

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DIMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université BLIDA 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**



**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du Diplôme

**MASTER**

Option : **Génétique**

**Thème**

**Expression de quelques Marqueurs de Prolifération Cellulaire (p53, Bcl-2), au Niveau de l'intestin de lapin traité par un Insecticide Avermectine et Co-supplémenté par les vitamines C et E Etude immunohistochimique et Bioinformatique.**

Présenté par

**MERADI Abdellah Hamza** et **FLICI Linda**

**Date de soutenance : 17 juillet 2019**

Devant le jury compose de :

<b>Mme CHAKHMA A.</b>	<b>MAA</b>	<b>Présidente.</b>
<b>Mme BENZAOUZ F.</b>	<b>MAA</b>	<b>Examinatrice.</b>
<b>Mme KHALDOUN H.</b>	<b>MCA</b>	<b>Promotrice.</b>
<b>Mme OUJIDA F.</b>	<b>MCA</b>	<b>Co-promotrice.</b>
<b>Mme ABDUL-HUSEIN A.</b>	<b>MCB</b>	<b>Co-promotrice.</b>

**Promotion : 2018-2019**

## REMERCIEMENTS

Avant tout, Nous remercions Dieu le tout puissant, qui nous a donné l'envie et la force pour mener à terme ce travail.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à Notre promotrice Mme « **KHALDOUN H.** » Maitre de conférence A, qui a bien voulu diriger ce travail, nous la remercions aussi d'en avoir partagé ses connaissances et pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons à remercier Notre Co-promotrice Mme « **OUDJIDA F.** » Maitre de conférences A, du laboratoire d'anatomopathologie CHU de BENI-MESSOUS. Pour sa patience, ses conseils, et sa disponibilité.

Nous remercions également notre Co-promotrice Mme « **ABDEL HOSSEIN A.** » Maitre de conférence, B Pour son aide ainsi que ses encouragements et son optimisme.

Nous tenons également à remercier tous les membres de notre jury d'avoir acceptées d'évaluer notre travail. Nous remercions également Mme « **CHAKHMA A.** » Maitre assistante A, d'avoir acceptée de présider notre jury de soutenance.

Nous remercions également Mme « **BENAZOUZ F.** » Maitre assistant A, d'avoir acceptée d'examiner ce travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à tous les membres du laboratoire d'anatomopathologie de CHU BENI-MESSOUS, Nous pensons spécialement à Mme HANANE. Et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de la partie expérimentale.

Nos remerciements vont également à Mme responsable de laboratoire d'immunohistochimie CHU BENI MESSOUS, pour son aide, sa patience et ses encouragements.

On souhaiterait aussi adresser nos gratitudes à tous nos enseignants pour l'accompagnement et le savoir transmis tout au long de notre parcours universitaire.

Nous tenons également à remercier tous ceux et celle que nous ont aidé dans la réalisation de ce travail et qui nous ont soutenu dans les moments difficiles.

# *Dédicace*

*Je tiens tout d'abord à dédier ce modeste travail à mes chers parents, qui m'ont donné tout ce dont j'avais besoin afin de parvenir à ce stade : amour persévérance et bonne éducation et à qui revient le mérite de ce que je suis aujourd'hui.*

*A mes frères « Abdoulam », « Mohamed ».*

*Mes sœurs « Meriem », « Ikram », « Zohra ».*

*A mes meilleures amies pour leurs incessants encouragements et leur soutien durant les épreuves difficiles que nous avons traversées.*

*A ma chère binôme Linda*

*Je te remercie pour ta volonté de travail, hamdoullah, on est arrivé à notre objectif.*

*Abdellah*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail:*

*A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et leurs sacrifices.*

*A ma chère sœur djazia.*

*A mes cousins et mes cousines. A Tous les membres de ma famille qui méritent être aimés.*

