



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

**Etude du profil d'expression de l'alpha fœtoprotéine sur la
structure testiculaire du lapin supplémenté par l'huile
essentielle de thym. Etude in silico et
immunohistochimique**

Présenté par :

Date de soutenance : 17 /07/2022

* MEHALLI Noual

* KHELIFA Fella

Devant le jury :

| | | |
|-----------------------------|------------------------------|---------------|
| Mme BENMANSOR | MCB / USDB1 | Présidente |
| Mme CHAKHMA | MCB / USDB1 | Examinatrice |
| M ^{me} Khaldoun H. | MCA / USDB1 | Promotrice |
| Mr ZIANI B. | MCA / CRAPC Bousmail | Co-Promoteur |
| Mme DJENNAN N. | Professeur / CHU Bab El Oued | Co-Promotrice |

Promotion 2021-2022



Remerciement

Tout d'abord, nous rendons grâce a Dieu le tout puissant de nous avoir

Donné le courage, la volonté, et la force nécessaire pour réaliser ce

Travail

**A Mme KHALDOUN HASSINA, encadreur de notre mémoire, a qui j'exprime mon
remerciement pour son implication dans ce travail de mémoire qui n'aurait jamais pu
aboutir sans ses nombreux conseils. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour votre
aide et votre soutien.**

Que mes vifs remerciements aillent à Monsieur :

Mme BNMANSOUR qui me fait l'honneur de présider ce travail.

Mme CHAKHMA pour avoir accepté d'examiner cette mémoire

Mr ZIANI mon remerciement pour son implication dans se travail

**Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce
travail en particulier à Pr DJANNANE et les techniciens du laboratoire d'anaphate de**

Beb el-OUED .

A toutes et tous, un grand merci



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents
Pour leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, pour leurs
amour et patience qu'ils ont toujours manifesté à mon égard, qu'ils
trouvent ici le témoignage de mon profond respect et gratitude.

Mes très chers frères

Mes très chères sœurs

Mes amis

Merci beaucoup à tout le monde

مهنابل نوبل





Dédicaces

Offre mes remerciements à dieu tout - puissant, qui a aidé dans mes Étude et ma honoré avec succès.

Je remercie tous mes professeurs qui ont aidé dans mon parcours Académique, en particulier mon professeur mosaoui souad et mon professeur Djamel, et je dédie les fruits de mes connaissances et mon

Travail à l'âme robuste de ma mère que dieu ait pitié d'elle.

Il est également mon père bien - aimé que dieu le protège.

.

Enfin je dédie cette réalisation à âme mon oncle samedi Ahmed qui a donné la force de terminer mes études, et mon marié beaucoup, et ma soeur houria et je te Souhaite une vie pleine de joie et de bonheur.

Merci infiniment.

KHELIFA FELLA



Liste des Tableaux

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Tableau I | Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i> (Morale, 2002) | 1 |
| Tableau II | Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> identifiée par CGSM | 26 |
| Tableau III | Docking scores obtenus par le logiciel Autodock vina | 28 |

Liste des figures

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| Figure 1 | <i>Thymus vulgaris</i> .L | 1 |
| Figure 2 | Illustration de l'aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i> | 1 |
| Figure 3 | Appareil génital masculin | 5 |
| Figure 4 | Schéma représente l'anatomie et l'histologie du testicule | 6 |
| Figure 5 | Représentation schématique du testicule | 7 |
| Figure 6 | Schéma représente la spermatogenèse | 8 |
| Figure 7 | Schéma représentant la régulation hormonale de la fonction testiculaire . | 9 |
| Figure 8 | Structure protéique de l'AFP | 10 |
| Figure 9 | structure du gen énétiqes d'AFP | |
| Figure 10 | Représente le docking moléculaire | 12 |
| Figure11 | Principe général de docking moléculaire | 12 |
| Figure 12 | Instrument GC/MS (système Agilent 7890/5975, Wilmington, DE, USA | 18 |
| Figure 13 | Aspect anatomique de l'appareil génital mâle et mise en cassette des testicules | 20 |
| Figure14 | Automate de circulation | 21 |
| Figure15: | Inclusion à la paraffine | 22 |
| Figure16 : | coupe au microtome | 22 |
| Figure17 | Coloration et montage entre lame et | 22 |
| Figure 18 : | Réalisation des coupes et automate de l'IHC | 24 |
| Figure19 : | Application de l'anticorps spécifique | 24 |
| | | 27 |
| Figure20 | Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> | |
| Figure21 | Structure tridimensionnelle d'AFP | 28 |
| Figure22 | Grid box délimitant la zone du site active de l'AFP | 29 |
| Figure.23 | le complexe récepteur (AFP)/Ligand (Carvacrol) | 29 |
| Figure.24. | Zone d'interaction du Ligand (Carvacrol) dans le site active de l'AFP | 30 |
| Figure25 | structure tridimensionnelle de AFP | 30 |
| Figure26. | A. Protein_ligand interactions 3D, site d'interaction et les résidus d'acides aminés évoqués dans le site d'interaction / B. 2D interaction entre le Carvacrol et l'AFP | 31 |

Liste des planches

- Planche 1** Histologie du testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : **33**
X400 coloration &E
- Planche 2** Histologie du testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : **34**
X400 coloration H&E
- Planche 3** Expression immunohistochimique de la protéine alpha **35**
foetoprotéine dans testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : X 400
- Planche 4** Expression immunohistochimique de la protéine alpha **36**
foetoprotéine dans testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : X 400
- Planche 5** Aspect histologique du testicule des lapins traités par huile de **37**
Thym (A): X100, (B) : X400 coloration HE
- Planche 6** Aspect histologique du testicule des lapins traités par huile de **38**
Thym (A): X100, (B) : X400 coloration HE
- Planche 7** Expression immunohistochimique de la protéine AFP dans le **38**
testicule chez le lapin traité par huile de Thym (A): X100, (B) : X 400
- Planche 8** Expression immunohistochimique de la protéine AFP dans le **40**
testicule chez le lapin traité par huile de Thym (A): X100, (B) : X 400

RESUME

Le présent travail vise à évaluer l'expression d'un marqueur moléculaire l'alpha foetoprotéine, une protéine de la famille des albumines, et l'activité protectrice potentielle de l'huile essentielle de thym (HET) (*Thymus vulgaris*) administré pendant 21 jours à des lapins mâles sur le parenchyme testiculaire. Dans ce cadre, une caractérisation par GC-MS de l'HET nous a permis d'identifier le composé majoritaire de notre huile essentielle à savoir le carvacrol. De plus une étude histologique et immunohistochimique de l'expression de l'alpha foetoprotéine suivi par l'étude par docking de l'affinité moléculaire du carvacrol et de l'alpha foetoprotéine ont été réalisés. Le docking moléculaire a été réalisé à l'aide du logiciel Auto DockVina, les récepteurs moléculaires sont téléchargés depuis la Protein Data Bank (PDB), le ligand Carvacrol est dessiné par le logiciel MarvinSketch et enregistré sous forme de fichier 3D. pdb, Californie, États-Unis). Nos résultats du docking moléculaire montrent une faible affinité du carvacrol avec l'alpha foetoprotéine et sur le plan histologique le parenchyme testiculaire des lapins coadministrés par l'HET, montre une architecture tissulaire similaire à celle des lapins témoins. Les résultats de l'examen immunohistochimique montrent une expression très faible à négative de l'AFP au niveau du tissu testiculaire des lapins témoins et supplémentés par l'HET. Le signal immunoréactif AFP positif est localisé au niveau des tubes séminifères dans les cellules germinales au stade spermatide et spermatozoïdes. On conclut que les lapins supplémentés par l'HET ont une structure testiculaire similaire à celle du groupe témoin, sans lésions histopathologiques.

Mots clés : Alpha foetoprotéine, testicule, Lapin, Histologie, Immunohistochimie, Docking moléculaire.

ABSTRACT

The present work aims to evaluate the expression of a molecular marker alpha fetoprotein, a protein of the albumin family, and the potential protective activity of thyme essential oil (TEO) (*Thymus vulgaris*) administered for 21 days to male rabbits on the rabbits on the testicular parenchyma. In this context, a GCMS characterization of the TEH allowed us to identify the main compound of our essential oil namely carvacrol. In addition, a histological and immunohistochemical study of expression of alpha fetoprotein followed by the study by docking of the molecular affinity of carvacrol of carvacrol and alpha fetoprotein were performed. The molecular docking was using Auto DockVina software, the molecular receptors were downloaded from the Protein from the Protein Data Bank (PDB), the Carvacrol ligand was drawn by the software MarvinSketch software and saved as a 3D file. pdb, California, USA). Our molecular docking results show a low affinity of carvacrol with alpha fetoprotein and histologically the testicular parenchyma of rabbits rabbits co-administered with HET shows a tissue architecture similar to that of control rabbits. control rabbits. The results of the immunohistochemical examination show a very low to negative expression of negative expression of AFP in the testicular tissue of control and HET supplemented rabbits. HET supplemented rabbitsThe AFP-positive immunoreactive signal is localized in the germ cells in the spermatid and spermatozoon stage. We conclusion, rabbits supplemented with HET have a testicular structure similar to that of the control group, without histopathological lesions

Keywords: Alpha fetoprotein, testis, Rabbit, Histology, Immunohistochemistry, Molecular docking

المخلص

يهدف العمل الحالي إلى تقييم تعبير العلامة الجزيئية ألفا فيتوبروتين ، وهو بروتين عائلي من الألبومين ، ونشاط وقائي محتمل زيت أساسي من الزعتر (*Thymus vulgaris*) (HET) تدار لمدة 21 يوماً حتى ذكور الأرانب على حمة الخصية. في هذا السياق ، سمح لنا التوصيف بواسطة GCMS لـ HET بتحديد المركب الرئيسي لزيتنا الأساسي وهي كارفاكرول. بالإضافة إلى ذلك ، دراسة نسيجية وكيميائية مناعية التعبير عن بروتين ألفا فيتوبروتين متبوعاً بدراسة الالتحام من التقارب الجزيئي تم صنع كارفاكرول وبروتين ألفا فيتوبروتين. تم الالتحام الجزيئي يتم تنزيل المستقبلات الجزيئية التي يتم إجراؤها باستخدام برنامج Auto DockVina من بنك بيانات البروتين (PDB) ، يتم رسم ارتباط Carvacrol بواسطة البرنامج تم حفظ MarvinSketch كملف ثلاثي الأبعاد pdb ، كاليفورنيا ، الولايات المتحدة الأمريكية). ملكنا أظهرت نتائج الالتحام الجزيئي تقارباً منخفضاً من كارفاكرول مع ألفا بروتين فيتوبروتين وتشريحاً لحمة الخصية للأرانب تدار بالاشتراك مع HET ، يُظهر بنية نسيجية مشابهة لتلك الموجودة في الأرانب شهود عيان. أظهرت نتائج الفحص الكيميائي المناعي جداً منخفض إلى سلب AFP في أنسجة الخصية من أرانب التحكم و مكمل بـ HET. يتم ترجمة إشارة AFP الإيجابية المناعية إلى الأنايب المنوية في الخلايا الجرثومية في مرحلة السائل المنوي والحيوانات المنوية. على استنتاج الأرانب المكمل بـ HET لها بنية خصية مماثلة المجموعة الضابطة ، بدون آفات نسيجية مرضية

INTRODUCTION

Chapitre I : Rappelle bibliographique.**1. *Thymus vulgaris* L.**

| | |
|--|-----------|
| I.1 Monographie de la plante étudiée : le thym commun (<i>Thymus vulgaris</i> L.) | 3 |
| 1.1 Définition | 3 |
| 1.2. Description morphologique | 3 |
| 1.3. Classification botanique | 3 |
| 1.4. Composition chimique d'huile essentielle de <i>thymus vulgarus</i> | 4 |
| 1.5. Usage thérapeutique | 4 |
| 1. 6.Propriété antioxydant | 4 |
| 1.7 .Activité antibactérienne | 4 |
| 1.8. Propriété antivirale | 5 |
| 1.9. Activité bactéricide du thymol et du carvacrol | 5 |
| 1.10. <i>Thymus vulgaris</i> et la reproduction masculin | 5 |
| 1.11. Toxicité de l'HE du thym | 5 |
| 1.12. Modes d'obtention des huiles essentielles | 5 |
| 2. rappelle anatomie-histologique de l'organe | 6 |
| 2.1. Rappels sur l'appareil génital male | 6 |
| 2.2. Testicule | 6 |
| 2.3. Anatomie générale | 6 |
| 2.4. Embryologie | 7 |
| 2.5. Histologie | 7 |
| 2.6. Anatomie microscopique | 8 |
| 2.7. Spermatogénèse et spermiogénèse | 8 |
| 2.8. Régulation hormonale de la fonction testiculaire | 9 |
| 3. Marqueur moléculaire cible alpha-fœtoprotéine et docking moléculaire | 11 |
| 3.1. Alpha-fœtoprotéine | 11 |
| 3.1.1 Structure d'alpha-foetoprotéine | 11 |
| 3.1.2 .Biologie d'AFP | 11 |
| 3.1.3. fonction d'AFP | 12 |
| 3.1.4. Structure de gène AFP | |
| 3.2. Docking moléculaire | 13 |
| 3.2.1. Docking | 13 |
| 3.2.2..Scoring | 14 |
| 3.2.3. principe de docking | 14 |

SOMMAIRE

| | |
|---------------------------------------|----|
| 3.2 .4.outille de docking moléculaire | 14 |
| 3.2.5. ligand / Récepteur | 14 |

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

| | |
|--|----|
| 1. Présentation de l'étude | 16 |
| 1.1 Matériel biologique | 16 |
| 1.1.1. Matériel végétal | 16 |
| 1.1.2. Matériel animal | 16 |
| 1.2. Matériel non biologique | 16 |
| 2. Méthodes | 17 |
| 2.1. Extraction de l'huile essentielle | 17 |
| 2.2. Protocole de l'indentification de l'huile essential de thym | 17 |
| 2.2.1. Analyse par GC /MS | 17 |
| 2.3. Protocole du docking moléculaire | 19 |
| 2.4. Etude histologique | 19 |
| 2.4.1. Protocole expérimentale | 19 |
| 2.4.2. Sacrifice des animaux et prélèvement du testicule | 19 |
| 2.4.3. Etude histologique | 19 |
| 2.5. Etude immunohistochimique | 23 |

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

| | |
|---|----|
| 1. Résultats | 26 |
| 1 .1.Résultats de l'étude analytique de l'huile essentielle | 26 |
| 1.2. Docking moléculaire | 28 |
| 1 .3.Résultats histologiques | 32 |
| 1.4. Résultats de l'étude immunohistochimique | |
| 2. Discussion | 41 |
| CONCLUSION | 44 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE I

INTRODUCTION

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité comme remèdes pour le traitement de diverses maladies parce qu'elles contiennent des composants riches en principes thérapeutiques (Khalidi *et al.*, 2012). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) près de 80% de populations dépendent de la médecine traditionnelle.

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un rôle considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans des secteurs très divers, principalement en aromathérapie pour leurs propriétés curatives, ainsi qu'en cosmétique, en parfumerie et dans l'agroalimentaire pour leurs propriétés organoleptiques et antioxydantes (Patil *et al.*, 2021).

Dans la présente étude, nous avons mis en lumière l'huile essentielle d'une espèce très répandue en Algérie et largement utilisée en médecine traditionnelle. Le thym est utilisé depuis les temps anciens en médecine pour ses valeurs médicinales, en cosmétique, également en cuisine en tant qu'antiseptique et condiment (Teuscher *et al.*, 2005).

L'exposition professionnelle et environnementale aux polluants a un impact délétère sur plusieurs fonctions métaboliques, nerveuses et ainsi sur les différents systèmes de l'organisme y compris la reproduction. A cet effet l'utilisation des plantes médicinales est très recommandée pour combattre les effets néfastes des polluants. Il a été rapporté que le thym est douée de nombreuses propriétés thérapeutiques intéressantes, notamment des propriétés antimicrobiennes, anticancéreuses, anti-inflammatoires, analgésiques et antioxydantes ; il a également été suggéré comme un substitut naturel des antioxydants synthétiques (Galovičová *et al.*, 2021).

C'est ainsi que, nous nous sommes intéressés à entreprendre ce travail de mémoire qui a pour but d'une part, d'évaluer l'effet bénéfique d'une supplémentation de l'huile essentielle de thym sur l'histologie du parenchyme testiculaire et l'immunohistochimie de l'alpha fœtoprotéine chez le lapin male. D'autre part, la mise en évidence *in silico* par docking moléculaire de l'association probable du composé majoritaire de l'huile essentielle de thym « carvacrol » avec un marqueur moléculaire de prolifération cellulaire l'alpha fœtoprotéine. Nous présentons dans ce travail une analyse bibliographique décrivant les notions essentielles liées au contexte global de notre étude (la plante étudiée *Thymus vulgaris*, l'organe cible testicule, le marqueur de prolifération cellulaire utilisé le docking moléculaire. Le premier chapitre portera sur une description botanique générale de l'espèce étudiée (*Thymus vulgaris*) et son utilisation en médecine traditionnelle ainsi qu'un aperçu sur son huile essentielle, Dans

INTRODUCTION

le deuxième chapitre sera abordé le matériel et les méthodes, le dispositif expérimental et les techniques utilisées au cours du travail. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus au cours de nos études et une discussion globale sera faite relativement aux apports de cette mémoire et finalement la conclusion et des perspectives.

Partie

Bibliographique

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**1. Monographie de la plante étudiée: Thym commun (*Thymus vulgaris* L.)****1.1.définition**

Le thym est une plante vivace, aromatique, de la famille des lamiacée (Labiées) qui présente 3000 espèces (le thym, lavande, romarin, bisilic),Le thym contient de 300 variété différentes ou plus, certain supportent le froid et l'humidité et d'autres la chaleur tropicale. Il est très abondant dans les régions de garrigues et de maquis, typique de la région méditerranéenne, ou il pousse naturellement. Il est utilisé depuis les temps anciens en médecine pour ses valeurs médicinales, en cosmétique, également en cuisine en tant qu'antiseptique et condiment (Teuscher et al., 2005).



Figure 1 : *Thymus vulgaris*.L(Teuscher et al., 2005)

1.2.Description morphologique

Le thym est un sous arbrisseau mesurant jusqu'à 50 cm de haut, aux tiges ligneuses et fortement ramifiées. La plante est très parfumée et les feuilles sont lancéolées et lisses. Les fleurs, visibles d'avril à septembre, sont bleu-violet, voire rouge clair et sont disposées en touffes. Le thym apprécie les endroits secs et ensoleillés(Grunwald, 2007).



Figure 2 : Illustration de l'aspect morphologique de *Thymus vulgaris*

1 : Plante entière, 2 : Fleur, 3 : Étamine, 4 : corolle, 5 : Feuille, 6 : Racines pivotantes, 7 : Fruit, 8 : Calice, 9 : Style bifide

1.3. Classification botanique

Le tableau suivant décrit la classification botanique de *Thymus vulgaris*

Tableau I : Classification botanique de *Thymus vulgaris*(Morale, 2002)

| Règne | Plantes |
|--------------------|---------------------------|
| Sous règne | Plantes vasculaire |
| Embranchement | Spermaphytes |
| Sous embranchement | Angiospermes |
| Classe | Dicotylédones |
| Sous classe | Dialypétales |
| Ordre | Labiales |
| Famille | Lamiacée |
| Genre | <i>Thymus</i> |
| Espèce | <i>Thymus vulgaris L.</i> |

1.4. Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

La composition chimique du thym pourrait être classés en six catégories différentes; Terpène, sesquiterpène, terpène oxygéné, sesquiterpène oxygéné, phénols et oxydes (El-Nekeety et al .,2011). Elle contient des concentrations élevées de phénols avec(12–61%) de thymol et 0,4–20,6% de carvacrol, 1,8-cinéole (0,2–14,2%), q-cymène (9,1–22,2%), linalol (2 ,2–4,8%), bornéol (0,6–7,5%), a-pinène (0,9 à 6,6%) et camphre (0 à 7,3%) . Le carvacrol et le thymol sont les principaux composants phénoliques qui sont principalement responsables de son activité antioxydants(Dogu-Baykut et al ., 2014).

L'huile essentielle de *T. vulgaris* a montré une teneur élevée en monoterpènes oxygénés (56,53%) et une faible teneur en hydrocarbures monoterpéniques (28,69%), en hydrocarbures sesquiterpéniques (5,04%) et en sesquiterpènes oxygénés (1,84%). Le composé prédominant parmi les composants de l'huile essentielle était le thymol (51,34 %) tandis que la quantité de tous les autres composants de l'huile était inférieure à 19 (Maher Ali et al.,2011). La plupart des composés de cette huile sont le thymol terpénoïde naturel et son composé chimique

phénol carvacrol qui a des effets médicamenteux, antioxydants, antimicrobiens, anti-tissus, antispasmodiques et antibactériens (Taylor, 2000).

1.5. Usage thérapeutique

Le thym, herbe aromatique classique, offre une infusion rafraichissante qui juggle les infections et tonifie le système respiratoire. Efficace dans presque toutes les affections de l'oreille, du nez, de la gorge et des voies respiratoires, il calme la toux et stimule l'évacuation des mucosités. Possède des propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydants, relaxant, tonique et les problèmes ORL (oreille, nez, gorge). L'infusion de thym, avec ou sans ajout de miel, est un excellent remède maison utilisé contre le rhume, les maux de gorge et l'amygdalite. L'infusion peut être utilisée en gargarisme avant d'être avalée. Toux et affections bronchiques

Le thym soulage diverses toux et problèmes bronchiques et il complète utilement le traitement de l'asthme et de la coqueluche. Il est souvent associé à la réglisse. Ajoutée à l'eau du bain, elle a un effet revigorant en cas d'arthrite et de rhumatismes. L'huile essentielle peut être appliquée pure sur les ongles atteints de mycose 1 goutte par jour pendant 2 jours (ne pas l'utiliser pure ailleurs et ne pas ingérer par voie orale) (Andrew, 2013). Le thym est un désinfectant puissant et très efficace qui peut s'employer en usage externe (pour nettoyer) et interne pour lutter contre une infection (Gladstar, 2013)

1.6. Propriété antioxydant

Les antioxydants sont des molécules qui inhibent l'oxydation de différentes molécules. L'oxydation est le processus chimique de transfert d'électrons ou d'hydrogène d'une substance à un oxydant. Les réactions d'oxydation génèrent des radicaux libres. À leur tour, ces radicaux libres déclencheront une réaction en chaîne. Une fois qu'une réaction en chaîne se produit dans les cellules, des dommages ou la mort se produisent dans les cellules. Les antioxydants arrêtent ces réactions en chaîne en éliminant les radicaux libres perturbateurs et ou inhibant diverses réactions oxydatives. Plusieurs études ont étudié les constituants de l'huile essentielle de thym et les effets protecteurs de cette huile contre le stress oxydatif induit par l'aflatoxine (El Nekeety et al., 2011).

