminotransférase. La réaction est initiée par addition de l'échantillon au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :

$$2\ \text{Oxoglutarate} + \text{L-Aspartate} \xrightarrow{\text{GOT}} \text{Glutamate} + \text{Oxaloacétate}$$

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

Le taux de la diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité Aspartate amino transférase dans l'échantillon.

❖ **Matériel et Réactif**

- Spectrophotomètre, micropipette, tube sec, étuve et centrifugeuse.
- Réactif 1(L- Aspartate) et Réactif 2 (Oxoglutarate).

❖ **Mode opératoire**

Le prélèvement du sang pour le dosage du TGO s'effectue dans des tubes héparines.

- On prend cinq tubes pour chaque échantillon ;
- On met 1000 µl du réactif 1 (R_1) dans chaque tube ;
- On met 100 µl de la solution du standard dans le tube 2, 100 µl du sérum dans le tube 5 et le tube 1 est un blanc.

❖ **Résultat**

Lecture : spectrophotomètre automatique

L'aspartate aminotransférase (TGP)

❖ **Principe** : selon kit de Biomaghreb

Détermination cinétique de l'activité alanine aminotransférase. La réaction est initiée par addition de l'échantillon du patient au réactif. Le schéma réactionnel est le suivant :

$$2\ \text{Oxoglutarate} + \text{L- Alanine} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{Glutamate} + \text{Pyruvate}$$

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

Le taux de la diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité alanine transférase dans l'échantillon.

❖ **Matériel et Réactifs**

- Spectrophotomètre, micropipette, tube sec, centrifugeuse et étuve.
- Réactif 1(Alanine) et Réactif 2 (Oxoglutarate).

❖ **Mode opératoire**

Le prélèvement du sang pour le dosage du TGP s'effectue dans des tubes héparines.

- On prend cinq tubes pour chaque échantillon ;
- On met 1000 µl du réactif 1 (R_1) dans chaque tube ;
- On met 100 µl de la solution du standard dans le tube 2, 100 µl du sérum dans le tube 5 et le tube 1 est un blanc.

❖ **Résultat**

Lecture : spectrophotomètre automatique

1.2.1.2. Paramètres métaboliques

Préparation de l'homogénats des organes

L'extraction et le dosage des glucides, lipides et protéines ont été réalisés selon le procédé de **(Shibko et al., 1966)**. Les échantillons témoins et traités sont broyés à l'aide d'un broyeur magnétique dans l'acide trichloracétique (TCA) à 20% (200 mg d'organe 1ml de TCA). Après une première centrifugation (5000 tours/mn, pendant 10 mn), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides. Au culot I, on ajoute 1 ml du mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 tours/mn, pendant 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II. Le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides et le culot II, dissout dans le NaOH (0,1N), servira au dosage des protéines.

Dosage des protéines tissulaires

❖ **Principe**

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de **(Bradford, 1976)** qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie (BBC) comme réactif et (B.S.A) comme standard. La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une solution mère de B.S.A. (1 mg/ml) et le B.B.C (conservation environ 21 jours à 4°C).

❖ **Mode opératoire :**

- 100 mg de BBC + 50 ml d'éthanol Agitation pendant deux heures ;
- 100 ml d'acide orthophosphorique sont alors ajoutés et le tout est complété à 1000 ml avec de l'eau distillée ;
- Le dosage des protéines a été effectué dans une fraction aliquote (100 ml) ;
- Les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595 nm.

❖ **Calcul de la concentration des protéines**

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

Dosage des lipides tissulaires

❖ **Principe**

Le taux de lipides est déterminé selon la méthode de **(Goldsworthy et al. 1972).**

- Utilisé la vanilline comme réactif (0,38g de vanilline, 195ml d'acide orthophosphorique à 85% et 55 ml d'eau distillée) et une solution mère de lipides (2,5mg/ml) comme standard.
- Additionné 1 ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les tubes sont chauffés dans un bain marie (100°C pendant 10 min) ; de chaque tube 200 µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5 ml de réactif.
- Les absorbances ont été lues après 30 min d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm.

❖ **Calcul de la concentration des lipides**

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

Dosage des glucides tissulaire

❖ **Principe**

Le dosage des glucides est réalisé selon la méthode de **(Duchateau et Florkin, 1959).**

Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard.