*A toutes les étudiants de la promotion génétique 2018/2019 .*

*A mon cher binôme abdelah.*

*A mes amies Meriem, Sabrina, Nour el Houda roufaïda, Fatima.*

*A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mn cœur.*

*FLICI*

## Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet amélioratif des vitamines C et E suite à une toxicité subaiguë par un insecticide avermectine sur l'intestin (duodénum) des lapins males de souche local *Oryctolagus cuniculus*. Pour cela vingt lapins males ont été répartis en quatre lots : témoin (T), traité par les vitamines C et E (CE), traité par l'avermectine (AV), traité par l'avermectine et coadministré par les vitamines C et E (AV+CE). Une étude histopathologique et immunohistochimique (expression de la P53 et la bcl-2) du parenchyme duodéal ainsi qu'une étude bioinformatique du gène P53 par des logiciels d'analyse de génome NCBI et COSMIC ont été réalisés. L'observation microscopique du parenchyme duodéal des lapins traités par l'avermectine en comparaison avec les trois autres lots révèle des lésions à savoir un infiltrat inflammatoire au niveau de l'axe conjonctif des villosités intestinales ; une hyperplasie des glandes de Brunner et un aplatissement de l'épithélium des villosités. Cependant, l'examen immunohistochimique montre un immun marquage cytoplasmique et /ou nucléaire positive de l'expression des protéines P53 et bcl-2, chez les animaux témoins et coadministrés (AV + CE) au niveau des cellules inflammatoires et des cellules des villosités en anoïkis. Bien que, une expression cytoplasmique modérée des protéines P53 et bcl-2 a été constatée chez le lot traité par AV en comparaison avec les autres lots, cependant malgré l'hyperplasie observée chez les traités par avermectine les cellules des glandes de Brunner ne montrent aucune immuno réactivité ni par la P53 ni bcl-2 chez les quatre lots d'animaux. L'étude bioinformatique montre que les codons 175, 248 et 273 sont les trois points chauds de mutation retrouvés dans de nombreux cancers et se situent au niveau du domaine central du gène p53 ou au niveau du site de liaison spécifique avec l'ADN. Nous constatons aussi l'existence d'un casseur de séquence d'ADN entre la séquence p53 de référence et les 2 isomères chez le lapin. En conclusion, la supplémentation par les vitamines C et E a permis de restaurer les lésions duodénales provoquées par l'avermectine chez les lapins males.

**Mots clés :** Avermectine, vitamine C et E, lapin, duodénum, Histologie, Immunohistochimie, P53, bcl2, bioinformatique.

## **Abstract**

The aim of this work is to evaluate the improving effect of vitamins C and E following subacute toxicity by an avermectin insecticide on the intestine (duodenum) of male rabbits of local strain *Oryctolagus cuniculus*. For this purpose, twenty male rabbits were divided into four batches: control (T), treated with vitamins C and E (CE), treated with avermectin (AV), treated with avermectin and co-administered with vitamins C and E (AV+CE). A histopathological and immunohistochemical study (expression of P53 and bcl-2) of duodenal parenchyma and a bioinformatics study of the P53 gene using NCBI and COSMIC genome analysis software were performed. Microscopic observation of the duodenal parenchyma of avermectin-treated rabbits compared to the other three batches reveals lesions in the mucosa and duodenal sub mucosa, including an inflammatory infiltration in the connective axis of the intestinal villi; hyperplasia of Brunner's glands; and flattening of the epithelium of the villosities. However, immunohistochemical examination shows positive cytoplasmic and/or nuclear immunolabelling of the expression of the proteins P53 and bcl-2 in control and co-administered animals (AV + EC) in inflammatory cells and anoikis villus cells. Although, moderate cytoplasmic expression of the proteins P53 and bcl-2 was observed in the batch treated with AV compared to other batches. The bioinformatics study shows that codons 175, 248 and 273 are the three mutation hot spots found in many cancers and are located at the central domain of the p53 gene or at the specific DNA binding site. We also note the existence of a DNA sequence breaker between the reference p53 sequence and the 2 isomers in rabbits. In conclusion, vitamin C and E supplementation has restored avermectin-induced duodenal lesions in male rabbits.

## الملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم التأثير المحسن للفيتامينات C و E بعد التسمم تحت الحاد بواسطة مبيد حشري avermectine على الأمعاء (الاثني عشر) للأرانب الذكور من السلالة الموضعية *Oryctolagus cuniculus*. لهذا الغرض ، تم تقسيم عشرين من الأرانب الذكور إلى أربع مجموعات: الشاهد (T) ، المعامل بالفيتامينات C و E (EC) ، المعامل با (AV) avermectine ، المعامل بال avermectine و الفيتامينات C و E (AV+CE) . تم إجراء دراسة نسيجية و مناعية (تعبير عن P53 و bcl-2) للحمية الاثني عشر ودراسة معلوماتية حيوية لجين P53 باستخدام برنامج تحليل الجينوم NCBI و COSMIC. تكشف الملاحظة المجهرية للحمية الاثني عشر للأرانب التي تعالج با avermectine مقارنة بالمجموعات الثلاثة الأخرى عن وجود آفات في الغشاء المخاطي والغشاء المخاطي الاثني عشر ، بما في ذلك تسلل التهابي في المحور الضام في الزغابات المعوية ؛ تضخم الغدد برونز ، وتسطيح ظهارة الزغابات ، ومع ذلك ، يُظهر الفحص المناعي الكيميائي التسمم المناعي الإيجابي السيتوبلازمي و / أو النووي للتعبير عن البروتينات P53 و bcl-2 في المجموعة المعاملة بالفيتامينات فقط و المجموعة المعاملة با avermectine و المضاف إليها الفيتامينات (AV + EC) في الخلايا الالتهابية وخلايا anoikis . وعلى الرغم من ذلك ، لوحظ التعبير المعتدل السيتوبلازمي للبروتينات P53 و bcl-2 في الدفعة التي عولجت بـ AV مقارنة بالدفعات الأخرى. تبين دراسة المعلوماتية الحيوية أن الكودونات 175 و 248 و 273 هي النقاط الساخنة الثلاثة للطفرة الموجودة في العديد من السرطانات وتقع في المجال المركزي لجين p53 أو في موقع ربط الحمض النووي المحدد. نلاحظ أيضا وجود قواطع تسلسل الحمض النووي بين تسلسل p53 المرجعية وايزومرات 2 في الأرانب. في الختام ، استعادت مكملات فيتامين (ج) و (هـ) آفات الاثني عشر الناجمة عن avermectine في الأرانب الذكور.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**8-OHdG** : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine.

**ABM** : Abamectine.

**Ac** : Anticorps.

**ADHA** : l'Acide L Dehydroascorbique .

**Ag** : Antigène.

**AGPI** : Les Acides Aras Polyinsaturés.

**ANS** : Apport Nutritionnels Conseilles .

**AV** : Avermectine.

**Bad** : Bcl-2-associated death promoter « Promoteur de la mort associé à Bcl-2 ».

**Bak** : Bcl-2 homologous antagonist killer « Antagoniste homologue Bcl-2 ».

**Bax** : Bcl-2-associated X protein « Protéine X associée à Bcl-2 ».

**BCL2** : Lymphome a Cellules B 2.

**BH** : Bcl-2 Homologie.

**Bid** : BH3 interacting domain « BH3 domaine d'interaction ».

**CAK** : Kinase Activateur de Cdk.

**CDK** : Kinases Dépendants Des Cyclines.

**CE** : Vitamines C et E.

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire..

**DL 50** : Dose Létale 50.

**Ensembl** : Institut Européen de bioinformatique.

**EPA** : Agence de Protection de l'Environnement.

**ERN** : Espèces Réactives Dérivée de l'Azote .

**ERO** : Espèces Réactives Oxydantes.

**HE** : Hématoxyline Eosine .

**IHC** : Immunohistochie.

**LDL** : Lipoprotéine de Faible Densité .

**Mcl-1** : Myeloid Cell Leukemia 1 « leucémie à cellules myéloïdes 1 ».

**MDM2** : Mouse Double Minute 2 « Souris double minute 2 ».

**NCBI** : Centre national d'information sur la biotechnologie.

**NES** : Signal d'Exportation Nucléaire.

**NLS** : Signal de Localisation Nucléaire.

**Noxa** : NADPH Oxidase Activator 1 « NADPH oxydase activateur 1 ».

**NR** : Non Radical.

**P.c.** : Poids Corporel.

**PAP** : Peroxydase Anti Peroxydase.

**PC** : Protéines Carbonylées. .

**PUMA** : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis « Le modulateur de l'apoptose régulé positivement par p53 ».