1.7. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles obtenues à partir de *Thymus vulgaris* récoltées à 4 étapes du processus biologique ont été évaluées pour leur activité biologique et leurs composants

chimiques. Les huiles volatiles de thym ont été analysées pour leurs effets inhibiteurs contre 9 souches de bactéries gram-négatives et 6 souches de bactéries gram-positives. Toutes les huiles essentielles de thym ont une activité statique bactérienne significative contre les micro-organismes testés. Cette activité était en outre marquée contre les bactéries gram-positives. L'huile de thym entièrement fleuri était la plus efficace pour stopper la croissance des espèces de micro-organismes. Les huiles testées ont également montré qu'elles possédaient une activité antibactérienne intelligente par contact direct, ce qui donnait l'impression d'être très marquées contre le micro-organisme gram-négatif. Un certain nombre d'espèces étaient capables de récupérer un minimum de 50% de leur fonction métabolique une fois au contact de l'inhibiteur, alors que la plupart des souches se sont révélées avoir été inactivées presque complètement (**Marino et Bersani, 1999**)

1.8. Propriété antivirale

Schnitzler et al. (2010), ont mené une expérience avec des extraits aqueux d'espèces de la famille des Lamiacées ont été examinés pour leur activité antivirale contre le virus de l'herpès simplex (HSV). Des extraits de thym (*Thymus vulgaris*) ont montré une activité inhibitrice contre le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), de type 2 (HSV-2) et une souche de HSV-1 résistante à l'acyclovir a été testée in vitro sur des cellules RC-37 dans un test de réduction de plaque (**NOLKEMPER et al. 2006**)

1.9. Activité bactéricide du thymol et du carvacrol

De par sa nature lipophile, le thymol pénètre dans la bicouche lipidique et se positionnent entre les chaînes d'acide gras entraînant une augmentation de la fluidité membranaire et une modification de la perméabilité passive. Ils sont capables de désintégrer la membrane externe des bactéries Gram-, en libérant les lipopolysaccharides (LPS). L'augmentation de la perméabilité membranaire, entraîne une fuite de protons H⁺ provoquant une chute de la force promotrice et de la synthèse d'ATP (**Bazylo et Strzelecka, 2007**)

1.10. *Thymus vulgaris* et la reproduction masculine

Thymus vulgaris est une plante à fort pouvoir antioxydant, **Salahshoor et al. (2020)** ont démontré que l'extrait de *T. vulgaris* avait des effets bénéfiques contre les dommages reprotoxiques causés par l'administration à court terme de Myleran (MYL) un agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement de certains types de tumeurs.

1.11. Toxicité de l'HE du thym

L'huile essentielle d'huile de thym a montré une toxicité orale aiguë de DL 50 = 4,7 g / kg de rat. Cet effet est attribué aux terpènes phénols thymol et carvacrol qui provoquent également des irritations cutanées et une irritation de la muqueuse, expliquant la sévère irritation de la peau de souris et de lapin lorsqu'elle est exposée à l'huile de thym non diluée (**Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012**).

1.12. Modes d'obtention des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues selon trois techniques, les deux premières utilisent la chaleur (entraînant par la vapeur ou hydro-distillation, et la distillation sèche), la troisième est l'expression mécanique réalisée à la température ambiante et ne concerne que les agrumes (fruits du genre Citrus) à l'état frais (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012**). Les HE sont

obtenues par distillation à la vapeur d'eau ou par expression à froid dans le cas particulier des agrumes, On parle alors d'essence et non pas d'HE (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

Hydrodistillation

L'eau et la matière végétale sont toutes deux chauffées dans un premier ballon, puis la vapeur et les extraits végétaux sont condensés dans un réfrigérant à eau et récupérés en fin de parcours dans un vase à décanter. La mise en contact de l'eau et du végétal pendant la chauffe favorise l'altération des composés aromatiques, particulièrement des esters (Jouault, 2012).

Extraction rapide des composés volatils des agrumes à l'aide d'une distillation sèche à micro-ondes

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM) est une technique récente. Inspirée d'un ancien procédé de distillation dite « sèche » utilisé par les alchimistes arabes pour la distillation des HE, elle consiste en une distillation sèche à l'aide d'un alambic utilisant le soleil comme source de chaleur. L'ESSAM a été développée en remplaçant l'énergie solaire par un chauffage micro-ondes plus performant, plus spécifique et largement moins polluant qu'un chauffage traditionnel (Ferhat et al., 2018).

Expression à froid

Le procédé d'extraction par expression à froid est assurément le plus simple mais aussi le plus limité. Il est réservé à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés ou encore d'agrumes qui ont une très grande importance pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle (El Haib, 2011).

2. Rappels sur l'appareil génital male

L'appareil génital male du lapin ressemble à celle des mammifères (**Figure 1**) ; c'est un système responsable de la production, de la nutrition et du stockage temporaire des gamètes male haploïde (spermatozoïde) et la production d'hormones sexuelles males (androgènes) ; et comporte(**Stevens et Lowe, 1997**) :

- Les testicules qui produisent les spermatozoïdes et sécrètent les androgènes
- L'épididyme : comporte le canal déférent, le canal éjaculateur et l'urètre, qui constituent un système de canaux assurant le transport des spermatozoïdes vers l'extérieur
- Les vésicules séminales, la prostate et les glandes bulbo- urétrales (glandes de Cowper) qui sont des glandes exocrines élaborant la majeure partie du sperme en fournissant le milieu de transport liquide des nutriments aux spermatozoïdes
- Le pénis : qui est un organe capable d'érection

Les testicules, l'épididyme et le canal déférent sont situés dans le scrotum, poche revêtue de peau contenant une cavité tapissée d'une mésothélium et communiquant avec la cavité péritonéale par le canal inguinal (**Beock et larcier, 1997**).

Durant la vie fœtale, les testicules sont localisés dans l'abdomen. Avant la naissance ou immédiatement après, ils quittent leur position pour descendre dans les bourses car la température du corps est trop élevée pour permettre la production de spermatozoïdes.

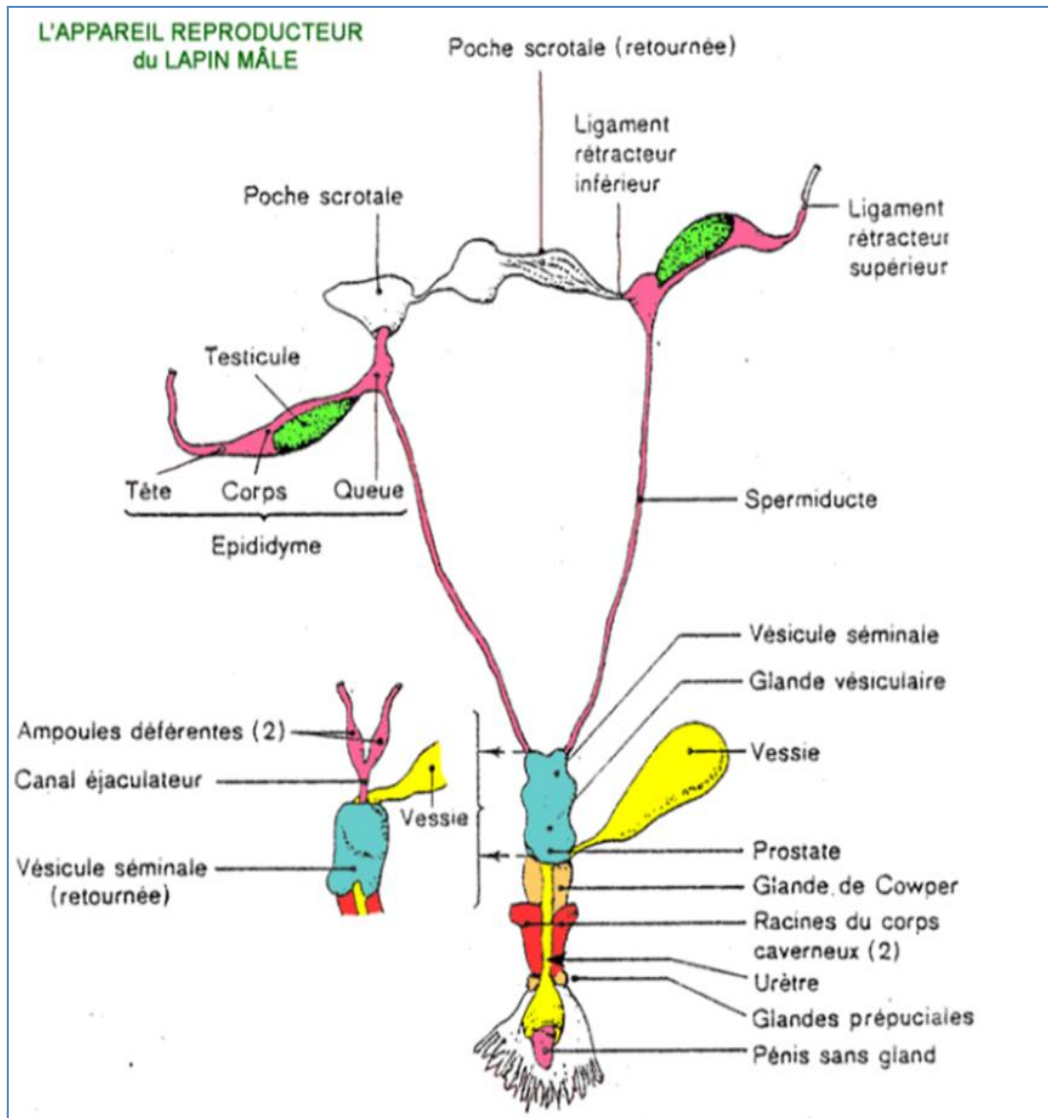


Figure 3 : Appareil génital mâle (d'après LEBAS *et al.*, 1996).

3. Testicule

3.1. Anatomie générale

Le testicule représente la glande génitale mâle, c'est un organe pair chez les Mammifères situé en dehors de la cavité abdominale (dans le scrotum) (Fourcier, 2017). Les testicules sont des organes ovoïdes pairs, long de 3 à 3,5cm et large de 1à 1,5 cm, leur poids varie entre 1,5 et 2 g. Protégées soutenu par un enveloppé appelé scrotum et sont délimiter par un enveloppe de tissu conjonctive fibreux appelé albuginée (Barone 1990) (Figure 2).

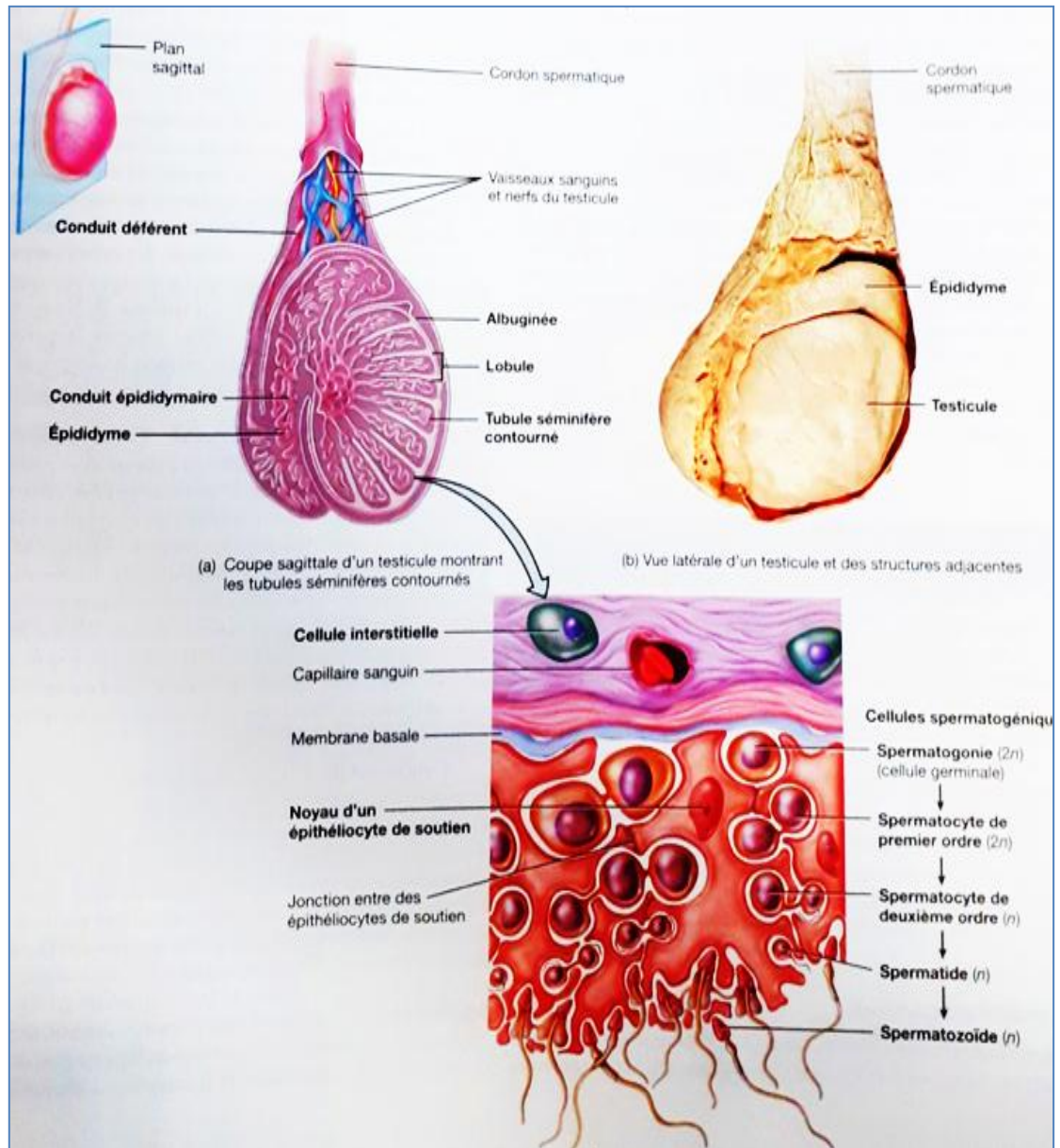


Figure 4: Schéma représente l'anatomie et l'histologie du testicule (Tortora et dirickson, 2017)

3.2.Embryologie

Sont des glande ovales paires commencent à se former dans l'embryon près de la paroi postérieure de l'abdomen et qui entreprennent habituellement leur descente dans la paroi inférieure de l'abdomen vers le scrotum durant le septièmes mois de développement fœtale.

3.3.Histologie

Les testicules sont recouvertes par une capsule blanche fibreuse de dense, l'albuginée, dont la projection intérieure divise l'organe en 200 à 300 compartiments internes appelés lobules. Chacun de ces lobules renferme de un à trois petits conduits enroulés, les tubes séminifères contournés, où les spermatozoïdes sont fabriqués par spermatogénèse.

Les tubes séminifères contournés sont tapissés de cellules assurant la production de spermatozoïdes, appelé **cellules spermatogéniques**, à divers stades du développement ; contre la membrane basale des tubules se trouvent des cellules souches précurseurs, les **spermatogonies** les cellules spermatogéniques se déplacent en couche vers la lumière des tubules sont des moins matures aux plus matures, les **spermatocytes de premier ordre**, les **spermatocytes de deuxième ordre**, les **spermatides** et les **spermatozoïdes**. Une fois qu'un spermatozoïde est formé, il est libéré dans la lumière du tubule séminifère.

Chaque testicule est revêtu par une capsule fibreuse: l'albuginée. Le parenchyme testiculaire est composé par :

- Des structures **tubulaires glandulaires exocrines** ou tubes séminifères, chargés de l'élaboration, la fabrication et l'excrétion des gamètes mâles, les spermatozoïdes
- Des **structures glandulaires endocrines** : les cellules interstitielles de Leydig, responsables de la sécrétion des hormones mâles, les androgènes.

Dans chaque lobule, sont pelotonnés deux à cinq tubes séminifères. Ils se terminent au sommet des lobules en tubes droits qui eux-mêmes se dirigent vers le *médiastinum testis* (**Bourgès-Abella, 2008**) (**Figure 3**).

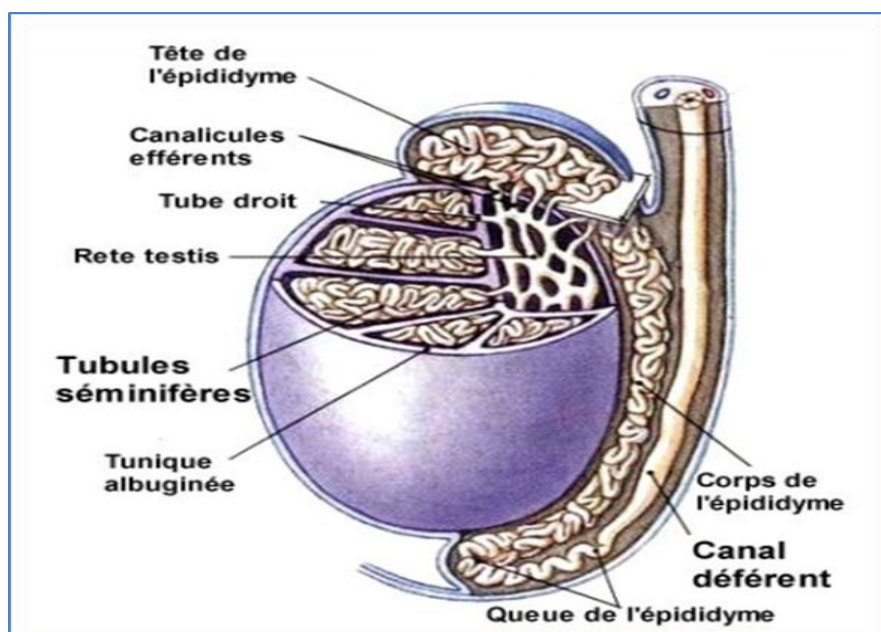


Figure 5: Représentation schématique du testicule (**MULLER et CLOS, 1997**).

3.4. Anatomie microscopique

L'association de cellules germinales et somatiques de Sertoli forment l'épithélium séminifère ce dernier repose sur une lame basale

- **Les cellules germinales** : en cours de maturation sont stratifiées de sorte que les spermatogonies constituent les compartiments basilaires les plus proches de la membrane basale. Les spermatocytes, les spermatides et les spermatozoïdes constituent la couche suivante ou le compartiment apical avec les spermatocytes adjacents au compartiment basilaire et les spermatozoïdes les plus proches de la lumière (Jennings et al., 2017).
- **b) Les cellules de Sertoli** : sont de forme triangulaire ou ovale avec un nucléole proéminent et une chromatine fine. Elles sécrètent des facteurs qui régulent la spermatogenèse et la spermiogénèse et également du liquide tubulaire et produisent de l'inhibine qui régule la production d'hormones (Jennings et al., 2017).
- **Tissu interstitiel** : La partie endocrinienne des testicules est constituée par les cellules de Leydig ou interstitielles qui sont présentes entre les tubules séminifères situés principalement dans le tissu conjonctif extra-tubulaire. Ces cellules sont responsables de la sécrétion de testostérone (Jennings et al., 2017). Ce sont des cellules polyédriques de 15 à 20 micromètre de diamètre au noyau arrondi (Kohler, 2011).

3.5. Spermatogenèse / Spermiogénèse : c'est le processus de transformation des cellules germinales en spermatides et les spermatides en spermatozoïde (Figure 4).

- + **Les spermatogonies** ou cellules souches (directement dérivées des gamétocytes) situées au voisinage de la membrane limitante ont un cytoplasme clair, d'aspect homogène et leur noyau est volumineux. On en reconnaît deux types (Jennings et al., 2017):
- + **les spermatogonies A** (noyau, clair et un nucléole central proéminent). Ces cellules subissent quelques mitoses. La dernière division mitotique produit une nouvelle spermatogonie de type A et une spermatogonie de type B, qui est à l'origine d'une lignée spermatogénèse.
- + **Les spermatogonies B** (noyau présente des mottes denses de chromatine, le nucléole est moins proéminent que celui du type précédent). La division méiotique des spermatogonies B donne naissance aux spermatocytes primaires

- ✚ **Les spermatocytes primaires** : Cellules diploïdes (noyau ressemble à celui des spermatogonies qui leur ont donné naissance). Les spermatocytes I s'éloignent de la région basale de l'épithélium et augmentent de taille. Ce sont les cellules les plus volumineuses dans le tube.
- ✚ **Les spermatocytes secondaires** : Cellules de plus petite taille que les spermatocytes I (noyau nucléolé. Les spermatocytes II subissent une division méiotique qui produit les spermatides.
- ✚ **Les spermatides** : Au stade initial, les spermatides sont des cellules de petite taille, arrondies ayant un cytoplasme peu abondant. Le noyau va ensuite s'allonger, se densifier tandis que se développe un très long flagelle et que la plus grande partie du cytoplasme est éliminé.
- ✚ **Les spermatozoïdes** sont des cellules de 60 μm à 70 μm , qui apparaissent en microscopie photonique comme des éléments filiformes très basophiles dans la lumière du tube séminifère. Ils présentent une partie proximale : la tête au noyau allongé basophile; une partie distale : le flagelle. En microscopie électronique, un spermatozoïde mûr est une cellule très différenciée, formée de la queue qu'est subdivisée en un cou, une pièce centrale, une pièce principale et une pièce d'extrémité (**Bourgès-Abella, 2015**).