❖ **Mode opératoire**

- Additionner à une fraction aliquote de 100 µl de surnageant des différents échantillons, 4 ml de réactif d'anthrone.
- Chauffager le mélange dans un bain marie (80°C pendant 10 min) une coloration verte se développe.
- L'intensité de la coloration mesurée à une longueur d'onde de 620 nm.

❖ Calcul de la concentration des glucides

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

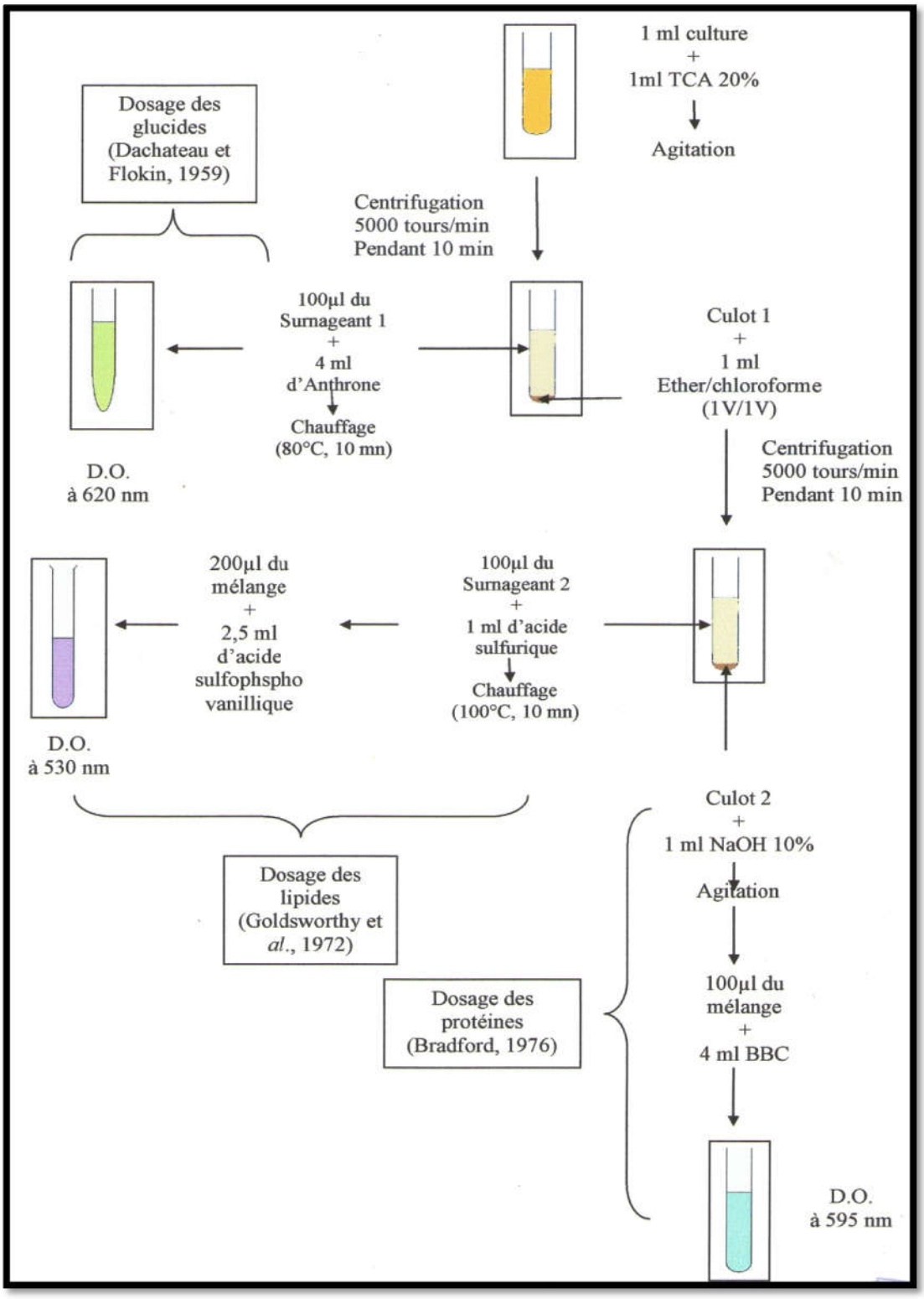


Figure 35 .dosage des paramètres metaboliques **.**

1.2.2. Dosage des paramètres du stress oxydant

1.2.2.1. Dosage des biomarqueurs non enzymatiques

- **Malonaldéhyde (MDA)**

❖ **Principe**

Les malondialdéhydes (MDA) sont dosé selon la méthode de **(Buege and Aust, 1984).** Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique de la réaction entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (MDA) dans un milieu acide et chaud (100°C) en donnant un produit rouge brun dont l'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm.