**RL** : Radical Libre.

**SNC** : Aystème Nerveux Central.

**T** : Témoin.

**TM** : Transmembranaire .

**TNF - $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  « facteur de nécrose tumoral ».

**UCSC** : Université de Californie Santa Cruz.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>I</b>	Liste des principales substances à activité vitaminique.	<b>14</b>

## LISTES DES FIGURES

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>FIGURE 1</b>	Structure chimique des 2 isomères de l'ivermectine B1a et B1b .	<b>5</b>
<b>FIGURE2</b>	Participation des ERO dans la mise en place des caractéristiques de cancer	<b>8</b>
<b>FIGURE3</b>	Régulation moléculaire du cycle cellulaire	<b>9</b>
<b>FIGURE4</b>	Structure de gène p53 et représentation schématique de la protéine p53 et du monomère de la protéine p53	<b>10</b>
<b>FIGURE 5</b>	Implication de la protéine p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire	<b>11</b>
<b>FIGURE6</b>	Structure des membres des familles Bcl2	<b>13</b>
<b>FIGURE 7</b>	différents états de l'acide ascorbique	<b>15</b>
<b>FIGURES8</b>	Structure chimique de vitamine E	<b>16</b>
<b>FIGURE 9</b>	Effet de synergie amplificateur antioxydant	<b>17</b>
<b>FIGURE10</b>	Régénération d' $\alpha$ -tocophérol par l'acide ascorbique	<b>17</b>
<b>FIGURE 11</b>	Schéma du tube digestif de lapin âgé de 12 semaines	<b>18</b>
<b>FIGURE 12</b>	Organisation de la paroi digestive	<b>19</b>
<b>FIGURE 13</b>	Organisation anatomique de l'intestin grêle	<b>21</b>
<b>FIGURE 14</b>	Vue de détail d'une villosité illustrant les différents types de cellules	<b>22</b>
<b>FIGURE 15</b>	Représentation des liens entre les " génome browsers " et les fournisseurs de données	<b>25</b>
<b>FIGURE 16</b>	Lapin male <i>oryctolagus cuniculus</i>	<b>28</b>

## LISTE DES PLANCHES

PLANCHE	TITRE	PAGE
PLANCHE 1	Histologie du parenchyme duodénale du lapin témoin , coloration H&E .A : Gr X 10 , B : GR X 40.	38
PLANCHE2	Histologie du parenchyme duodénale du lapin supplémenté par les vitamines C et E . A : GRx10, B : GRx40.	39
PLANCHE 3	Histologie du parenchyme duodénale du lapin traite par l'ivermectine . A : GRx10 , B : GRx40.	40
PLANCHE 4	Histologie du parenchyme duodénale du lapin traité par l'ivermectine et supplémenté par les vitamines C et E . A : GRx10 B : GRx40.	41
PLANCHE 5	IHC P53 duodénum des lapins témoins . A : GRx10 , B : GRx40.	44
PLANCHE 6	IHC p53 duodénum des lapins supplémenté par les vitamines C et E . A : GRx10, B : GRx40.	45
PLANCHE 7	IHC p53 duodénum des lapins traite par l'ivermectine . A : GRx10 , B : GRx40.	46
PLANCHE8	IHC p53 duodénum des lapins traite par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E .A : GRx10 , B : GRx40.	47
PLANCHE 9	IHC BCL2 duodénum des lapins témoins . A : GRx10, B : GRx40.	49
PLANCHE 10	IHC Bcl2 duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E . . A : GRx10 B : GRx40.	50
PLANCHE 11	IHC BCL2 duodénum des lapins traite par l'ivermectine . A : GRx10 , B : GRx40.	51
PLANCHE 12	IHC BCL2 des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E .A : GRx10 , B : GRx40.	52
PLANCHE 13	Liaisons de la p53 à l'ADN.	53
PLANCHE 14	Nombre de mutation de gène p53 et les différentes domaines de gène p53.	53
PLANCHE 15	Site liaison de au ZINC.	54
PLANCHE 16	différents types des mutations sur le gène p53.	54
PLANCHE 17	Alignement des séquences de références p53 et l'isoforme x 1.	55
PLANCHE18	Graphe d'alignement de la séquence de référence p53 et l'isoforme x 1.	55
PLANCHE19	Alignements de la séquence p53 de référence et l'isoforme x 2.	56
PLANCHE 20	Graphe d'alignements de la séquence p53 de référence et l'isoforme x 2.	56
PLANCHE 21	Alignement de la séquence p53 ( humain, lapin , souris ) .	57
PLANCHE 22	Arbre phylogénétique de la p53 ( humain , lapin , souris).	57