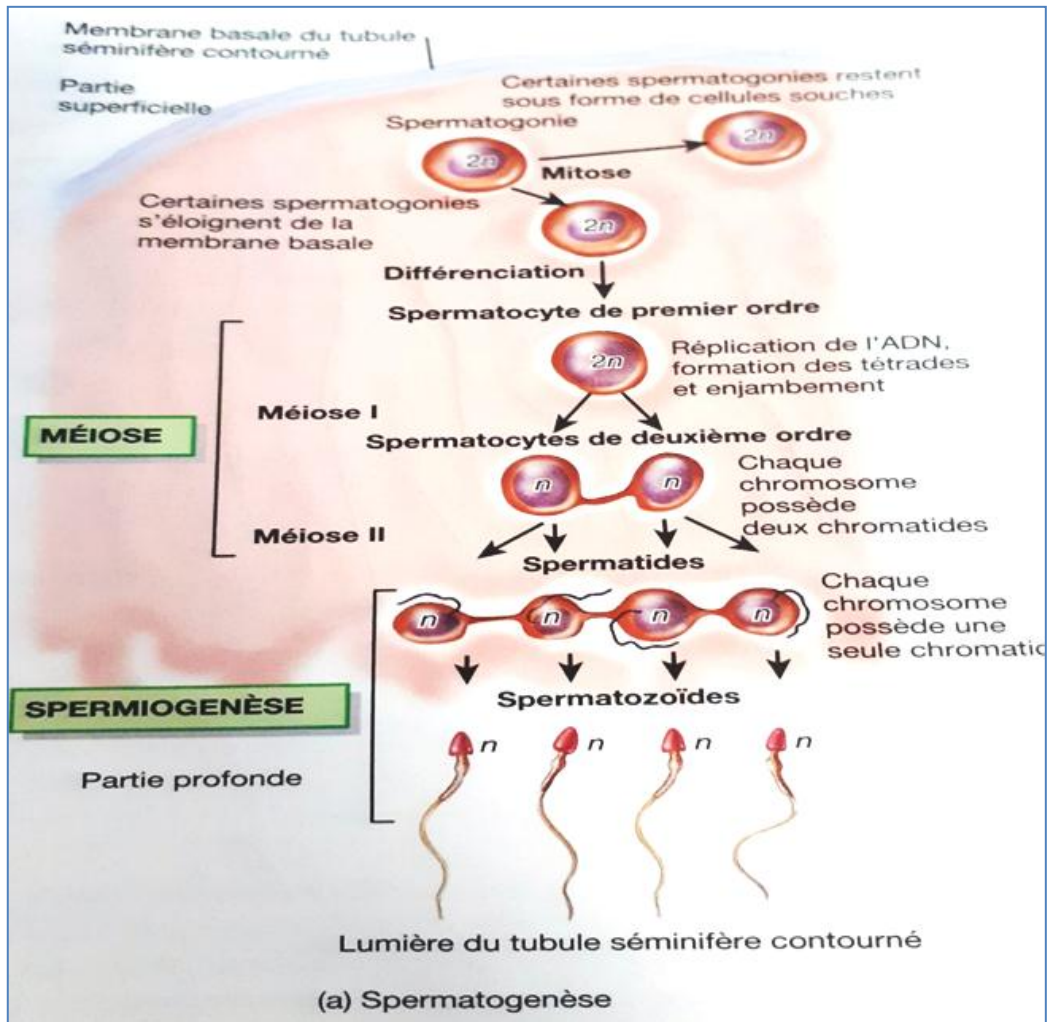


Figure 6 : Schéma représente la spermatogénèse (Tortora et Derrickson, 2007)

3.6.Régulation hormonale de la fonction testiculaire

Au début de la puberté, des cellules neuro-sécrétrices de l'hypothalamus sécrétant une plus grand quantité de gonadolibérines (GnRH) à son tour, cette hormone stimule l'adénohypophyse, qui augmente sa sécrétion d'hormone LH et l'hormone FSH,

La figure 5, illustre les hormones et les boucles de rétro inhibition qui assure la régulation des cellules interstitielles et des épithéliocytes de soutien des testicules et stimulent la spermatogénèse.

LH stimule la sécrétion de la testostérone par les cellules interstitielles situées entre les tubules séminifères. La testostérone, hormone stéroïde dérivé du cholestérol et synthétisée dans le testicule et constitué le principal androgène, par un mécanisme de rétro inhibition, elle met fin à la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus et à la sécrétion de LH par l'adénohypophyse. FSH agit sur les cellules spermatogéniques et sur les épithéliocytes de

soutien qui les nourrissent, ce qui a pour effet de stimuler la spermatogénèse (Tortora Derrikson, 2007).

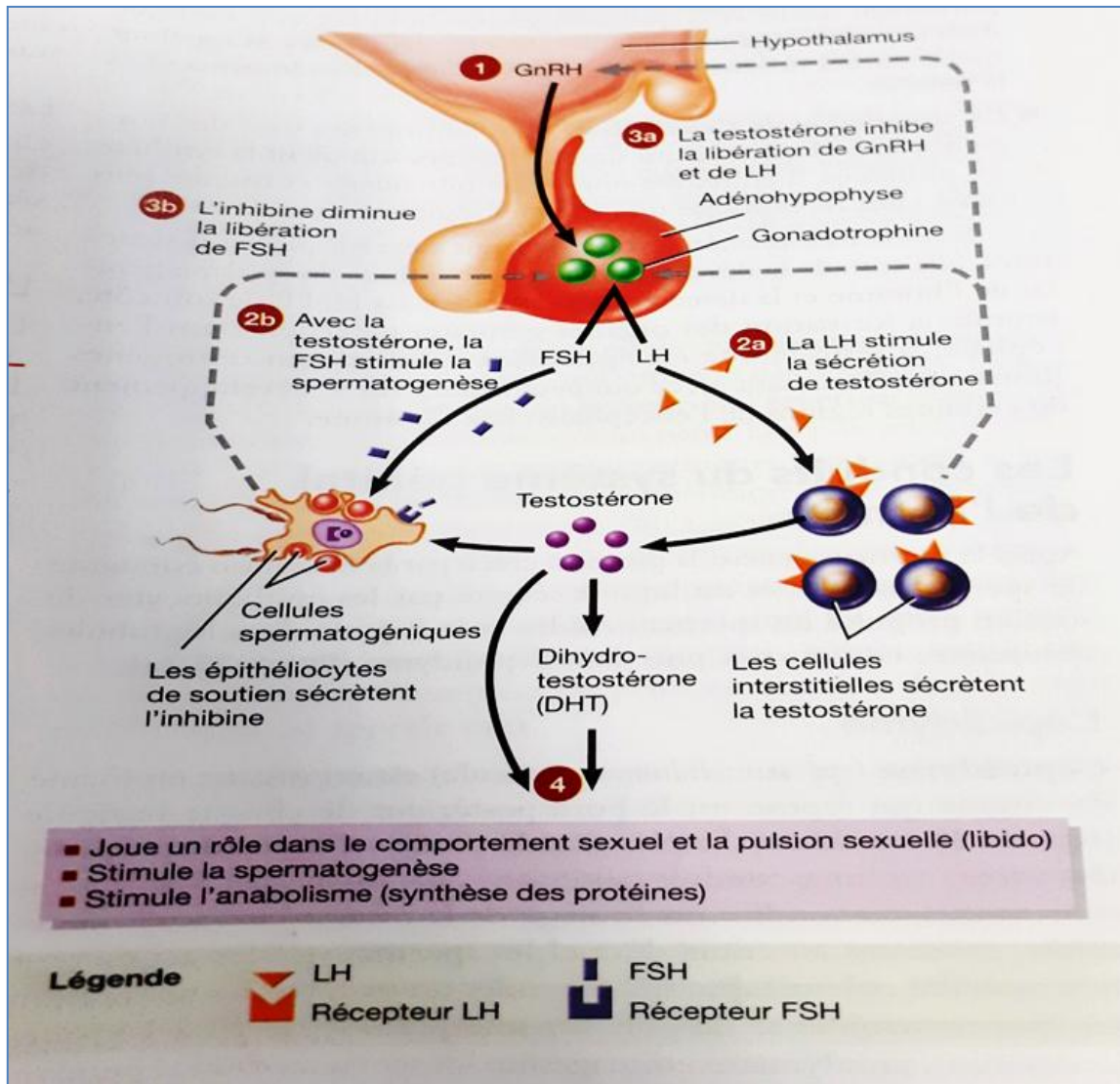


Figure 7 : Schéma représentant la régulation hormonale de la fonction testiculaire (Tortora Derrikson, 2007).

Chapitre III: marqueur moléculaire cible alpha-foetoprotéin et doking moléculaire

1. Alpha-FoetoProtéine (AFP)

L'alpha-foetoprotéine (AFP) est un marqueur de régénération hépatique, c'est une protéine de la famille des albumines dont l'expression est retrouvée principalement dans le foie fœtal au cours du développement embryonnaire.

Le gène AFP est réprimé lors de la différenciation terminale des hépatocytes pour être toutefois réactivé chez l'adulte conséquemment à divers troubles et dysfonctionnements hépatiques tels que la cirrhose, la dégénérescence, les infections virales et certains cancers (Sell, 1980). L'utilisation de l'AFP comme marqueur de régénération hépatique et aussi des hépatocarcinomes est très répandue.

1.1. Structure de la protéine AFP

AFP est une glycoprotéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique ayant une masse moléculaire d'environ 69 kDa et formée de 590 résidus d'acides aminés.

Le poids moléculaire et la composition en acides aminés de l'AFP chez l'homme, le chien, le lapin et le rat sont similaires. Cette protéine s'est subdivisée en 3 domaines de 180 à 200 acides aminés, constituant chacun 10 hélices alpha avec une configuration de boucles intramoléculaires dictée par des parties de pontage disulfure conduisant à une structure tertiaire conformationnelle en forme de V. Une poche hydrophobe se forme entre le domaine-1 et le domaine-3 (Figure 3) (Mizejewski, 2001 ; Mizejewski, 2016).

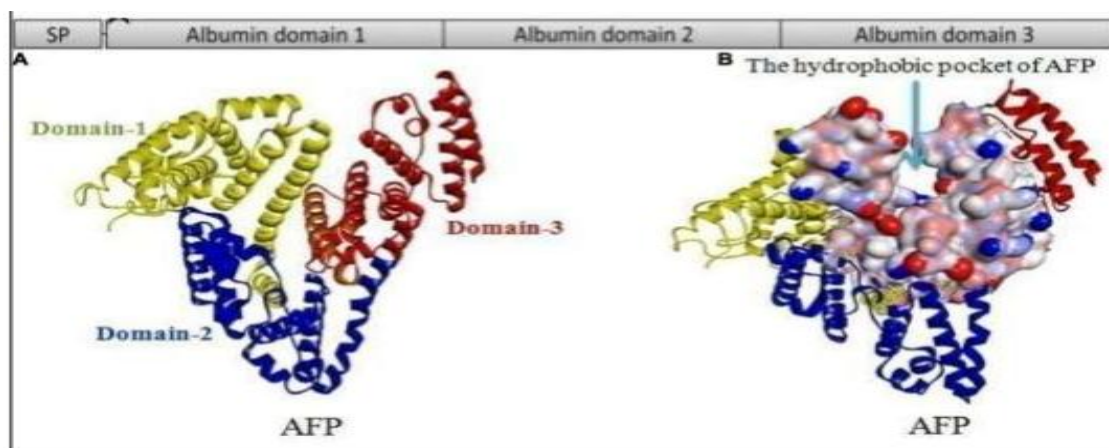


Figure 8 : Structure protéique de l'AFP (Mizejewski, 2016)

1.2. Biologie d'AFP

L'AFP est une glycoprotéine oncofœtale constituée d'une seule chaîne polypeptidique d'environ 600 acides aminés et d'environ 4 % de glucides. Il a un poids moléculaire de 67 500 daltons, c'est une protéine chargée négativement avec un point isoélectrique de 4,57 et présente de multiples variantes de charge lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose à long terme.

Au cours du premier trimestre, l'AFP est principalement produite par le sac vitellin. Après une atésie du sac vitellin à 11-12 semaines, le foie fœtal devient la principale source

d'AFP. Le tractus gastro-intestinal du fœtus en produit également des traces [1]. L'AFP dans le sérum fœtal peut être détectée dès 29 jours après la conception et atteint une valeur maximale de $3,0 \times 10^6$ ng/mL à 14 semaines de gestation. Diminue à $2,0 \times 10^5$ – $3,0 \times 10^5$ ng/mL à la semaine 32 et ensuite à 20-120 ng/mL à terme.

L'AFP appartient à la famille des albumines sériques et ses gènes sont présents sur le chromosome 4. Il partage des propriétés structurales et physicochimiques avec les membres de sa famille, à savoir l'albumine, la protéine de liaison à la vitamine D et la famine. Etant donné que l'albumine et l'AFP présentent une homologie d'acides aminés significative, il est suggéré que l'AFP soit un analogue embryonnaire de l'albumine. De plus, en raison de sa similitude avec l'albumine, on suppose que l'AFP peut être une protéine porteuse. De plus, son rôle en tant qu'immunomodulateur et protéine porteuse de la bilirubine a également été proposé.

L'AFP est la principale protéine de liaison au sérum chez le fœtus et joue un rôle crucial dans le transport de divers ligands tels que les acides gras, les hormones, les minéraux et la bilirubine. Bien qu'il remplisse de nombreuses fonctions physiologiques au cours du développement fœtal, des niveaux élevés chez les adultes sont courants dans l'hépatocarcinogénèse et divers processus pathologiques. De nombreuses études biologiques ont confirmé les effets anticancéreux et anti-apoptotiques de l'AFP. L'AFP peut stimuler la prolifération cellulaire, la motilité cellulaire et les propriétés invasives des lignées cellulaires HCC, et il existe des preuves que l'apoptose des cellules cancéreuses peut être obtenue en bloquant l'AFP (Hanif, *et.al* .2022)

III.1.4. Fonctions de l'alpha-fœtoprotéine :

L'AFP exerce différentes activités physiologiques, telles que le transporteur intravasculaire de protéines et d'hormones stéroïdiennes, elle maintient la pression osmotique et peut réguler **la prolifération cellulaire**, agissant ainsi en conjonction avec des facteurs de croissance cellulaire. Il joue un rôle important dans la vie embryonnaire en tant que transporteur d'ions, de bilirubine et d'acides gras polyinsaturés. Il exerce également des effets immunosuppresseurs en protégeant les antigènes paternels fœtaux des anticorps maternels circulants et joue un rôle dans la différenciation sexuelle du cerveau

Le gène AFP est exprimé dans des conditions de développement de la régénération du foie fœtal et adulte et de la tumorigenèse). On pense que l'augmentation de l'expression de l'AFP après une nécrose hépatique indique une régénération ou une prolifération du foie. Plusieurs études ont montré que l'AFP a des effets anti-apoptotiques et joue un rôle clé dans la promotion de la prolifération cellulaire.

L'AFP joue un rôle important dans l'induction de la transformation maligne des cellules cancéreuses, la régulation de la prolifération cellulaire, la migration, l'apoptose et l'échappement immunitaire, etc., et a été utilisée comme biomarqueur clinique pour le diagnostic du cancer et du carcinome hépatocellulaire. Le comportement malin de l'AFP est principalement médié par ses récepteurs (AFPR), qui sont présents à la surface des cellules, et leur expression dans les cellules est corrélée à la présence d'AFP.

L'AFP se lie à l'AFPR et subit une endocytose médiée par les récepteurs. Les AFPR et les AFP intracellulaires activent ensuite les voies de transduction du signal et interviennent dans la prolifération, l'invasion, la métastase, la reprogrammation et les réponses anti-apoptotique des cellules d'hépatome (**Lin et al. 2021**)

Structure génétique de l'AFP

Structure de gène de l'alpha foetoprotéine

Chez toutes les espèces de mammifères étudiées à ce jour, l'AFP le gène est étroitement lié à l'évolution gène de l'albumine. Chez la souris, ces gènes sont localisés en tandem sur le chromosome 5, séparés par un 14-kilo- Å . région intergénique de base kb qui contient les éléments régulateurs en amont du gène AFP.8 Cinq des éléments réglementaires distincts ont été définis, un promoteur, un répresseur et trois amplificateurs distincts Å . éléments Fig. 1 . Plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription enrichis au foie et ubiquitaires sont trouvés Å . dans la région du promoteur bp de 250 paires de bases, y compris Å sites de liaison pour le facteur nucléaire des hépatocytes 1 HNF- . Å . 1 , Facteur nucléaire 1 NF-1 et CAAT rAméliorateur Å 9] 11. Protéine de liaison C rEBP ; . De plus, le HNF-3 Å des sites de liaison se trouvent dans le promoteur AFP K. . Li et al, observations non publiées

2. Le docking moléculaire Le docking moléculaire a pour but de déterminer le mode d'interaction d'une complexe forme de deux ou plusieurs molécule, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur une stimulation de docking comprend essentiellement deux étape : le docking proprement dit et le scoring ces deux étape sont respectivement liées aux méthodes d'échantillonnage.

Docking

Est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations poses possibles, en ne retenant que celle qui représente les modes d'interactions les plus favorables.

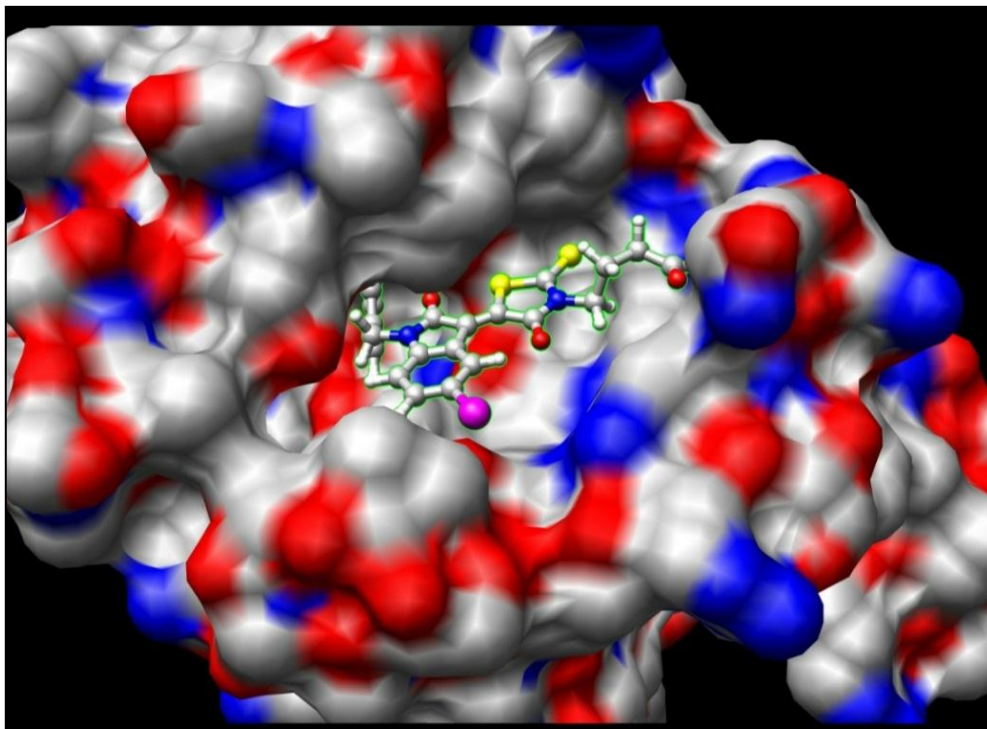


Figure .10.représente le docking moléculaire

III.2.2.Le Scoring:

Est l'étape de classement qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées il y a quatre étapes sont principalement employée pour la modalisation du système protéine ligand

- détermination structure
- préparation des structures
- docking
- prédiction, évaluation (DEKIKICHE ZAKIA . BENAICHE YOUSEF 2018)

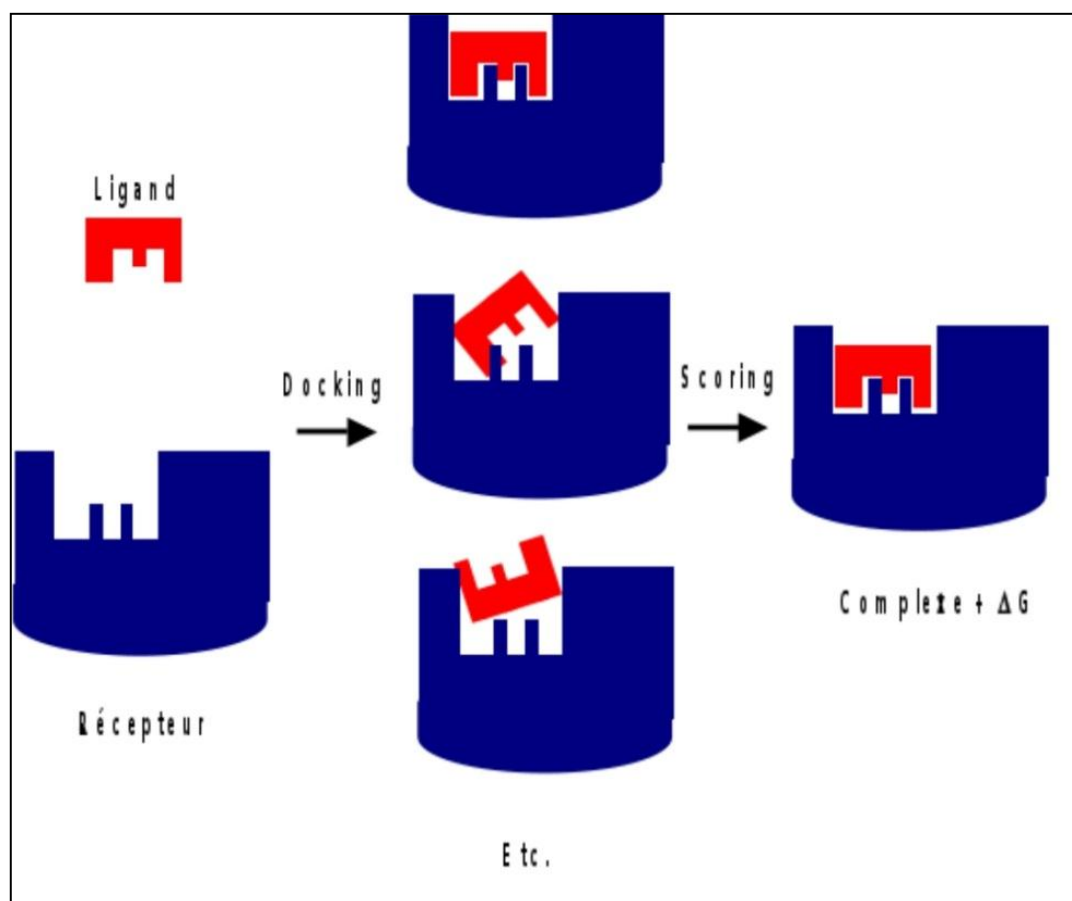


Figure .11. Principe général de docking moléculaire

III.2.3.Principe de Docking :

Dans le domaine de modalisation moléculaire, le docking moléculaire connu aussi sous le nom d'amarrage moléculaire reste une étape importante dans la compréhension des réactions biologiques et par suite la conception de médicaments. Le docking moléculaire est un processus de stimulation qui prédit de la structure et la conformation d'un complexe moléculaire récepteur – ligand ; le récepteur macromoléculaire étant généralement de nature protéique et le ligand est soit une petite molécule soit une autre protéine, il est également un outil important dans la conception de médicaments ou on utilise une stimulation assistée par le docking moléculaire a pour but de prédire la conformation et l'orientation d'un ligand au niveau de son site de fixation sur la

III.2.4.Outils Du Docking Moléculaire:

Les logiciels de docking sont des outils très utiles en biologie, pharmacie, médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique

(ALEXANDRE BEAUTRAIT 2008)

III.2.5.Ligand:

Un ligand est un atome, un ion ou une molécule portant des fonctions chimiques lui permettant de se lier à un ou plusieurs, atomes ou ions centraux

Le terme de ligand est le plus souvent utilisé en chimie de coordination et en chimie organométallique (MOKRANI. EH 2012)

En biologie, un ligand est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule cible, protéine, ou biacide nucléique; joue un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique ou transmission d'une signal.