❖ **Protocole expérimental**

- Préparer les homogénats à partir de 200 mg d'organe avec tampon d'homogénation TP (pH = 7,4) ;
- Centrifuger à 3000 tours/min pendant 10 min ;
- Prélever 375 µl de surnageant ;
- Ajouter 150 µl de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) ;
- Ajouter 375 µl de solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) ;
- Agiter et centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min ;
- Prélever 400 µl de surnageant ;
- Ajouter 80 µl d'HCl 0.6 M ;
- Ajouter 320 µl de solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM) ;
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 min ;
- Lire La densité optique à λ = 530 nm.

❖ **Calcul de la concentration MDA**

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

- C : la concentration en nmol/mg de protéines.
- DO : densité optique lue à 530 nm.
- ε : Coefficient d'extinction molaire du MDA = 1,56.105 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).

Glutathion (GSH)

❖ Principe

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de la densité optique de l'acide 2-nitro-5 mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman ou DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Une fois préparé, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique à 0,25% afin de protéger les groupements (-SH) du glutathion **(Weeckbeker et Cory, 1988)**.

❖ Mode opératoire

- Préparer les homogénats à partir de 1ml de culture avec tampon phosphate EDTA (0,02M);
- Prélever 0,8 ml de l'homogénat auquel y ajouter 0,2ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25% ;
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace ;
- Centrifuger à la vitesse de 1000 tours/min pendant 5min ;
- Relever 0,5 ml de surnagent ;
- Ajouter au mélange : 1 ml de tampon Tris-EDTA (0,02M d'EDTA, pH 9,6), 0,025 ml de DTNB et 0,5 ml du surnageant ;
- Reposer pendant 5 minutes à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. La réaction colorimétrique se développe instantanément ;
- Mesurer les absorbances à 412 nm contre le blanc.

❖ Calcul de la concentration

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

GSH [M (GSH/mg) GSH/mg des protéines] DO * 1 * 1,525/13100 * 0,8 * 0,5

- **DO :** la densité optique.
- **1** : Le volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.
- **1,525** : Le 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).
- **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 1,25 ml.

1.2.2.2. Dosage des biomarqueurs enzymatiques

L'activité du glutathion peroxydase (GPx)

❖ **Principe**

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été 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 :

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

❖ **Mode opératoire**

- Préparer les homogénats à partir de 200 mg d'organe avec tampon d'homogénation TP (pH = 7,4) ;
- Centrifuger à 3000 tours/min pendant 10 min ;
- Prélever 0.2 ml de surnageant ;
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM) ;
- Ajouter 0.2 ml de solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) ;
- Incuber au bain marie à 25°C pendant 5 min ;
- Ajouter 0.2 ml de H_2O_2 (1.3 mM) pour initier la réaction, laissé agir pendant 10 min.
- Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction ;
- Mettre le mélange dans un bain de glace pendant 30 min ;
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /min ;
- Prélever 0.48 ml de surnageant ;
- Ajouter 2.2 ml de solution tampon TBS ;
- Ajouter 0.32 ml de DTNB (1mM) ;
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

❖ **Calcul de la concentration**

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

GPx (µmol. Mg de protéine) = (DOe – DOb) 0,04/DOb

- DOe : Densité optique de l'échantillon.
- DOb : Densité optique de l'étalon.
- 0.04: Concentration de substrat (GSH).

1.3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de six répétitions (moyen ± écart type), et pour mieux visualiser en utilisant l'office Excel 2007 pour représentés ces résultats sous forme des graphiques et des histogrammes. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab® 17.1. La signification de différence entre le lot témoin et les lots traités est vérifiée en utilisant le test ANOVA . Le résultat de comparaison se présente comme suit :

- ✓ $P > 0,05 \longrightarrow$ la différence n'est pas significative.
- ✓ (*) $0,05 > P > 0,01 \longrightarrow$ la différence est significative.
- ✓ (**) $0,01 > P > 0,001 \longrightarrow$ la différence est hautement significative.
- ✓ (***) $P < 0,001 \longrightarrow$ la différence est très hautement significative.