# SOMMAIRES

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Rappels bibliographiques</b>	
<b>1.Pesticides .....</b>	<b>4</b>
1.1. Définition.....	4
1.2. Classification.....	4
1.2.1. Selon les organismes vivants ciblés.....	4
1.2.2. Selon la nature chimique.....	4
1.3. Insecticides.....	5
1.4. Avermectine .....	5
1.4.1. Mode d'action.....	6
1.4.2. Toxicité des avermectine.....	6
<b>2. Stress oxydant.....</b>	<b>7</b>
2.1 Espèces réactives oxydantes (ERO).....	7
2.2. Cibles du stress oxydatif.....	8
<b>3. Prolifération cellulaire / Apoptose P53 et Bcl2.....</b>	<b>9</b>
3.1. Marqueur de prolifération la protéine P53.....	9
3.1.1. Structure de la protéine P53.....	10
3.1.2. Fonction de p53.....	11
3.1.3 P53 : Régulation du cycle cellulaire et réparation de l'ADN .....	11
3.1.4. P53 et apoptose .....	12
3.1.5. P53 et MDM2.....	12
3.2. Apoptose et Bcl2.....	12
3.2.1. Structure des protéines de la famille Bcl2.....	13
<b>4. Vitamines C et E .....</b>	<b>14</b>
4.1. Définition.....	14
4.2. Vitamines C ou acide ascorbique.....	15
4.2.1. Structure biochimique.....	15
4.2.2. Besoins.....	15
4.2.3. Action antioxydant.....	15
4.2.4. Toxicité de la vitamine.....	16
4.3. Vitamine E ou $\alpha$ -tocopherol.....	16
4.3.1. Structure chimique.....	16

4.3.2. Besoins.....	16
4.3.3. Rôle antioxydant.....	17
4.4. Synergie entre la vitamine E et C.....	17
<b>5. Tube digestif et intestin grêle.....</b>	<b>18</b>
5.1. Appareil digestif du lapin.....	18
5.2. Organisation anatomique de l'intestin grêle .....	19
5.3. Structure histologique de l'intestin grêle.....	19
5.3.1. Muqueuse intestinale.....	19
5.3.2. Sous muqueuse.....	20
5.3.3. Musculeuse.....	20
5.3.4. Séreuse.....	20
5.4. Épithélium intestinale.....	20
5.4.1. Prolifération et différenciation de l'épithélium intestinale.....	21
5.4.2. Types cellulaires de l'épithélium intestinal .....	21
5.5. Glandes de Brunner.....	23
5.5.1. Hyperplasie des glandes de Brunner .....	23
<b>6. Étude bioinformatique.....</b>	<b>24</b>
6.1. Les bases de données.....	24
6.1.1. Banques de données utiles dans le domaine de la génétique.....	24
6.2. utilisation de la bioinformatique :.....	25

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

<b>1. Matériel.....</b>	<b>28</b>
1.1. Matériel biologique.....	28
1.2. Matériel non biologique.....	28
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>28</b>
2.1. Taxonomie du lapin.....	28
2.2. Répartition des lots.....	28
2.3. Étude histologique.....	29
2.3.1. Fixation des échantillons. ....	29
2.3.2. Circulation.....	29
2.3.3. Enrobage (inclusion).....	30
2.3.4. Réalisation des coupes.....	30
2.3.5. Coloration histologique HE.....	30
2.4. Étude immunohistochimique (IHC).....	31

2.4.1. Principe.....	31
2.4.2. Mode opératoire.....	31
2.5. Etude bioinformatique de la P53.....	33
2.5.1. NCBI.....	33
2.5.2.COSMIC.....	34

## **Chapitre III : Résultat et discussion**

<b>1. Résultat.....</b>	<b>37</b>
1.1. Résultat de l'étude histologique du parenchyme duodéal.....	37
1.2. Résultat de l'étude immunohistochimique ( IHC).....	42
1. 2.1. IHC P53.....	42
1.2.2. IHC bcl-2.....	48
1.3. Résultat de l'étude bioinformatique.....	53
1.3.1. Structure et mutations de la P53.....	53
1.3.2. Alignement des séquences.....	54
<b>2. Discussion .....</b>	<b>58</b>