Ce terme, très utilisé pour l'étude de protéine, désigne les molécules qui interagissent avec la protéine, de manière non covalente et spécifique et qui jouent un rôle dans ses fonctions.

La liaison de ligand à une protéine réceptrice modifie souvent de la conformation de cette dernière, c'est à dire sa structure en trois dimensions 3 D, l'énergie associée aux interactions intermoléculaires formées entre la protéine et son ligand permet de promouvoir de changements de conformations, appelés ajustement.

Cette modification structurale peut ainsi moduler, éventuellement, son état fonctionnel et son activité (LEACH. A. R 2001)

La structure des ligands est obtenue par deux moyens:

- consiste à utiliser des ligands du PDB ou de la littérature avec possibilité de les reproduire par dessin, optimiser et enregistrer dans différents formats (Pdb, mol, mol2) grâce à des logiciels de construction moléculaire virtuelle commerciale constitués d'une base de données de structures chimiques appelées chimiothèque ou espace chimique dont la plus utilisée est PubChem. (MOKRANI. E. H 2012)

III.2.6.Les récepteurs:

C'est une macromolécule, le plus souvent, une protéine : obtenue par structure 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de données PDB il s'agit d'une grande archive de données structurales de macromolécules biologiques : protéines ; et d'un acide nucléique. MOKRANI. E.H 2012

En 2018, la PDB a compté plus de 141616 structures de bio macromolécule.

Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargées sous extension pdb lisibles par les logiciels de docking et contiennent diverses informations sur la protéine en question, par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolu la structure, la méthode expérimentale.

Certaines informations sur la structure primaire, les hétéro-atomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y, Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée, peuvent s'y trouver si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée. **(EL HADJI . SAID K. 2016)**

MATERIEL & METHODES

CHAPITRE 1: MATERIEL & METHODES

Présentation de l'étude

Le présent travail a été réalisé durant la période allant du mois mars 2022 jusqu'au mois de juin 2022 ; au niveau :

- ✚ Clavier de la station expérimentale ou nous avons assisté au sacrifice et au prélèvement des organes (testicule et autres organes)
- ✚ Laboratoire PFE de la faculté SNV de l'université de Blida 1, ou nous avons réalisé l'étude macroscopique
- ✚ Laboratoire de recherche du centre CRAPC de Bousmail ou nous avons réalisé d'une part la caractérisation par CPG MS de l'huile de thym et l'identification du composé majoritaire de l'HE à savoir le carvacrol. Et d'autre part l'étude par docking moléculaire de l'affinité du carvacrol et l'alpha fœtoprotéine.
- ✚ Service d'anatomie pathologie du CHU Bab El-Oued d'Alger où nous avons recherchés l'effet amélioratif possible de l'huile essentiel du thym « *Thymus vulgaris* » sur le testicule du lapin par : une étude histologique coloration topographique H&E ; étude immunohistochimique : Recherche de l'expression de l'alpha fœtoprotéine

L'objectif principal de ce projet de mémoire est d'examiner l'activité protectrice possible de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* chez le lapin male de souche synthétique (*Oryctolagus cuniculus*).

Dans cette étude, l'accent est mis également sur l'expression de marqueur de prolifération cellulaire, l'alpha fœtoprotéine, au niveau de l'organe de reproduction « le testicule ».

1. MATERIEL

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal

La plante qui a fait l'objet de notre étude est le thym « *Thymus vulgaris* » connue sous le nom Zaitara, dont on a utilisé les parties aériennes (feuilles et sommités fleuries).

1.1.2. Matériel animal

Dans notre étude, on a utilisé 10 lapins males sains, âgés de 3 à 4 mois, ayant un poids corporel moyen qui varie entre 2.5 kg et 2.6 kg.

Systematique

Règne : Animal

Embranchement : Vertébrés

Classe : Mammifère

Super ordre : Glires

Ordre : Lagomorphe

Famille : Léporides (lièvre et lapin)

Sous-famille : Leporinae

Genre : *Oryctolagus*

Espèce : *Oryctolagus cuniculus*

La sélection de cet animal repose sur plusieurs critères : le lapin est un modèle expérimental largement utilisé pour tester la toxicité des produits chimiques. Aussi, les propriétés du lapin en font de nombreux modèles intéressants : tolère le gavage, son poids permet de nombreuses investigations (exemple, prélèvement sanguin), création de lots dimensionnés et compatibles...etc. Le travail effectué sur cette espèce est parfois simple comparable et généralisable à d'autres espèces animales (Gidenne, 2015).

1.2. Matériel non biologique

1.2.1. Matériel de laboratoire

Le matériel non biologique utilisé dans le cadre de la présente étude, composé de verrerie, produits, réactifs et appareillage est donné dans l'**annexe 1**.

2. Méthodes

2.1.Extraction de l'huile essentielle : dans la présente étude, l'extraction de l'huile essentielle utilisée a été réalisée par un autre binôme d'étudiants master.

2.2.Protocole de l'identification de l'huile essentielle de thym« analyse GCMS »

L'analyse des échantillons a été réalisée à l'aide d'un instrument GC/MS (système Agilent 7890/5975, Wilmington, DE, USA) équipé d'une colonne Zebron ZB-50 (Phenomenex, Torrance, CA 90501-1430, USA) de 60 m de long, de 0,25 mm de diamètre intérieur et d'une épaisseur de film de 0,50 μm .

2.2.1. Paramètres de l'analyse GC/MS

La température initiale du four 50°C, le temps initial 0,5 min, la première vitesse de rampe du four 10 C/min, la température finale du four première rampe 200 C, le temps final première rampe 0 min, la deuxième rampe four vitesse 3 C/min, température finale du four deuxième rampe 250 C, temps final deuxième rampe 0 min, troisième vitesse de rampe du four 20 C/min, température finale du four 300 C, temps final 2 min, durée totale de fonctionnement 36,66 min , température d'entrée 300 C, mode d'entrée divisé, volume d'injection 0,5 μL , gaz porteur H₂, débit constant, débit 0,71 mL/min, pression initiale 12,05 psi, rapport de division 1:20, débit divisé 14,20 mL/min, détecteur MS (MSD), température de la ligne de transfert MSD 300 C, température de la source d'ions 230 C, température quadripolaire 150 C, gain EM MSD 2,0, délai de solvant MSD 8,0 min, plage de masse MSD 33-550 amu.

L'identification du pic a été réalisée en utilisant à la base des données NIST12et NIST 08.

La chromatographie permet une excellente séparation des acides dans la gamme C6 à C27 et permet de différencier les isomères tels que l'acide oléique et l'acide élaïdique.

2.2.2. Conditions opératoires

Injecter :

Température 250°C

Mode l'injection : split 1/80

Volume injecté : 0.2 μl

Colonne :

Type: HP-5MS

Dimensions : long 30 m * D int 0.25 mm * épaisseur film 0.25 μm

Phase stationnaire :5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. (Autre : Spécifier)

Température du four :60°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C., isotherme pendant 10 min.

Durée d'analyse : 113 min

Gaz vecteur : Hélium pureté : N6.0; Débit GV: 0.5 ml/min

Détecteur de masse :

Mode d'analyse : Scan TIC (de 30a 550)

Délai du solvant : 3.5min

Température de l'interface :280 °c

Type d'ionisation: Impact électronique Intensité du filament : 70 év

Type de l'analyseur de masse : Quadripôles

Température de la source : 230 °C

Equipement : Chromatographe : Hewlett Packard Agilent 6890 plus

Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973



Figure 12 : Instrument GC/MS (système Agilent 7890/5975, Wilmington, DE, USA)

2.3. Protocole du docking moléculaire

Le docking moléculaire est effectué à l'aide du logiciel AutoDockVina et les prédictions du placement des ligands et de la notation des clusters sont interprétés et visualisées à l'aide du logiciel PyMOL 2.1.0 (Schrödinger Co., New York, NY, ETATS-UNIS).

Les récepteurs moléculaires sont téléchargés à partir de la Protein Data Bank (PDB), ainsi, les structures cristallines de la protéine de liaison AFP ciblée comme récepteur.

Le ligand Carvacrol est dessiné par le logiciel MarvinSketch et enregistré sous forme de fichiers 3D.pdb, où il est ensuite préparé en tant que ligand pdbqt pour la simulation d'amarrage en définissant les possibles torsions à l'arbre de torsion, les liaisons rotatives et non rotatives via le logiciel d'outils AutoDock (ADT, The ScrippsResearch Institute, La Jolla, Californie, États-Unis).

L'AFP est préparée via le logiciel de visualisation de protéines UCSF chemira 1.14 (U. of California, USA) en éliminant les molécules d'eau et les hétéroatomes précédents. Ensuite, le document protein.pdbqt est préparé en définissant les hydrogènes polaires et les charges de Kollman sur les outils AutoDock 1.5.7 pour qu'elle soit réceptive au ligand.

Pour le récepteur protéique, une boîte de grille cubique est définie sur le site actif et enregistrée sous config.txt. L'algorithme empirique AutoDockVina a généré des fonctions de potentiel et de notation basées sur le champ de force pour orienter le choix des poses de ligand et des combinaisons de structure composé/protéine correctes, puis les structures représentatives 2D/3D sont utilisées pour la visualisation/interprétation des acides aminés/poche ligand de reliure.

Les scores d'amarrage présentés comme l'énergie de liaison (ΔG), l'écart quadratique moyen RMSD (Å), la constante d'inhibition (K_i), les types d'interaction et les distances (Å) ont été considérés comme des entrées pour discuter des résultats d'interaction.

2.4. Etude histologique

2.4.1. Protocole expérimentale

Dix lapins mâles sont répartis en deux lots de cinq lapins chacun. Avant toute expérimentation, les animaux sont soumis à une période d'acclimatation (08 jours) afin de s'adapter aux conditions du laboratoire et aux manipulateurs, et pour éviter que ces derniers

ne soient pas des facteurs de variation durant notre étude toxicologique. Chaque animal est mis dans une cage métallique avec une étiquette sur laquelle est mentionnée le lot, le numéro de lapin et le type de traitement. Le traitement des lapins a duré 21 jours.

2.4.2. Sacrifice des animaux et prélèvements des testicules

Prélèvement des organes : Après 21 jours de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés par décapitation rapide sans anesthésie. Après dissection le testicule organe de l'étude a été prélevé et conservé dans une solution de formol tamponné à 10%. Pour l'étude histologique et immunohistochimique



Figure 13: Aspect anatomique de l'appareil génital mâle et mise en cassette des testicules
(Photo originale)

2.4.3. Etude histologique

L'étude histologique passe par les étapes suivantes :

- ✚ **Fixation** : la fixation a pour but la conservation des structures tissulaires dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toutes les activités mitotiques et enzymatiques ainsi que le durcissement de la pièce anatomique. Les fixateurs les plus utilisés en pratique courante sont le formol et la durée de fixation varie selon le volume des prélèvements.
- ✚ **Macroscopie** : l'examen macroscopique apprécie selon : le poids, la taille, l'aspect externe, la consistance, la tranche de section, la coloration, les remaniements. Les prélèvements sont inclus en totalité dans des cassettes en plastique numérotées, puis mises dans le formol pour une bonne fixation.

✚ **circulation** : passe par les étapes suivantes dans un automate de type Leica

❖ **la déshydratation** : le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire ceci par passage du prélèvement dans les 5 bains d'alcool de concentration croissante (de l'alcool à dilué 70° à l'alcool absolu à 100°) cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe

❖ **L'éclaircissement** : après la déshydratation, les pièces sont transférées dans trois bains de xylène pour l'éclaircissement, cette étape prépare l'inclusion de l'échantillon à la paraffine

❖ **Imprégnation** : est nécessaire pour faire la coupe, on utilise trois bains de paraffine pure en continu pendant 4 heures à 60° déshydratation imprégnation clarification

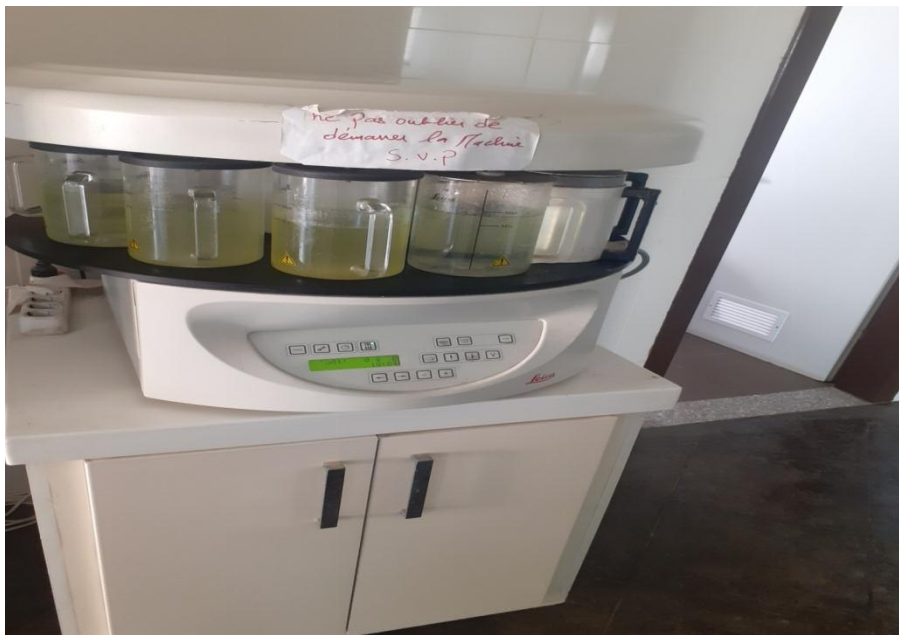


Figure14: Automate de circulation

✚ **L'inclusion en paraffine** : son but est d'obtenir une coupe fine et régulière des tissus ; le milieu d'enrobage le plus utilisé est la paraffine. Les échantillons sont placés dans un moule spécifique adapté à la taille de la pièce de l'organe, qui sera rempli ensuite de paraffine fondue 56° 60°C. Les cassettes sont placées sur la surface du moule ; dans un premier temps versez de la paraffine dans le moule jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement immergé, puis ce dernier est déposé sur une plaque de refroidissement, provoquant un durcissement de la paraffine, on fait un démoulage et on obtient les fragments de tissus contenus dans le bloc paraffine

✚ **Confection de la coupe histologique** : Le passage du bloc de paraffine dans un microtome permet de réaliser des sections de 2 à 5µm disposées en série régulière sous forme d'un ruban

✚ **Etalement** : les segments de ruban de paraffine sont placés sur des lames de verre

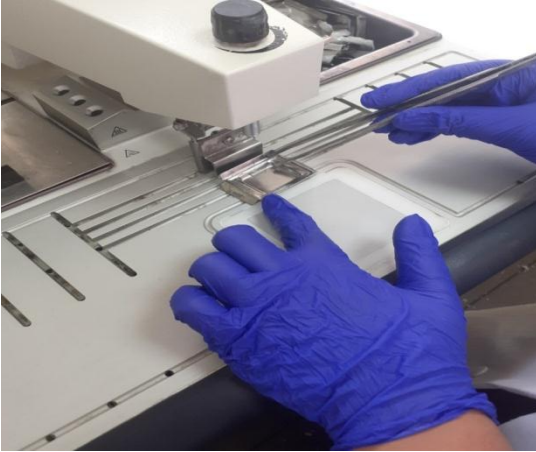


Figure15 : Inclusion à la paraffine

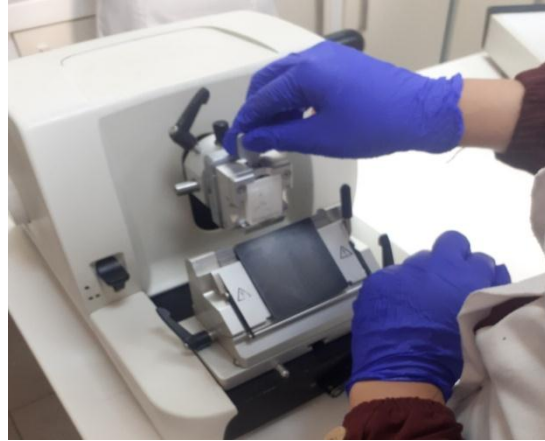


Figure16 : coupe au microtome

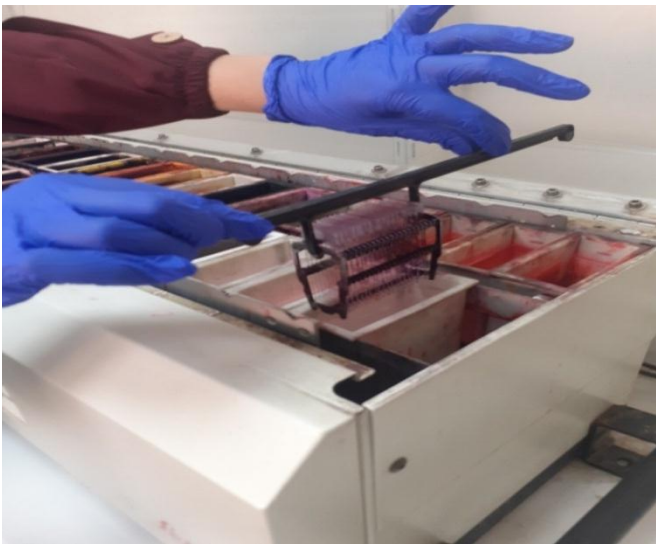


Figure17 : Coloration et montage entre lame et lamelle

✚ **Coloration à l'hématoxyline-éosine** : La coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) est la méthode de coloration la plus courante pour matériel histologique.

Dans un premier temps, le colorant du noyau chargé positivement (hématoxyline) se fixe sur les groupes phosphates chargés négativement des acides nucléiques du noyau

cellulaire. Les noyaux prennent alors une couleur variant entre le bleu foncé et le violet foncé.

La seconde étape réside dans la contre-coloration à un colorant xanthène anionique (éosine) chargé négativement ; le colorant se fixe aux protéines plasmatiques chargées positivement.

Le cytoplasme et les éléments cellulaires basiques se colorent en rose à rouge. Les coupes de tissus ont été déparaffinées dans deux bains de xylène pendant 10 min, puis réhydratées dans trois bains d'éthanol de degrés décroissants (100°, 90° et 70°) pendant 5 min chacun. Après rinçage à l'eau courante, les sections ont été colorées à l'hématoxyline de Harris pendant 6 min.

Après un lavage à l'eau courante, une coloration à l'éosine pendant 1 min a été effectuée, suivi d'un autre lavage. Par la suite, les sections ont été déshydratées dans un bain d'éthanol (90°), éclaircies dans le xylène, puis monté à l'aide d'une résine synthétique (l'eukitt). Les lames ont été observées sous microscope photonique, après leur séchage

2.5. Etude immunohistochimique (IHC)

L'IHC est la combinaison de l'immunologie et de l'histochimie. C'est une technique très importante et délicate, consiste à mettre en évidence la localisation de protéines tissulaires, cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction tissulaire in situ et l'évaluation de leur expression. Elle est basée sur une réaction spécifique immunologique de type Ag-Ac permettant la détection des protéines (antigène) cellulaires au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux. ((Pluot et al., 2006).

✚ **Réalisation des coupes :** Les coupes doivent être épaisses de 5 µm afin de bien visualiser le marquage. L'étalement des coupes se fait sur des lames silanisées électrostatiquement équilibrées pour assurer l'adhésion des tissus et réduire le risque de décollement des coupes en température élevée. Le numéro du bloc et l'anticorps utilisé sont mentionnés sur la lame à l'aide d'un crayon. Ensuite, les lames sont séchées dans une étuve à 40°C pendant toute une nuit.

✚ **Démasquage antigénique :** Après les étapes de déparaffinage et de réhydratation des coupes de tissus, l'exposition des sites antigéniques a été réalisée par traitement

thermique dans une solution tampon citrate (0,01 M, pH = 6). Après refroidissement, rincer avec du tampon TBS (Tris-Buffered Saline) pendant 1 à 5 minutes ; les fragments sont ensuite encerclés à l'aide d'un stylo Dako pour éviter le déversement du marqueur.



Figure18: Réalisation des coupeset automate de l'IHC

- ✚ Appliquer un anticorps primaire spécifique : Déposer quelques gouttes de l'anticorps d'intérêt sur la partie encerclée du tissu (AFP) sur la lame. Couvrir les lames et incuber pendant 30 minutes. Ensuite, les lavages seront effectués dans 2 bains de tampon TBS (5 m chacun).



Figure19 : Application de l'anticorps spécifique

- ✚ **Application de CA secondaire non spécifique :** Quelques gouttes d'AC secondaire (diluée au 1/100) conjuguée à l'enzyme HRP (peroxydase de raifort) ont été déposées sur la lame et incubées 30 min, c'est une étape d'amplification du signal. La réaction DAB a ensuite été stoppée par rinçage dans deux plaques de solution TBS pendant 5 min chacune.

- ✚ **Révélation** :Appliquer quelques gouttes du révélateur DAB (3-3 diaminobenzidine) sur les coupes pendant 5 minutes, puis rincer dans chacune des deux cuves de solution TBS pendant 5 minutes. L'enzyme HRP dégrade le substrat chromogénique DAB, et le produit résultant est brun et peut être détecté par microscopie optique.
- ✚ **Contre-coloration** :Pour colorer les noyaux en bleu-violet, plonger les lames dans l'hématoxyline de Mayer pendant 5 minutes, puis rincer à l'eau courante pour éliminer l'excès d'hématoxyline. Par la suite, les lames ont été passées dans un bain d'ammoniac pour éliminer l'excès de colorant (bleu), puis rincées à l'eau courante.
- ✚ **Pour le montage**: les coupes colorées sont montrés entre lame et lamelle avec une résine synthétique comme EUKITT dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre ces lames sont prête pour observation microscopique

Condition opératoire :

- étuvage et déparaffinage :
- chauffage des lames à partir de température moyenne (déparaffinage)
- cellconditioning
- -ultra conditrioner1 ?
- ✓ chouffer les lames et incuber 8min (avec tampon CC1 (cellconditioning 1))
- ✓ 36minutes d'ultra CC1
- ✓ -température d'incubation d'anticorps
- ✓ Chauffer les lames à 37°C et incuber 4 minutes (anticorps)
- Tétration
- ✓ Application (Anticorps primaire) incuber pendant 28 minute
- Contre-coloration
- ✓ Déposer une goutte de hématoxyline II(contre- coloration),appliquer coverslip ,et incuber 8 minutes
- Poste contre- coloration
- ✓ Déposer une goutte de bluingreagent(poste contre-coloration)
- Le montage

RESULTATS

ET

DISCUSSION

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 2 : RESULTATS & DISCUSSION

1. Résultats

1.1. Composition chimique de l'huile essentielle de Thym

La composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle de thym est consignée dans le **tableau X**, par ordre d'élution et selon les familles chimiques. Le chromatogramme obtenu par l'analyse CG/SM de HET est représenté par la **figure 20**

L'analyse de HET par CG/SM nous a permis d'identifier 27 composés volatiles qui représentent environ 99.73% de la composition chimique totale de HET ; dont le composé majoritaire est le carvacrol (72,9%)

Tableau X : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* identifiée par CGSM

| THYM : Composé | temps de rétention | Pourcentage |
|----------------------------|--------------------|-------------|
| Butanoic acid | 3.912 | 0.08 |
| alpha.-Thujene | 8.809 | 0.08 |
| ALPHA.-PINENE | 9.168 | 0.68 |
| Camphene | 9.98 | 0.23 |
| beta.-Pinene | 11.628 | 0.08 |
| 1-OCTEN-3-OL | 12.052 | 0.26 |
| beta.-Myrcene | 12.635 | 0.82 |
| 3-Octanol | 13.094 | 0.12 |
| l-Phellandrene \$ | 13.418 | 0.13 |
| DELTA.3-Carene | 13.771 | 0.08 |
| alpha.-Terpinene | 14.242 | 0.86 |
| p-Cymene | 14.913 | 8.33 |
| beta.-Phellandrene | 15.083 | 0.37 |
| gamma.-Terpinene | 17.191 | 2.54 |
| ALPHA.-TERPINOLENE | 19.204 | 0.08 |
| LINALOOL | 20.399 | 4.35 |
| (-)-cis-Myrtaniline | 21.688 | 0.05 |
| Borneol | 24.807 | 0.86 |

| | | |
|----------------------|---------------|--------------|
| 4-Terpineol | 25.62 | 1.38 |
| 2,4,6-Octatrien-1-ol | 26.661 | 0.06 |
| Thymol | 33.801 | 1.2 |
| Carvacrol | 35.626 | 72.9 |
| CARVACRYL ACETATE | 39.022 | 0.57 |
| trans-Caryophyllene | 41.642 | 1.47 |
| beta.-Selinene | 43.714 | 0.06 |
| beta.-Bisabolene | 47.233 | 0.12 |
| Caryophyllene oxide | 51.436 | 0.78 |
| Total | | 98.54 |

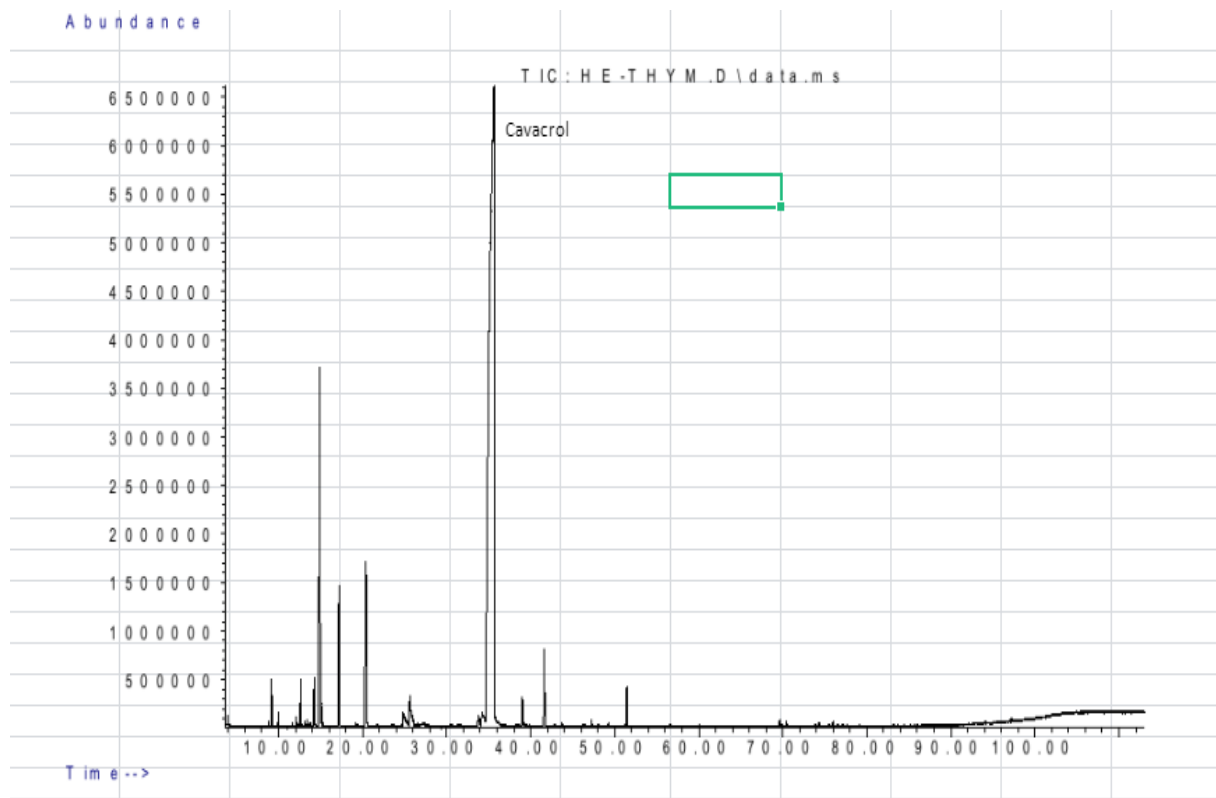


Figure 20 : Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de Thymus vulgaris

1.2. Doking moléculaire de l'alpha fœtoprotéine et le carvacrol

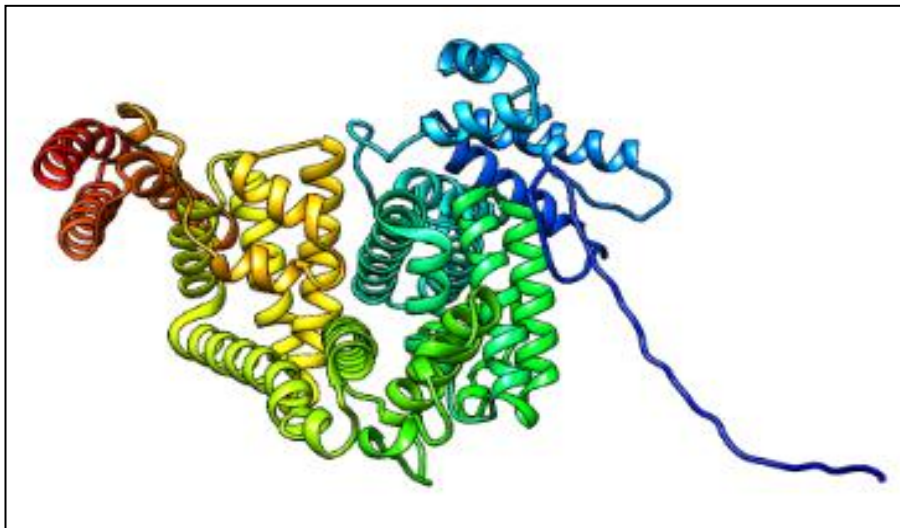


Figure 21: Structure tridimensionnelle de AFP

Tableau : Docking scores obtenus par le logiciel Autodock vina

| Mode | affinity | dist from best mode | |
|-------------------------|------------|---------------------|-----------|
| | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b. |
| -----+-----+-----+----- | | | |

| | | | |
|----|-----|--------|--------|
| 1 | 6.4 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | 6.3 | 1.586 | 2.331 |
| 3 | 6.1 | 1.490 | 4.173 |
| 4 | 6.0 | 1.817 | 2.769 |
| 5 | 6.0 | 1.683 | 3.579 |
| 6 | 5.8 | 25.640 | 26.322 |
| 7 | 5.8 | 2.260 | 4.352 |
| 8 | 5.8 | 2.610 | 3.450 |
| 9 | 5.8 | 25.809 | 26.809 |
| 10 | 5.7 | 19.533 | 21.475 |

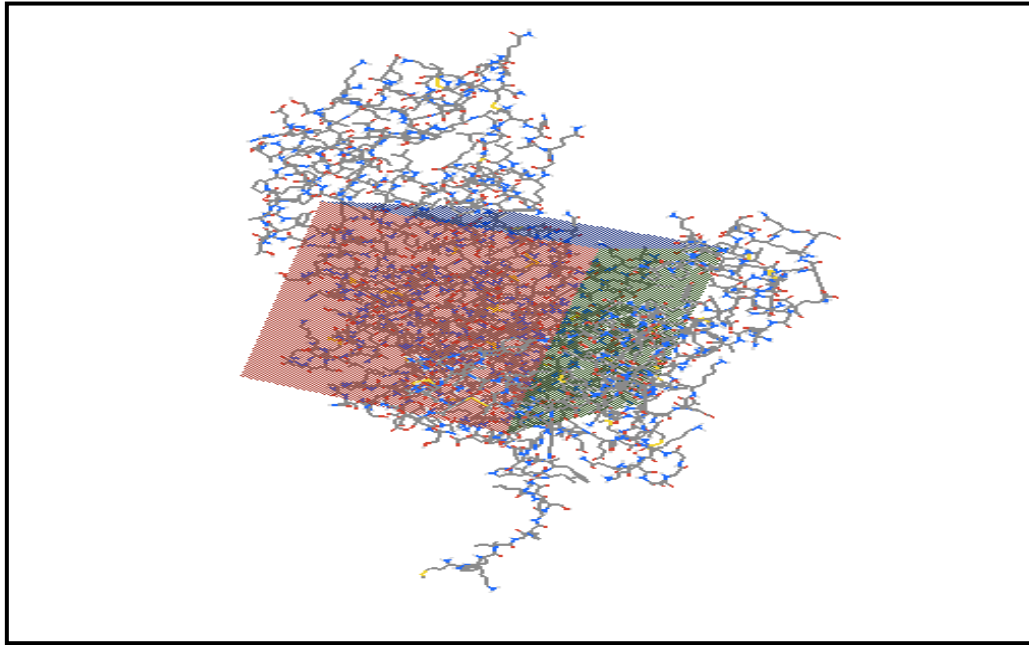


Figure22. Grid box délimitant la zone du site active de l'AFP

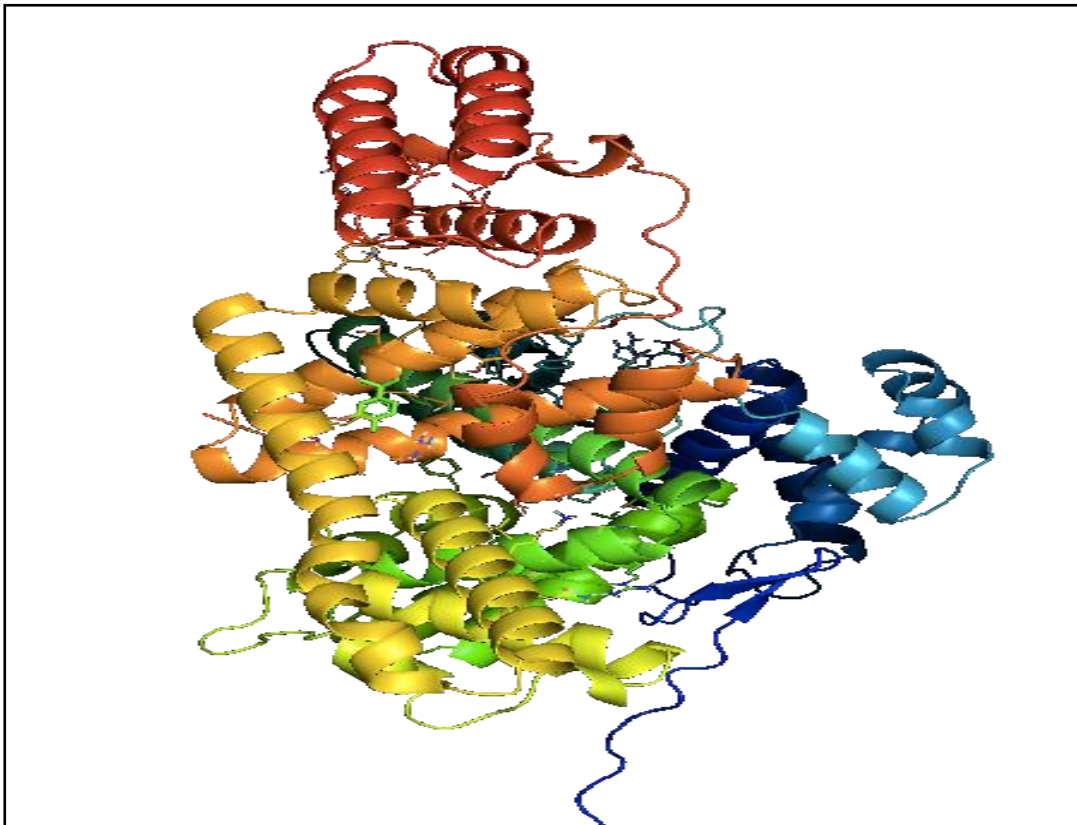


Figure23. le complexe récepteur (AFP)/Ligand (Carvacrol)

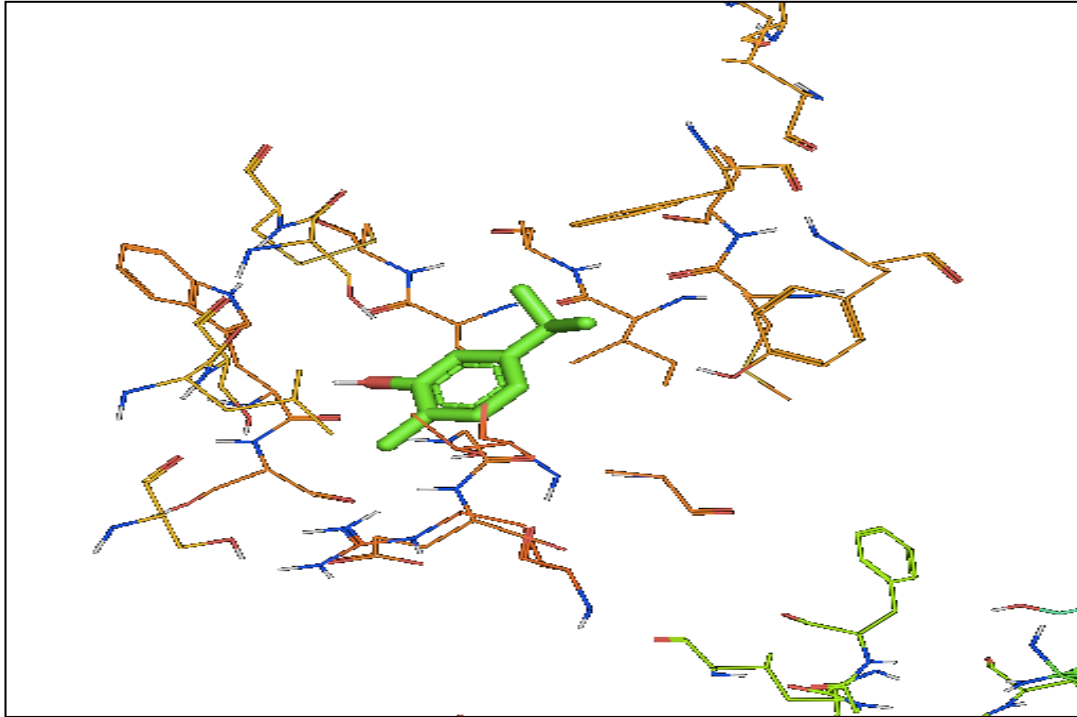


Figure24. Zone d'interaction du Ligand (Carvacrol) dans le site active de l'AFP

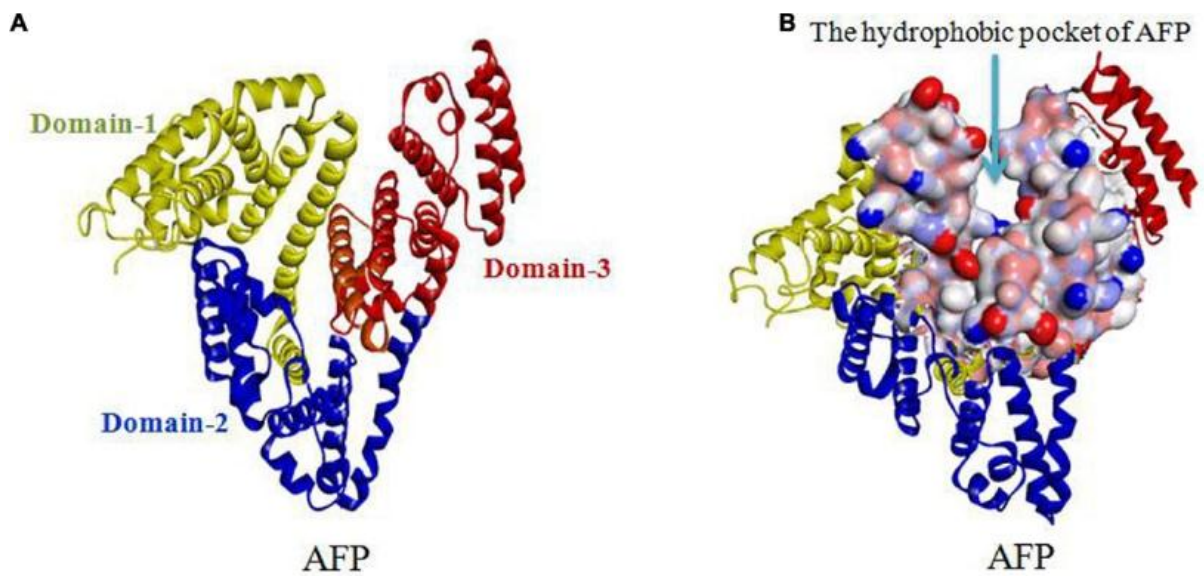


Figure25 .La structure tridimensionnelle de AFP

| Protéine | Ligand | Binding affinity ΔG (kcal/mol) | inhibition constant (k_i μm) | RMSD | amino acids involved in the binding site |
|------------------------|-----------|--|---|-------|---|
| Alpha-Fœtoprotéine AFP | Carvacrol | -6.4 | -20,12 | 1.586 | ILE 453, AIA 454, SER 411, SER 408, LEU 497, ARG 505, GLY 469 |

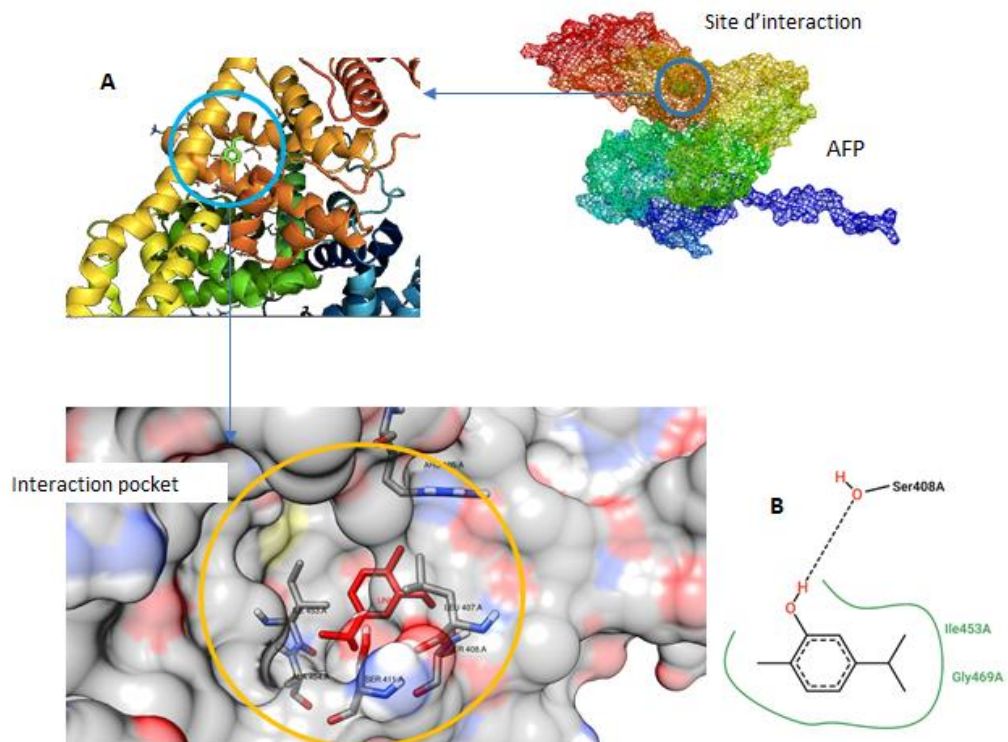


Figure 26. A. Protein_ligand interactions 3D, site d'interaction et les résidus d'acides aminés évoqués dans le site d'interaction / B. 2D interaction entre le Carvacrol et l'AFP

1.3. Résultats histopathologiques et Résultats de l'étude immunohistochimique

Nous avons réalisé une coloration topographique, l'hématoxyline-éosine (H&E), afin de rechercher l'effet de l'huile essentielle de thym chez le lapin. Par la suite, nous avons évalué l'expression immuno-histochimique d'un biomarqueurs : l'alpha-foetoprotéine (AFP) au niveau des cellules des testicules des lapins témoins et ceux supplémentés par l'HE.