<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>63</b>
--	-----------

<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>64</b>
---	-----------

## **Annexe**

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Les pesticides constituent un groupe très hétérogène de substances chimiques adaptées à la lutte contre les plantes et les animaux indésirables (**Cherin et al., 2012**). Au cours de la dernière décennie, les pratiques agricoles en Algérie ont connu une croissance significative en termes de production, de rendement et d'emploi des pesticides. Cependant, l'utilisation intensive de ces xénobiotiques a des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement et peut même déclencher des processus génotoxiques et mutagènes de différentes manières (**Benedetti et al., 2017**).

Les pesticides regroupent un grand nombre de spécialités de toxicité variable pour l'homme (**Cherin et al., 2012**). Les lactons macrocycliques (ML) comprennent deux familles chimiques: les avermectines et les milbémécines. L'ivermectine est le produit de fermentation de la bactérie du sol *Streptomyces avermitilis* (**Khaldoun Oularbi et al., 2013**).

Les avermectines ont été largement utilisés pour lutter contre les parasites et les ravageurs de l'homme, des animaux et des cultures, et occupent une place importante sur le marché des pesticides en raison de leur large spectre d'action et leur grande efficacité (**Li et al., 2016**). L'abamectine (ABM) a été largement utilisé partout dans le monde et est l'un des insecticides les plus utilisés en Algérie (**Khaldoun Oularbi et al., 2013**).

L'exposition aux pesticides provoque des altérations sévères biochimiques et histologiques des organes cibles (**Khaldoun et al., 2014**). L'intestin grêle des mammifères, site de digestion et d'absorption des nutriments et de l'eau, permet le passage des xénobiotiques nocifs dans l'organisme (**Kaminsky, 2003**). Des études récentes ont montré que l'intoxication par les pesticides engendre un stress oxydatif par la génération des radicaux libres (**Saxena et Garg, 2010**). Parallèlement, l'utilisation des antioxydants, réducteurs ou capteurs de radicaux libres, en tant que stratégie a été récemment portée à la prévention des dommages oxydatifs causés par les insecticides (**Magdy et al., 2016**).

Nous nous sommes intéressés dans la présente étude aux vitamines C et E qui sont utilisés comme suppléments nutritionnels et éléments essentiels dans presque tous les systèmes biologiques (**Guilland., 2011**).

Un stress génotoxique modéré provoque l'arrêt transitoire du cycle cellulaire par la protéine p53, ce qui limite les lésions et permet leur réparation. Si le stress est plus intense ou prolongé, p53 inhibe la prolifération par un mécanisme généralement irréversible (sénescence) ou déclenche

l'apoptose impliquant la protéine Bcl2 (**Albagli, 2015**). P53 est un facteur de transcription qui agit comme un gardien du génome en réponse à divers stress cellulaires (**Toledo et al., 2007**).

De plus, suite à un stress cellulaire, la protéine p53 induit la transcription des gènes cible codant pour les protéines pro-apoptotiques Bax, PUMA, Noxa, Bak et Bid et réprime la transcription de gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl- 1 (**Homologs, 2009**).

Lors de sa création, la bioinformatique correspondait à l'utilisation de l'informatique pour stocker et analyser les données de la biologie moléculaire. Cette définition originale a maintenant été étendue et le terme bioinformatique est souvent associé à l'utilisation de l'informatique pour résoudre les problèmes scientifiques posés par la biologie dans son ensemble. Il s'agit dans tous les cas d'un champ de recherche multidisciplinaire qui associe informaticiens, mathématiciens, physiciens et biologistes.

Dans ce contexte, le présent travail consiste d'une part à démontrer les effets toxiques d'une formulation d'insecticide avermectine sur l'intestin grêle des lapins et l'effet protecteur des vitamines C et E, et d'autre part compléter notre étude par une recherche bioinformatique de la structure et l'expression du gène et de la protéine P53.