L'observation microscopique des coupes histologiques du testicule à différents grossissements nous a permis de saisir l'architecture testiculaire ainsi de comparer l'aspect histologique des deux lots étudiés.

- **Histologie du testicule des lapins témoins**

L'observation des coupes histologiques transversales des testicules au microscope optique, révèle la présence d'une architecture normale des testicules avec un arrangement ordonné de la différenciation des cellules spermatiques, cellules de Sertoli et les spermatogonies au niveau de l'épithélium du tube séminifère.

Dans l'espace interstitiel on observe des cellules de Leydig. Les tubes séminifères sont de forme plus ou moins arrondis entourées d'une fine membrane basale comportent un épithélium germinatif (la ligne germinale) épaisse qui montre les différents stades de la spermatogénèse et une lumière (canal central) étroite riche en flagelle.

L'analyse microscopique des coupes histologiques du testicule des lapins témoins a révélé une architecture cellulaire normale (**planche 1 et 2**)

L'analyse microscopique des coupes histologiques du testicule des lapins supplémentés par l'huile essentielle a révélé une structure tissulaire similaire à celle des témoins (**planche 3 et 4**)

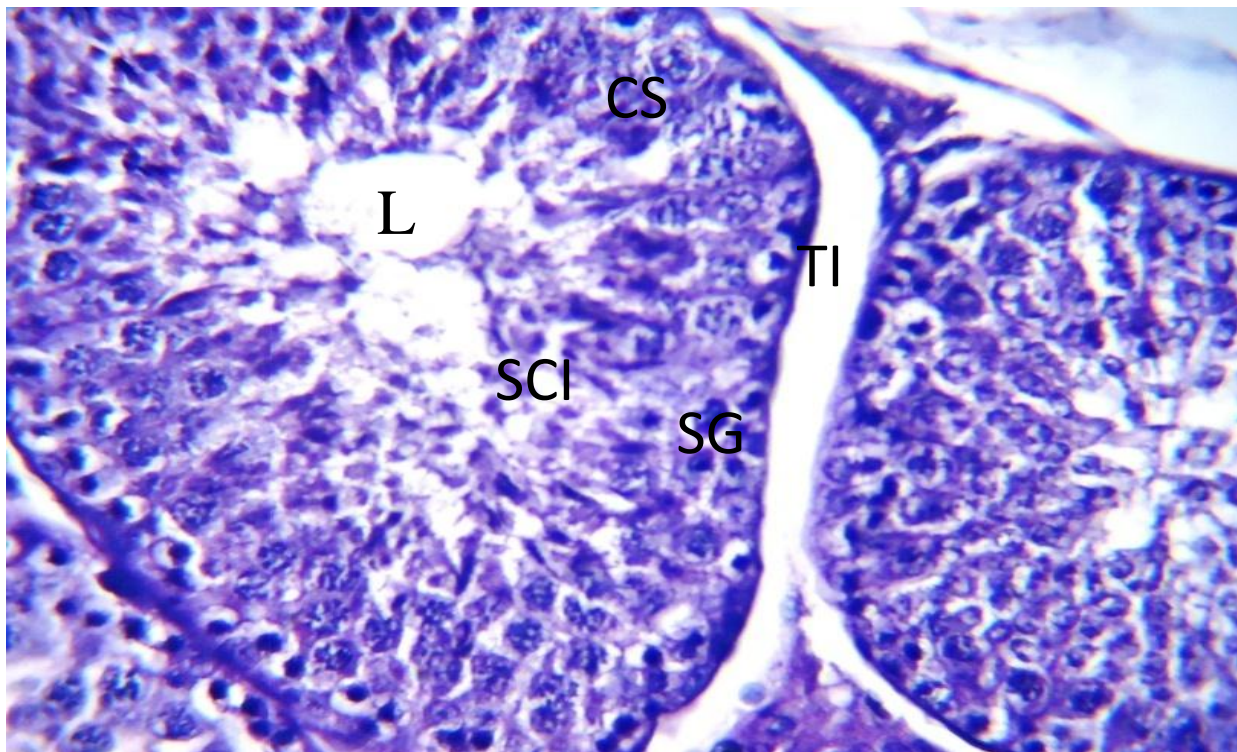
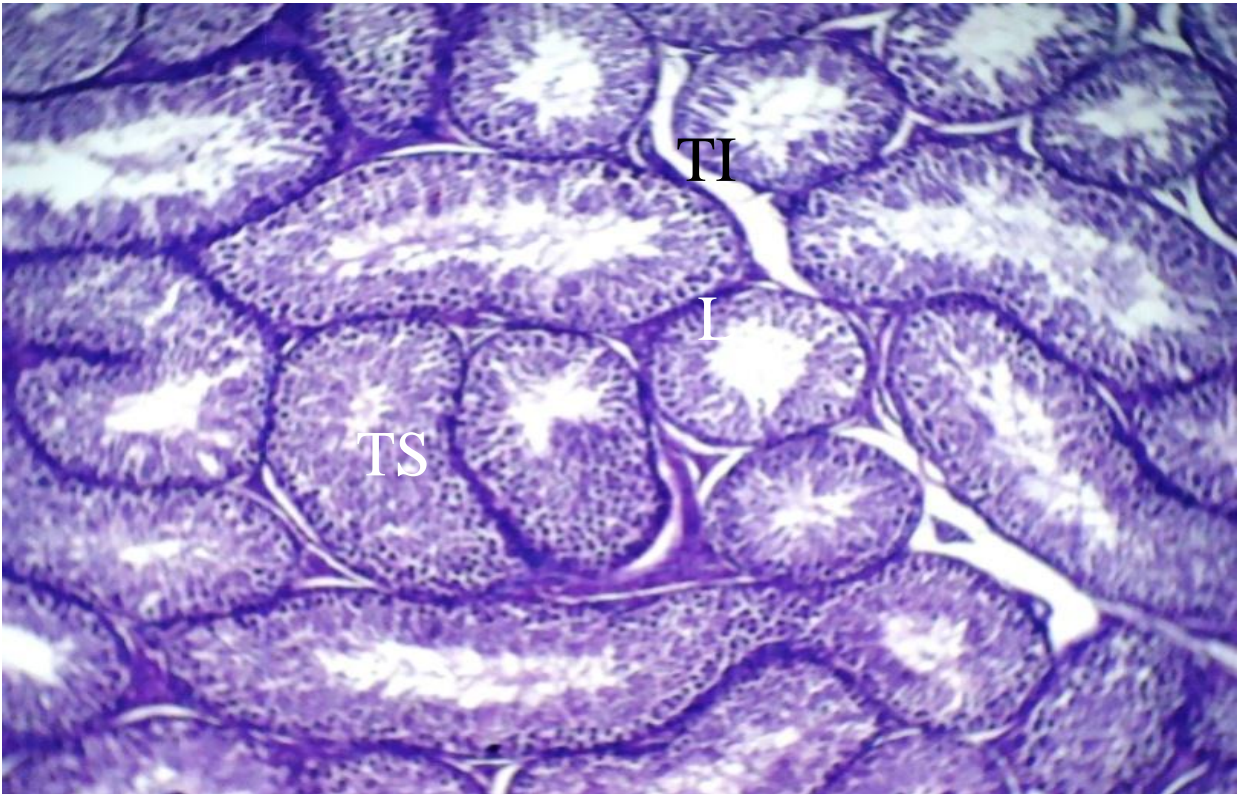


Planche 1 : Histologie du testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : X400 coloration &ETS tube séminifère, L lumière, TI tissu interstitielles, SG spermatogonie, SCI spermatocytel

CS cellule de sertoli

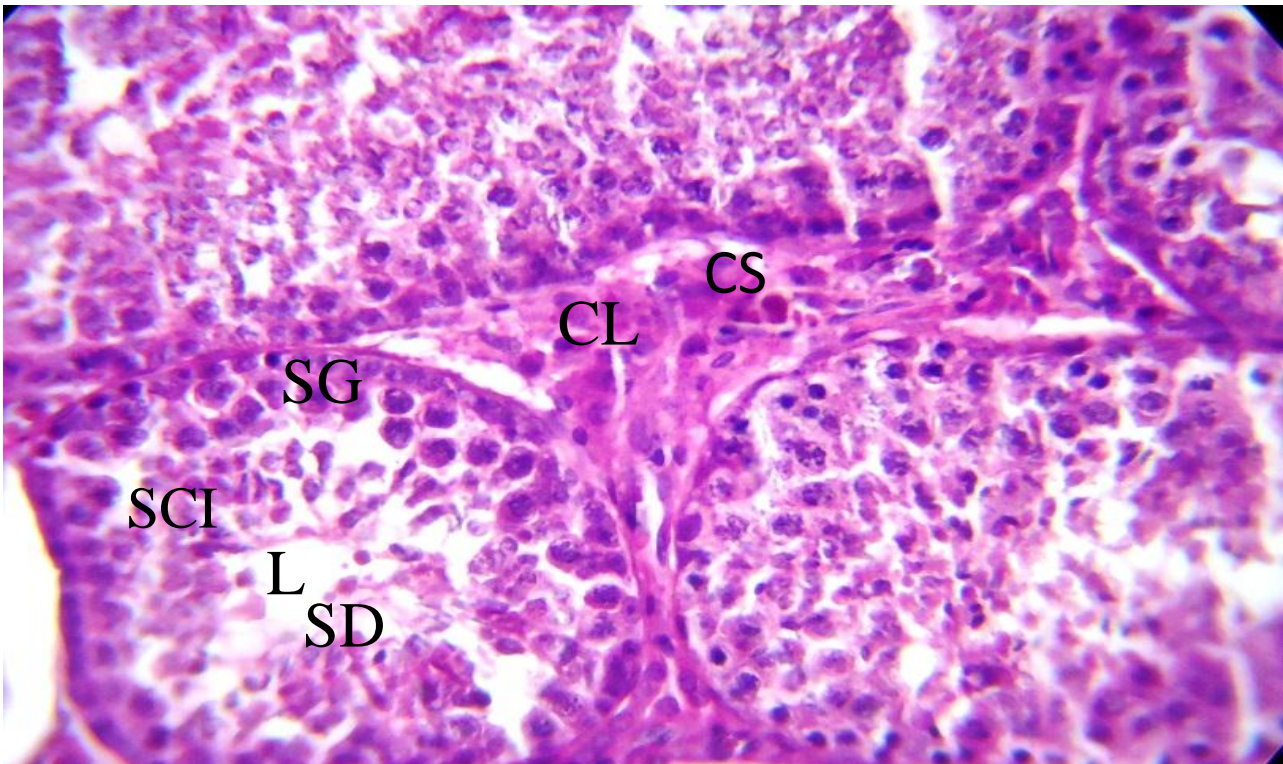
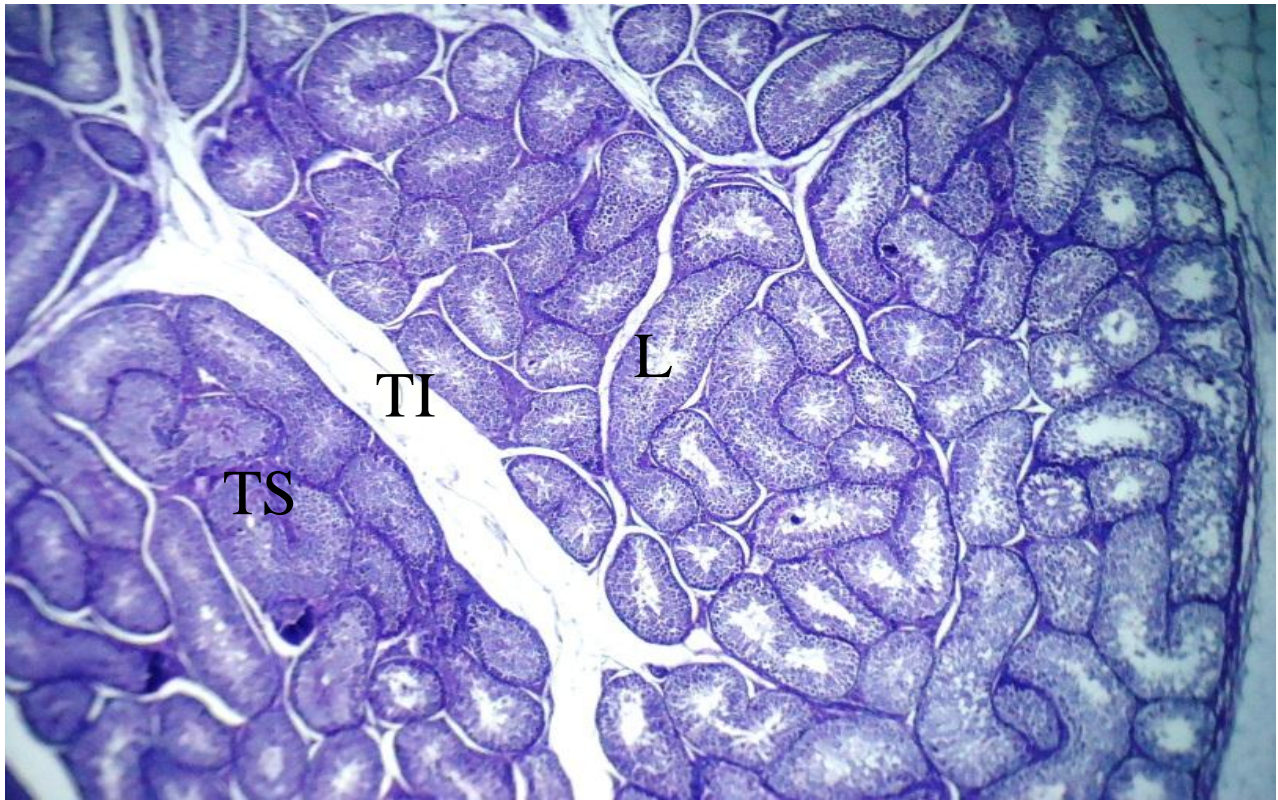


Planche 2 : Histologie du testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : X400 coloration H&E, SG Spermatogonies, CSI spermatocyte, CS capillaire sanguin, SD spermatide, L lumière, TI tissu interstitielle, TS tube séminifère

- **Expression de l'AFP dans le testicule des lapins témoins**

L'observation microscopique montre une expression très faible à négative de l'AFP au niveau du tissu testiculaire des lapins témoins (**Planche 5 et 6**).

- **Histologie du testicule des lapins traités par HET**

A partir des **planches 5 et 6**, on remarque que les lapins traités par l'huile essentielle de thym présentent une architecture testiculaire comparable à celui du groupe témoin, sans lésions histopathologiques visibles

- **Expression de l'AFP dans le testicule des lapins traités par HET**

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positive de l'AFP au niveau de tube séminifère cellule germinale. Au fort grossissement, on observe un immunomarquage positif au niveau membrane et cytoplasme (**planche 7 et 8**)

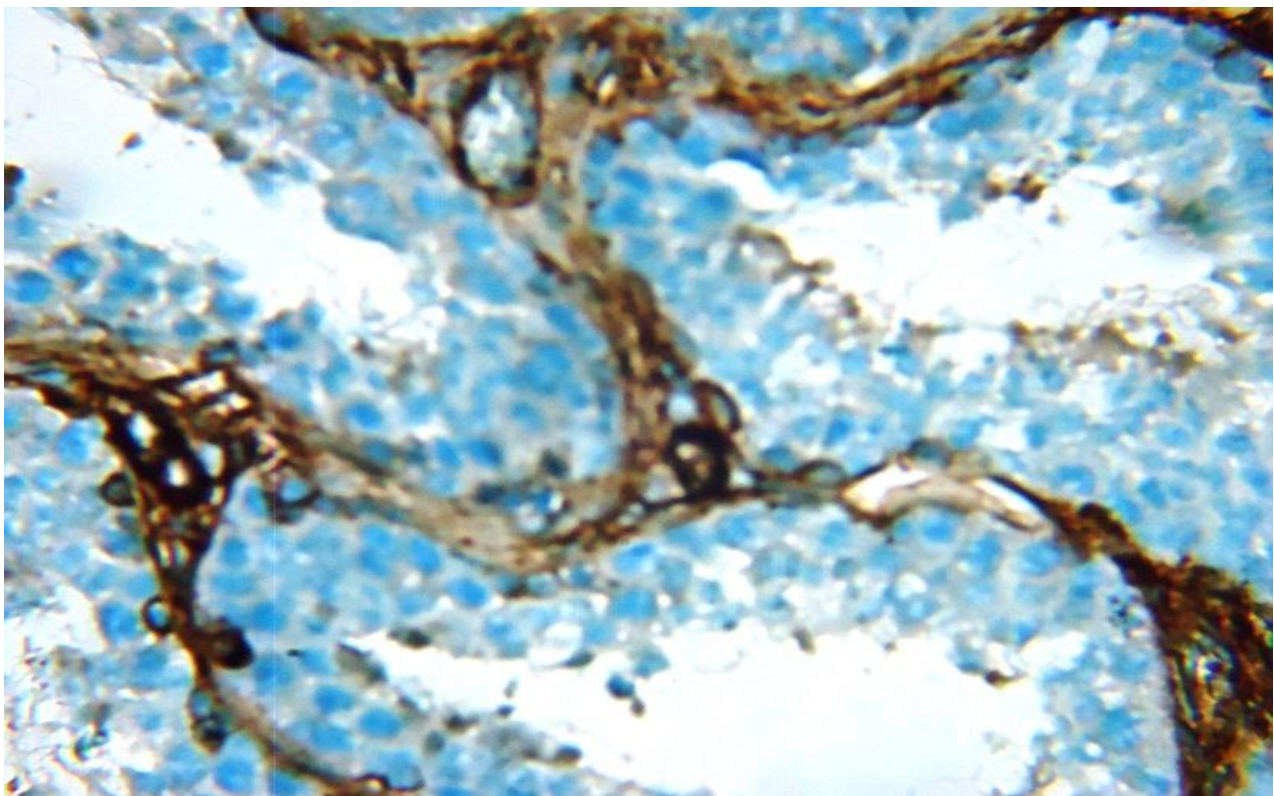
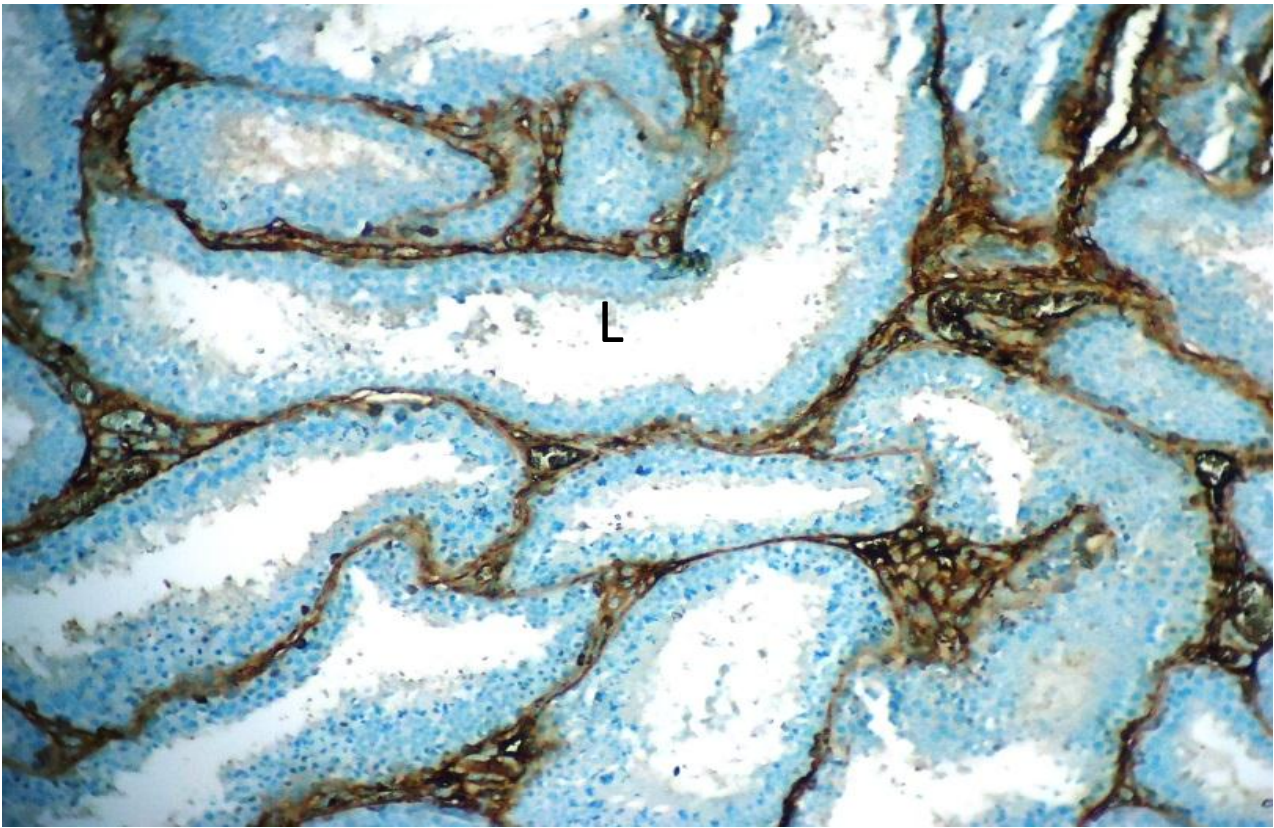


Planche 3: Expression immunohistochimique de la protéine alpha fœtoprotéine dans testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : X 400 , L lumière ,CL cellule de lydig

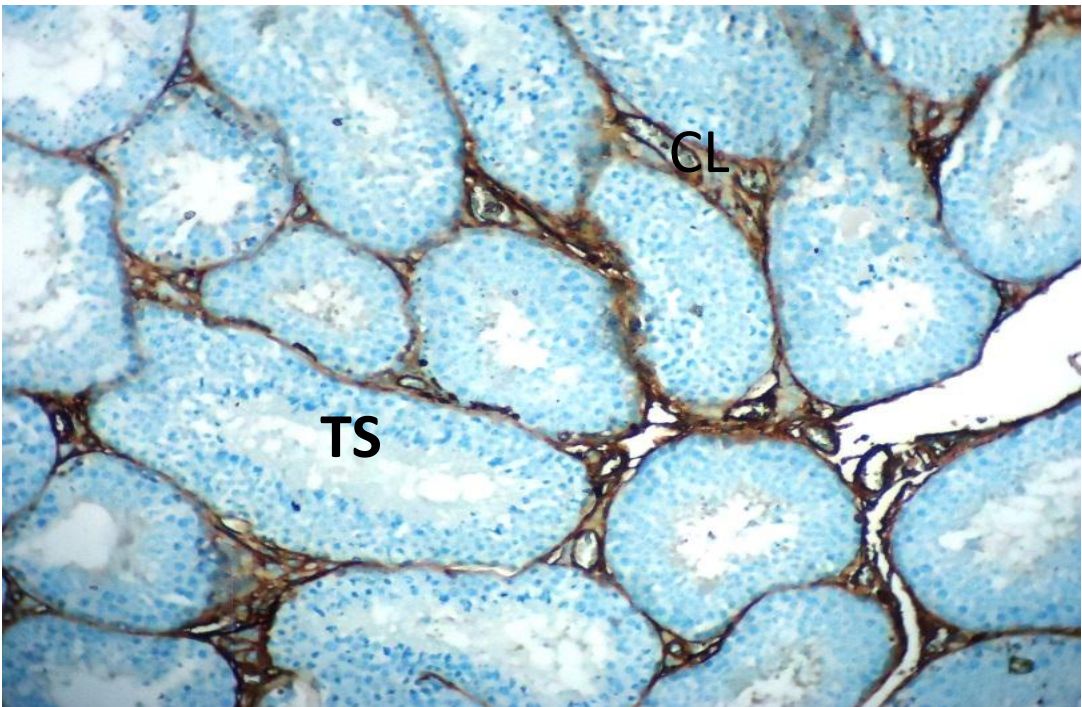
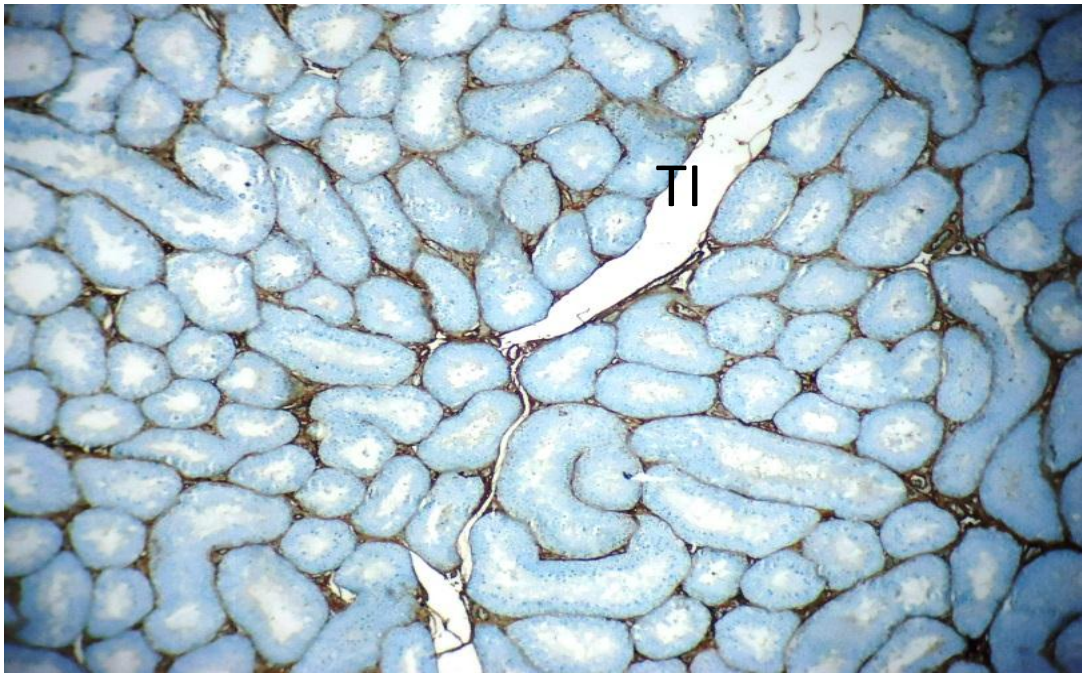


Planche 4 : Expression immunohistochimique de la protéine alpha foetoprotéine dans testicule chez le lapin témoin (A): X100, (B) : X 400, **TS** tube séminifère **CL** cellule de lydig

TI tissu interstitielle

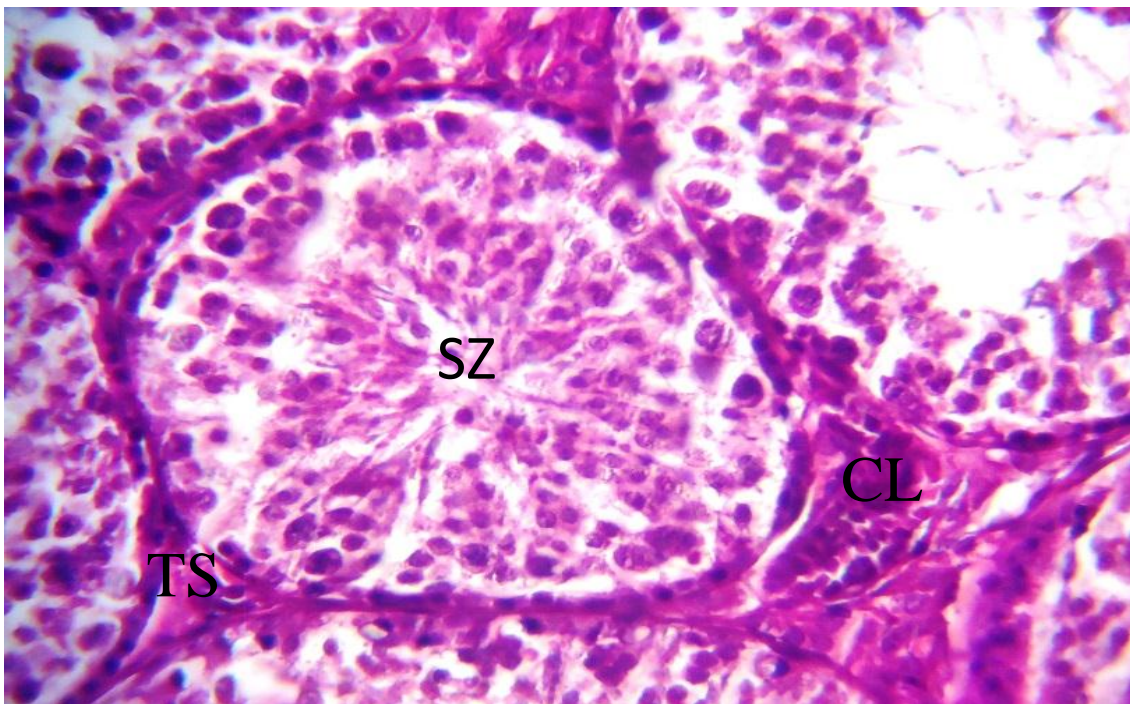
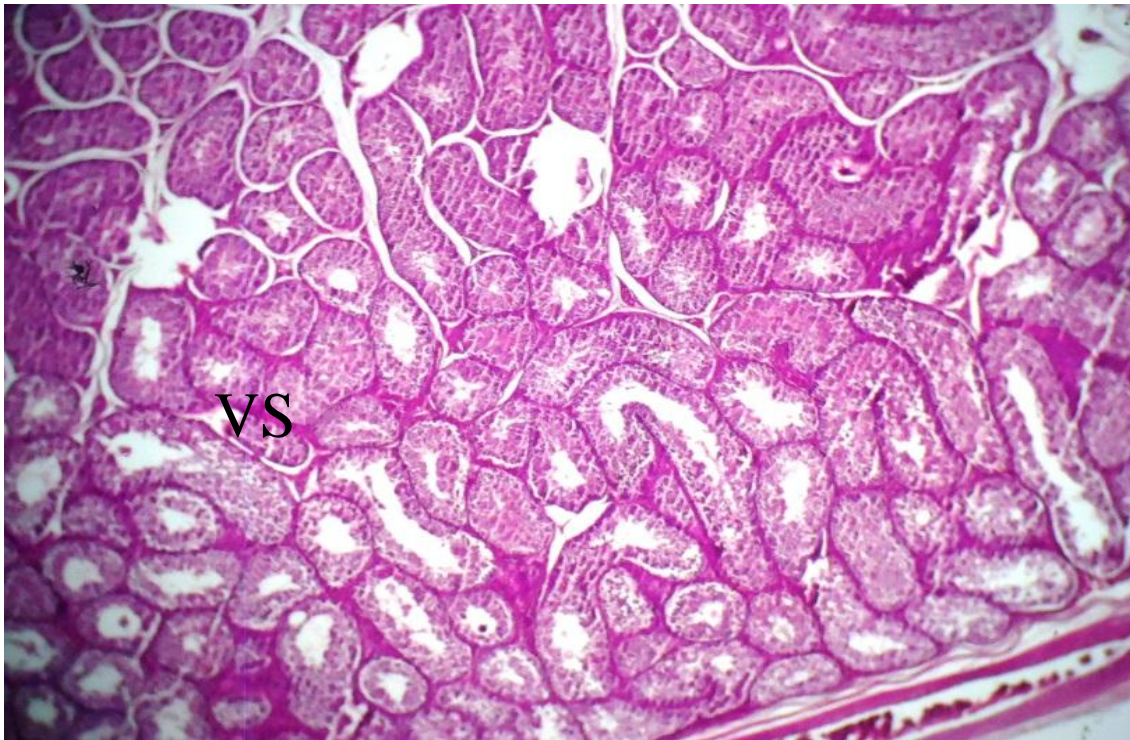


Planche 5 : Aspect histologique du testicule des lapins traités par huile de Thym (A): X100, (B) : X400 coloration HE , **TS** tissu interstitiel ,**VS** vaisseau sanguin **CL** cellule de Lydig**SZ** spermatozoïde

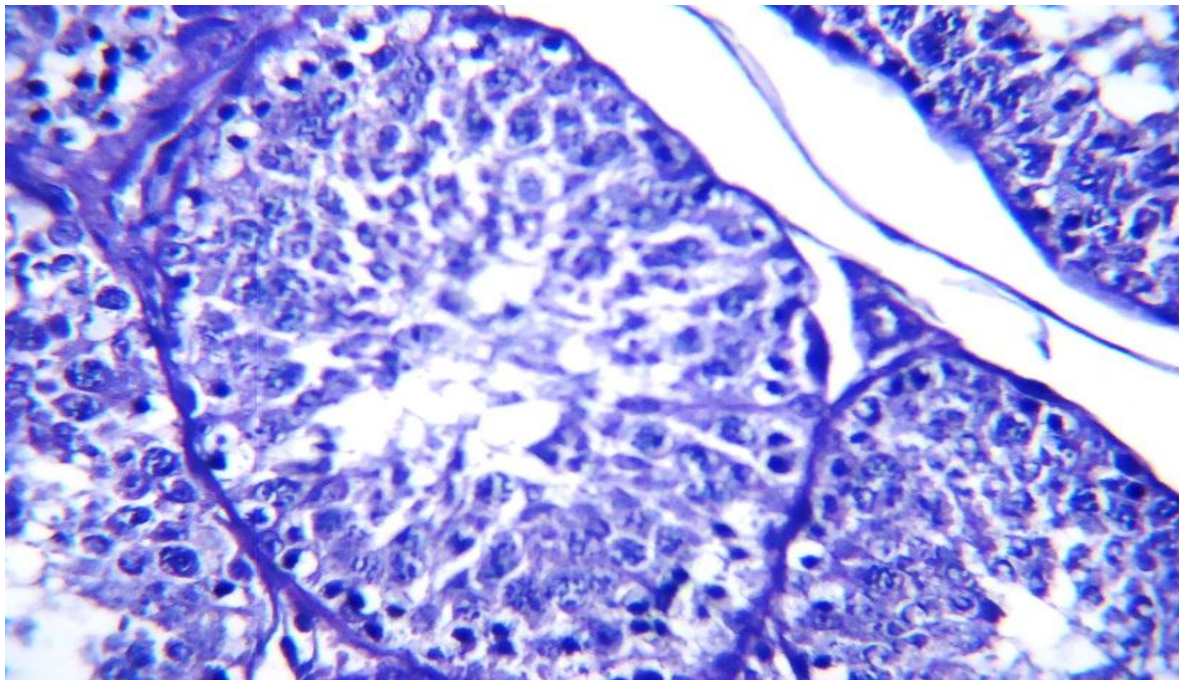
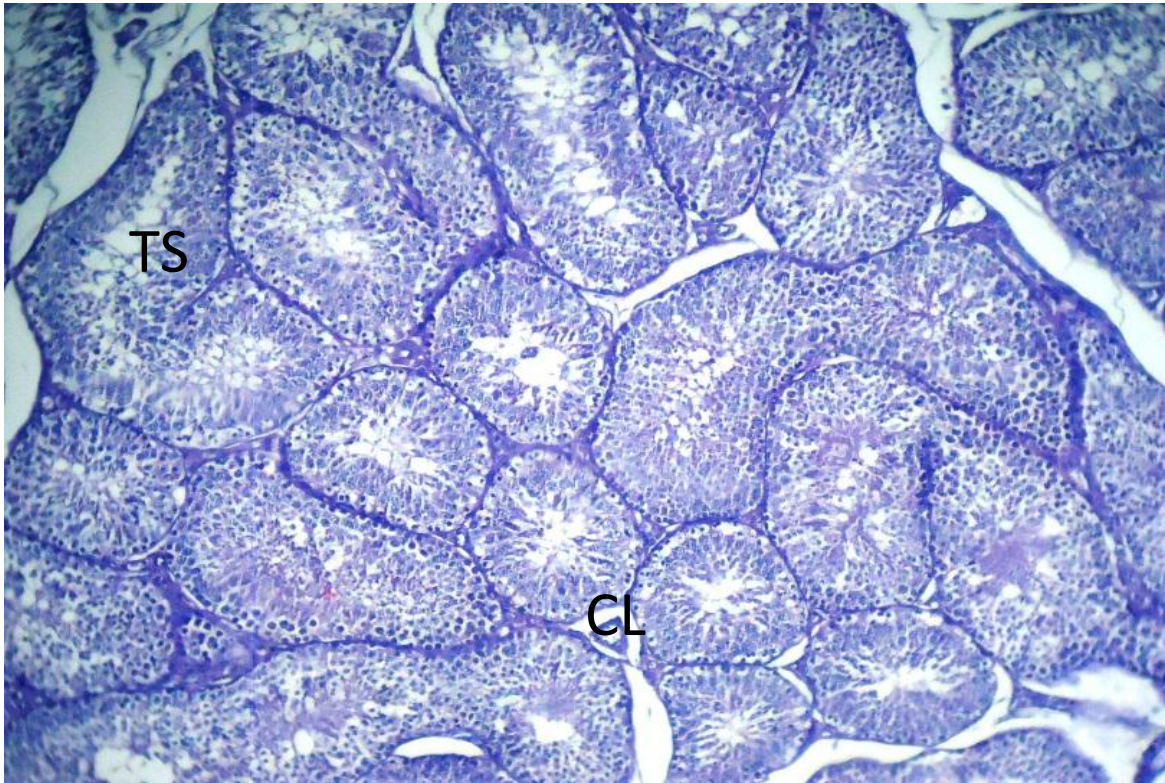


Planche 6 : Aspect histologique du testicule des lapins traités par huile de Thym (A): X100, (B) : X400 coloration HE, TS tube séminifère, CL cellule de leydig

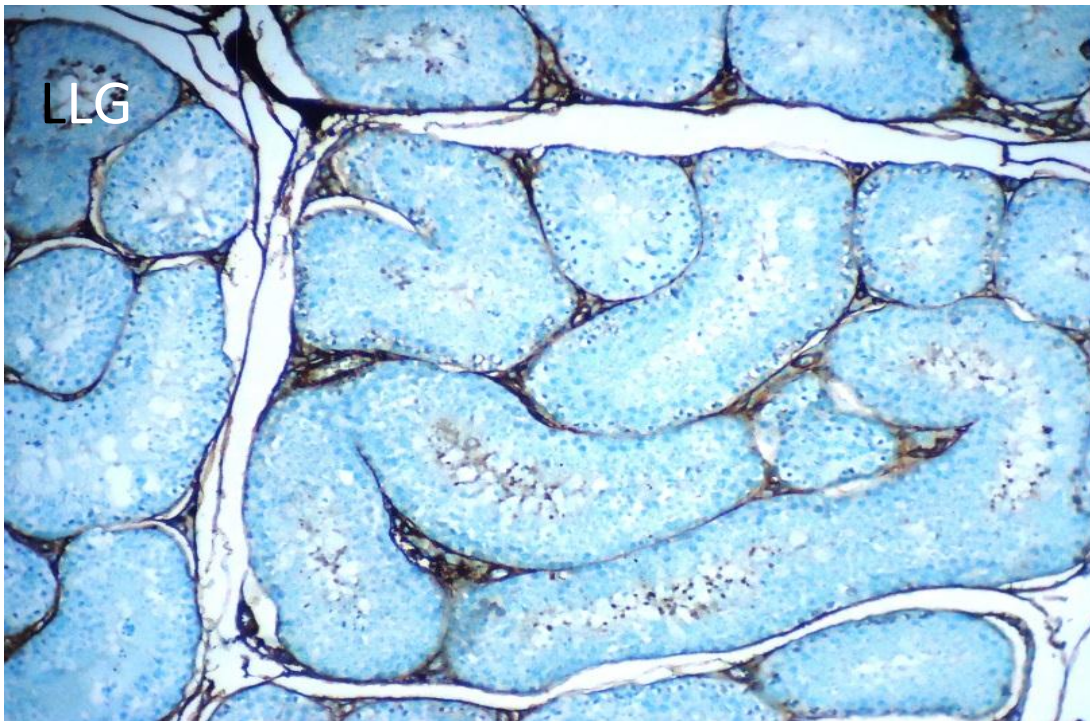
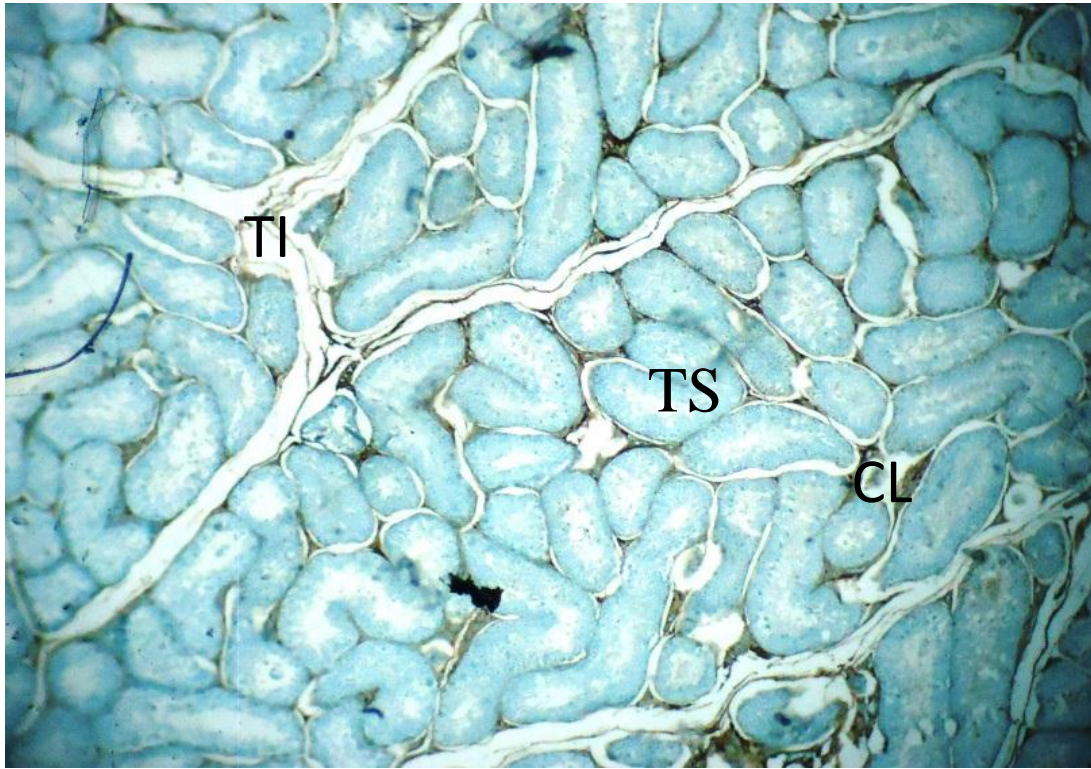