Ce document est devisé en trois chapitres essentiels :

Le premier chapitre présent une synthèse bibliographique qui commence par des généralités sur les pesticides, le stress oxydative et la prolifération cellulaire, ainsi que les fonctions du gène suppresseur de tumeur P53 et le gène anti apoptotique Bcl-2, et des généralités sur les vitamines C et E et se termine par des généralités sur l'organisation morphologique et histologique de l'intestin grêle. Le deuxième chapitre ou la partie expérimentale comporte une description du matériel utilisé et le protocole suivie durant l'expérience. Le dernier chapitre est consacré à la discussion des résultats obtenus suivi d'une conclusion et des perspectives.

**CHAPITRE I**  
**RAPPELS**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## 1. PESTICIDES

### 1.1. Définition

Le terme pesticide se compose de deux parties: le suffixe "cide" qui a pour origine le verbe latin "caedo, cadere" qui signifie " tuer". On lui a adjoint la racine anglaise "Pest" qui signifie animal ou plante ou insecte nuisible à la culture provenant du latin pestis (peste) qui désignait le fléau en général (**López et al., 2005**).

Les pesticides sont des composés chimiques dotés de propriétés toxicologiques couvrant une large gamme de produits utilisés dans le contrôle des ravageurs et comprend insecticides : herbicides, fongicides rodenticides , produits biologiques , régulateurs de croissance des plantes ou des insectes , nématicides et les biocides non spécifiques (**Aktar et al., 2009**).

### 1.2. Classification des pesticides

D'une manière générale, les substances actives peuvent être classées soit en fonction de la nature de l'espèce à lutter (1<sup>er</sup> système de classification) soit en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui le compose (2<sup>ème</sup> système de classification).

#### 1.2.1. Selon les organismes vivants ciblés on distingue

- **Insecticides** : Les insecticides sont des substances qui tuent les insectes, empêchent l'éclosion des œufs, altèrent le développement normal des larves ou la maturation sexuelle (**Faurie et al., 2003**). C'est le plus important groupe de pesticides qui englobe plusieurs familles : les insecticides organophosphorés, organochlorés, néonicotinoïdes de synthèse, avermectines et autres produits (**Belmonte et al., 2005**).
- **Fongicides** : servent à combattre la prolifération des champignons pathogènes. Ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés (**Cairns et Shermaj., 1996**).
- **Herbicides** : Ils permettent d'éliminer les mauvaises herbes. Ce sont des phénoxydes, des triazines, des amides, des dinitro-anilines dérivés d'urée, des sulfonylurées et uraciles (**Benziane, 2014**).

#### 1.2.2. Selon la nature chimique

Selon (**Calvet et al., 2005**), il existe trois catégories de pesticides:

- **Pesticides inorganiques**, qui sont peu nombreux, sont des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu bien avant les débuts de la chimie organique de synthèse.
- **Pesticides organométalliques**, ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal et d'un anion organique exemple : dithiocarbamate.

- **Pesticides organiques**, qui sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques dont il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques.

### 1.3. Insecticides

Les insecticides sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Différents types existent : les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration (**Calvet et al., 2005**). Dans la présente étude un intérêt particulier est porté à un insecticide de la famille des avermectines, décrit ci-après.

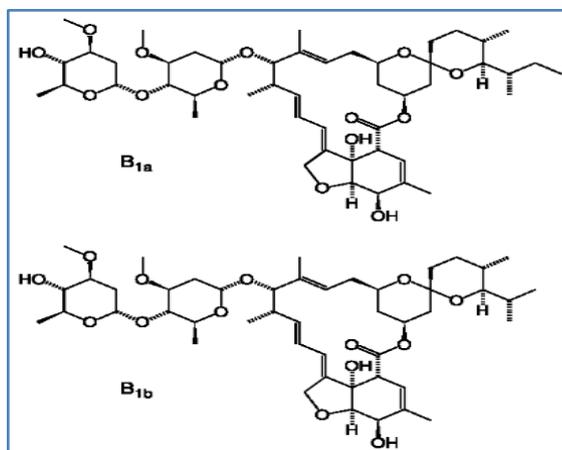
### 1.4. Avermectines

Les avermectines sont des composés organiques macrocycliques dotés de puissantes propriétés anthelminthiques et insecticides ; Les avermectines sont issues de la culture de *Streptomyces avermitilis*.