Planche 7: Expression immunohistochimique de la protéine AFP dans le testicule chez le lapin traité par huile de Thym (A): X100, (B) : X 400 ,TS tube séminifère , TI tissu interstitielle ,CL cellule de lydig ,LG la ligné germinale

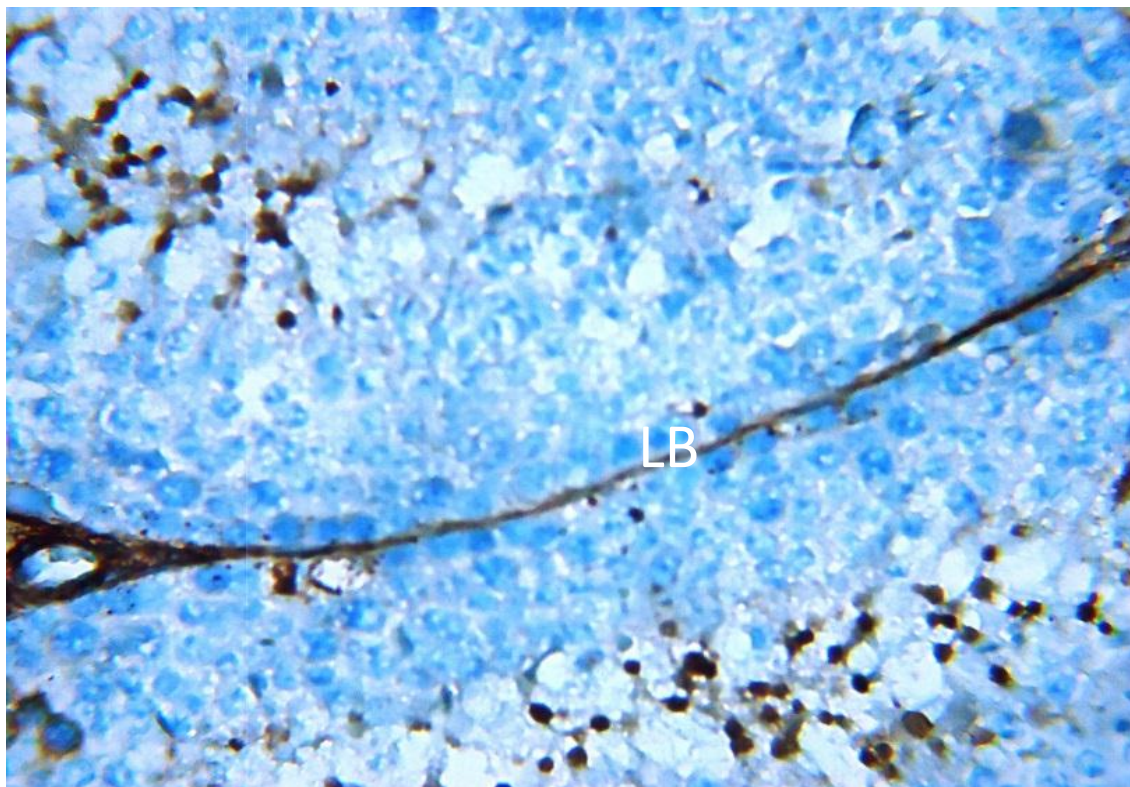
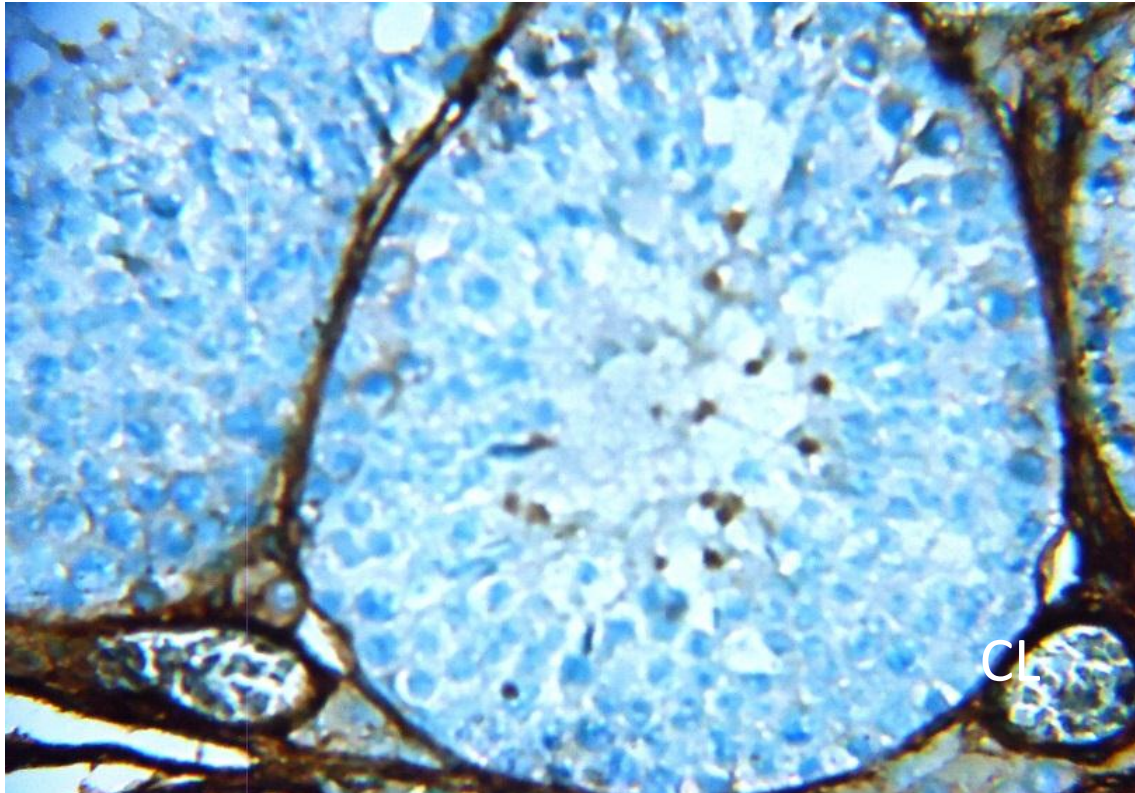


Planche 8 : Expression immunohistochimique de la protéine AFP dans le testicule chez le lapin traité par huile de Thym (A): X100, (B) : X 400 **LB** lame basale

Discussion générale

Le présent travail vise à évaluer l'expression d'un marqueur moléculaire l'alpha fœtoprotéine, une protéine de la famille des albumines, et l'activité protectrice potentielle de l'huile essentielle de thym (HET) (*Thymus vulgaris*) administré pendant 21 jours à des lapins mâles sur le parenchyme testiculaire.

L'observation des coupes histologiques transversales des testicules des deux lots de lapins témoins et supplémenté par l'HE de thym révèle la présence d'une architecture normale des testicules avec un arrangement ordonné de la différenciation des cellules spermatiques, cellules de Sertoli et les spermatogonies au niveau de l'épithélium du tube séminifère. Dans l'espace interstitiel on observe des cellules de Leydig. Les tubes séminifères sont de forme plus ou moins arrondis entourées d'une fine membrane basale comportent un épithélium germinatif (la ligne germinale) épaisse qui montre les différents stades de la spermatogénèse et une lumière (canal central) étroite riche en flagelle.

Les résultats de l'examen immunohistochimique montrent une expression très faible à négative de l'AFP au niveau du tissu testiculaire des lapins témoins et supplémentés par l'HET. Le signal immunoréactif AFP positif est localisé au niveau des tubes séminifères dans les cellules germinales au stade spermatide et spermatozoïdes.

L'AFP est la protéine plasmatique la plus abondante pendant la période fœtale Elle est exprimé à un taux élevé dans le sac vitellin, le foie fœtal et dans une moindre mesure dans L'intestin fœtal au cours du développement fœtal. Cependant, la synthèse de l'AFP est nettement diminuée après la naissance et seule une petite quantité d'AFP continue d'être produite chez L'adulte. L'expression de l'AFP peut être reprise dans certaines conditions physiopathologiques, telles que la régénération après une exposition à un xénobiotique (Tomasi, 1977)

L'augmentation de l'expression de l'AFP après une nécrose est considérée comme révélatrice d'une régénération ou d'une prolifération (Mizejewski, 2015) Plusieurs études ont démontré que l'AFP est anti-apoptotique (Zhang et al., 2007) et joue un rôle clé dans la promotion de la prolifération cellulaire .

Subséquemment et selon l'étude de « Bouhadid et al., 2006) portant sur l'évaluation du potentiel antioxydant, l'huile essentielle de « *Thymus vulgaris* » est la plus active comparée à d'autre huiles essentielles comme l'huile de *Corydothymus capitatus* et *thymus satureioides*.

De plus, l'étude de **Ismaili et al., (2017)** qui ont comparé l'activité antioxydante de l'huile essentielle de « *Thymus vulgaris* » à celle de « l'acide ascorbique » mesurée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, confirme que l'huile essentielle de *thym* contient une forte activité antioxydante qui est supérieure à celle de « l'acide ascorbique ».

Dans ce cadre, une caractérisation par GC-MS de l'HET nous a permis d'identifier le composé majoritaire de notre huile essentielle à savoir le carvacrol. De plus une étude histologique et immunohistochimique de l'expression de l'alpha fœtoprotéine suivi par l'étude par docking de l'affinité moléculaire du carvacrol et de l'alpha fœtoprotéine ont été réalisés.

Le docking moléculaire a été réalisé à l'aide du logiciel Auto DockVina, les récepteurs moléculaires sont téléchargés depuis la Protein Data Bank (PDB), le ligand Carvacrol est dessiné par le logiciel MarvinSketch et enregistré sous forme de fichier 3D. pdb, (Californie, États-Unis). Nos résultats du docking moléculaire montrent une faible affinité du carvacrol avec l'alpha fœtoprotéine.

Il a été démontré que l'AFP de différentes espèces de mammifères présente des caractéristiques structurales similaires, activités et fonctions. Par exemple, les AFP de rongeurs et d'humains peuvent lier les œstrogènes, les rétinoïdes, la bilirubine et les acides gras.

Degrés d'identité entre les domaines I, II et III de l'AFP des rongeurs sont d'environ 58,5 %, 67,0 % et 71,3 %, respectivement. Ceci permet de comparer les affinités de liaison aux ligands des AFP de rongeurs et humaines.

Sous *in vitro* conditions, la liaison des œstrogènes libres à HAFP n'a pas été observée. Cependant, les valeurs calculées sur la base des valeurs de K_a de liaison aux œstrogènes AFP obtenues expérimentalement montrent que le 17 β -estradiol a l'affinité de liaison la plus élevée et que le DES a la plus faible affinité pour le rat et souris AFPs. Dans les interactions protéine-ligand, nos résultats expliquent la faible affinité et degré de liaison du carvacrol avec l'AFP chez le lapin.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'utilisation en médecine traditionnelle du thym pour ces propriétés biologiques et pharmacologiques est largement étudiée. Les feuilles et les fleurs de ce genre sont utilisées pour leur propriétés : tonique, antiseptique, antitussif et carminatif aussi bien que pour le traitement des rhumes. Les huiles essentielles et les extraits du genre *Thymus* ont des utilisations pharmaceutique, cosmétologie, l'industrie de parfumerie ainsi que dans l'assaisonnement et dans la préservation de plusieurs aliments.

La présente étude porte sur le thym *Thymus vulgaris* qui appartient à la famille des lamiacées. Et vise à évaluer l'expression d'un marqueur moléculaire l'alpha foetoprotéine, une protéine de la famille des albumines, et l'activité protectrice potentielle de l'huile essentielle de thym (HET) (*Thymus vulgaris*) administré pendant 21 jours à des lapins mâles sur le parenchyme testiculaire.

D'après nos résultats histologiques, il s'avère que le HET n'entraîne pas des lésions histologiques du tissu testiculaire. En conclusion, l'ensemble de ces résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'action protectrice de l'huile essentielle de *T. vulgaris*. Cette action protectrice de HET pourrait être attribuée à la capacité antioxydante et l'effet anti-apoptotique de son composé majoritaire « le carvacrol ».

Les résultats de l'examen immunohistochimique montrent une expression très faible à négative de l'AFP au niveau du tissu testiculaire des lapins témoins et supplémentés par l'HET. Le signal immunoréactif AFP positif est localisé au niveau des tubes séminifères dans les cellules germinales au stade spermatide et spermatozoïdes. En conclusion les lapins supplémentés par l'HET ont une structure testiculaire similaire à celle du groupe témoin, sans lésions histopathologiques.

Pour conclure, L'huile essentielle de *T. vulgaris* demeure une réserve importante pour la recherche de substances biologiquement actives et il reste beaucoup à apprendre au sujet de ses modes d'action et ses propriétés pharmacocinétiques.

Notre étude nécessite des approfondissements pour mieux comprendre le mécanisme de la repro-protection induite par les huiles essentielles tel que *Thymus Vulgaris*.

Nous souhaitons développer notre recherche et nous orienté vers les Perspectives et les recommandations suivantes :

- Utiliser des techniques de coloration plus spécifiques des organes.
- Choisir des bons testes hormonaux biochimiques sanguins et urinaires pour mettre en évidence les autres fonctions.
- Tester d'autres plantes médicinales,
- utiliser d'autres méthodes d'extraction
- élargir le spectre d'activité biologique que peuvent posséder les huiles essentielles en thérapeute.
- Tester d'autres antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine A, et étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de leur effet protecteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cuenot, S., Gélébart, P., Sinquin, C., Collicec-Jouault, S., & Zykwinska, A. (2022). Relaxations mécaniques des hydrogels gouvernées par leurs réticulations physiques ou chimiques. *Journal du comportement mécanique des matériaux biomédicaux*, 105343 .
- Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Springer.
- Lin, B., Wang, Q., Liu, K., Dong, X., Zhu, M., & Li, M. (2021). Alpha-Fetoprotein Binding Mucin and Scavenger Receptors: An Available Bio-Target for Treating Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 96.
- 2008. 12
- Al Maqtari, M. A. A., Alghalibi, S. M., & Alhamzy, E. H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. *Turk J Biochem*, 36(4), 342-349.
- Autocrine regulation of apoptosis and bcl-2 expression by nerve growth factor in early differentiating cerebellar granule neurons involves low affinity neurotrophin receptor. *Neurochemistry international*, 31(2), 177-191
- Barone, F. S., Rowe, R. K., & Quigley, R. M. (1990). Laboratory determination of chloride diffusion coefficient in an intact shale. *Canadian Geotechnical Journal*, 27(2), 177-184.
- Bazylko, A. G. N. I. E. S. Z. K. A., & Strzelecka, H. A. L. I. N. A. (2007). A HPTLC densitometric determination of luteolin in *Thymus vulgaris* and its extracts. *Fitoterapia*, 78(6), 391-395.
- Bisht, D., Pal, A., Chanotiya, C. S., Mishra, D., & Pandey, K. N. (2011). Terpenoid composition and antifungal activity of three commercially important essential oils against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Natural product research*, 25(20), 1993-1998.
- Bonneau, M., Touraille, C., Pardon, P., Lebas, F., Fauconneau, B., & Rémignon, H. (1996). Amélioration de la qualité des carcasses et des viandes. *Productions animales*, 95-110. MULLER et CLOS, 1997) Muller, Y., Tangre, K., & Clos, J. (1997).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Braun, J. P., Bourgès-Abella, N., Geffré, A., Concordet, D., & Trumel, C. (2015). The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. *Veterinary Clinical Pathology*, 44(1), 8-25. totora derrickson .2007
- Corneloup, J. (1997). Risques, opinion publique et pratiques d'escalade: Sociologie du sport. Sociétés (Paris), (55), 23-40.
- El Karroumi, J., El Haib, A., Manoury, E., Benharref, A., Daran, J. C., Gouygou, M., & Urrutigoity, M. (2015). Selectivity controlled by ligand tuning in the palladium-catalysed cyclocarbonylation: Synthesis of new γ and δ lactones from a natural sesquiterpene. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 401, 18-26.
- El-Nekeety, AA, Mohamed, SR, Hathout, AS, Hassan, NS, Aly, SE et Abdel-Wahhab, MA (2011). Propriétés antioxydantes de l'huile de *Thymus vulgaris* contre le stress oxydatif induit par l'aflatoxine chez les rats mâles. *Toxicon* , 57 (7-8), 984-991.
- Fourcier 2017. Leung, A. A., Daskalopoulou, S. S., Dasgupta, K., McBrien, K., Butalia, S., Zarnke, K. B., ... & Canada, H. (2017).
- Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., & Majzoobi, M. (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 85-91.
- Gladstar, R. (2013). *Cultiver et utiliser les plantes médicinales*. Marabout.
- Grünwald, PD (2007). *Le principe de la longueur de description minimale* . Presse du MIT.
- Hanif, H., Ali, MJ, Susheela, AT, Khan, IW, Luna-Cuadros, MA, Khan, MM et Lau, DTY (2022). Le point sur les applications et les limites de l'alpha-foetoprotéine pour le carcinome hépatocellulaire. *Journal mondial de gastroentérologie*, 28 (2), 216.
- Hypertension Canada's 2017 guidelines for diagnosis, risk assessment, prevention, and treatment of hypertension in adults. *Canadian Journal of Cardiology*, 33(5), 557-576. barone. 1990
- Imamoglu, E., Demirel, Z., & Dalay, M. C. Evaluation of Different Microalgae Strains for Biomass Production. In *FIRST NATIONAL WORKSHOP ON MARINE BIOTECHNOLOGY AND GENOMICS* (p. 107).
- Jennings et al., (2017) Larsen, A. H., Mortensen, J. J., Blomqvist, J., Castelli, I. E., Christensen, R., Dułak, M., ... & Jacobsen, K. W. (2017). The atomic simulation

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- environment—a Python library for working with atoms. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(27), 273002.
- Kiralan, SS, Dogu-Baykut, E., Kittipongpittaya, K., McClements, DJ et Decker, EA (2014). Augmentation de l'efficacité antioxydante des tocophérols par solubilisation des tensioactifs dans les émulsions huile-dans-eau. *Journal de chimie agricole et alimentaire* , 62 (43), 10561-10566.
 - Kohler, D. P., Uppala, S. M., Simmons, A. J., Berrisford, P., Poli, P., Kobayashi, S., ... & Vitart, F. (2011).
 - Mémoire de master : biochimie appliqué. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2018. P 93
 - Mokrani, E. H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique.
 - Mizejewski, G. J. (2001). Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Experimental biology and medicine*, 226(5), 377- 408.
 - Mizejewski, G. J. (2016). The alpha-fetoprotein (AFP) third domain: a search for AFP interaction sites of cell cycle proteins. *Tumor Biology*, 37(9), 12697-12711.
 - Morale R, 2002. The history, botany and taxonomy of the genre *Thymus* in Thyme. Ed Taylor. P12
 - Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, FC, Carle, R. et Schnitzler, P. (2006). Effet antiviral d'extraits aqueux d'espèces de la famille des Lamiaceae contre le virus Herpes simplex type 1 et type 2 in vitro. *Planta medica* , 72 (15), 1378-1382.
 - Salahshoor, MR, Abdolmaleki, A., Faramarzi, A., Ziapour, A., & Roshankhah, S. (2020). *Thymus vulgaris* atténue les dommages à la reproduction induits par le myleran en diminuant le stress oxydatif et la peroxydation lipidique chez les rats

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- mâles. *Journal des sciences de la reproduction humaine*, 13 (1), 38–45. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_134_19
- Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K. H., & Reichling, J. (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*, 24(S1), S20-S28.
 - Sell, S. (1980). Alphafetoprotein. *Cancer markers*, 249-293.
 - Stevens et Lowe, 1997) Hendrickson, S. C., St Louis, J. D., Lowe, J. E., & Abdelaleem, S. (1997). Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry*, 166(1), 85-94. al (Beock et larcier, 1997).
 - Taoudiat, A., Djenane, D., Ferhat, Z., & Spigno, G. (2018). The effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and different packaging systems on the photo-oxidative stability of Chemlal extra-virgin olive oil. *Journal of food science and technology*, 55(10), 4212-4222.
 - The ERA-Interim reanalysis: Configuration and performance of the data assimilation system. *Quarterly Journal of the royal meteorological society*, 137(656), 553-597. BourgèsAbella, 2015
 - Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. p 75 El Hadji Said K. Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire.
 - Thèse de Doctorat : chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France.
 - These de Master : Chimie. Tlemcen : université de TLEMCEN. Algérie. 2016. 50PAlexandre Beautrait. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel.
 - Tortora, G. J., & Derrickson, Principles of Anatomy and Physiology, . Hoboken: John Wiley & Sons. les référence des photo de chapitre testicule : lebas.et al. 1996
 - Vouillamoze, J. F., & Christ, B. (2020). *Thymus vulgaris* L.: thyme. In *Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants* (pp. 547-557). Springer, Cham.

ANNEXES



Distributeur de paraffine



Microtome Liecia

Annexe



Photo originale des testicules de lapin



Automate VENTANA

Annexe



Sacrifice et prélèvement des reins (Photos originaux)