Huit composés naturels ont été isolés: *A1a*, *A1b*, *A2a*, *A2b*, *B1a*, *B1b*, *B2a* et *B2b*. Les composés *a* possèdent un substituant butyle en position 25 alors qu'il s'agit d'un isopropyle dans le cas des composés *b*. Les homologues *a* et *b* ont une activité presque identique. Leur séparation au cours de la fermentation à grande échelle est difficile et sans intérêt, de sorte que, dans la littérature, on considère quelques fois que quatre types d'ivermectines : *A1*, *A2*, *B1* et *B2* (**Pitterna et al., 2009**).

Parmi les molécules avermectines issues de la fermentation *S. avermitilis* on cite :

- L'ivermectine (22,23-dihydro-ivermectine B1) a été la première avermectine commercialisée.
- L'abamectine (ivermectine B1) c'est un mélange d'ivermectine *B1a* et *B1b*
- La doramectine (25-cyclohexyl-ivermectine B1) : est très lipophile et sa demi-vie tissulaire est beaucoup plus longue.
- L'éprinomectine [4'-(épiacétylamino)-4'-désoxy-ivermectine B1] (**Siddique et al., 2014**).



**Figure 1:** Structure chimique des deux isomères de l'ivermectine le B1a et B1b (**Deng., 2019**).

#### 1.4.1. Mode d'action

Les avermectines agissent en interférant avec la fonction des synapses neuromusculaires. Les effets antiparasitaires connus des avermectines sont :

- la paralysie des muscles pharyngiens.
- la paralysie des muscles somatiques.

En présence d'ivermectines, l'acide 4-aminobutanoïque est libéré, se lie aux membranes musculaires, et comme résultat, les canaux de chlorure demeurent ouverts. Cette charge négative est maintenue au motoneurone, et la membrane devient hyperpolarisée, bloquant les signaux pour une réaction excitatrice ou Inhibitrice (**Dourmishev et al., 2005**).

#### 1.4.2. Toxicité des avermectines

Divers impacts létaux et sublétaux ont été observés sur des organismes non visés exposés aux avermectines. Le risque principal est celui de la neurotoxicité, qui chez la plupart des espèces de mammifères peut se manifester par une dépression du système nerveux central (SNC), avec pour conséquence une ataxie.

En général on utilise les pesticides sous forme de spécialités contenant plusieurs substances, ces préparations sont classées par l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA) comme toxiques de **catégorie IV**, c'est-à-dire **très faiblement toxiques**. Ceci signifie que bien que fortement toxiques pour les insectes, Les préparations de pesticides contenant de l'ivermectine ne devraient généralement pas avoir d'effet nuisible pour les mammifères en mode normal d'utilisation.

Par exemple, on peut déterminer pour une telle préparation une DL50 par voie orale de 650 mg/kg chez le rat (toxicité classée en catégorie III : basse toxicité) ; Extrapolé à l'homme pour un poids de 80 kilogrammes, la DL50 est de 52 g correspondant à une faible toxicité (**Rajasekharan et al., 2019**).

## 2. STRESS OXYDANT

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants / antioxydants » en faveur des oxydants (**Almasiova et al., 2012**), ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires.

- Lipides avec perturbations des membranes cellulaires,
- Protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes,
- Acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation.

Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants (**Djellouli, 2013**).

### 1.2. Espèces réactives oxydantes (ERO)

L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose (contre 2 seulement dans un processus anaérobie). Mais tous les organismes aérobies paient le prix de ces avantages métaboliques. En effet, les cellules convertissent 3 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (**notées ERO**) (**Camille et Mireille, 2011**).

Un radical libre (**RL**) est une entité chimique (atome, molécule ou fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron célibataire ou non apparié sur sa couche électronique externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (**Lobo et al., 2010**). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes).

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

1. Addition d'un électron libre à un non radical ( $\text{NR} + e^- \rightarrow \text{R}^\cdot$ ).
2. Perte d'un électron par un non radical ( $\text{NR} - e^- \rightarrow \text{R}^\cdot$ ).
3. Scission homolytique d'une liaison covalente ( $\text{A:B} \rightarrow \text{A}^\cdot + \text{B}^\cdot$ ) (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

Les xénobiotiques, les **pesticides**, les **Insecticides** sont seulement quelques exemples de toxines qui peuvent pénétrer au corps humain et induire la formation de radicaux libres (**El-Demerdash et al., 2013**).

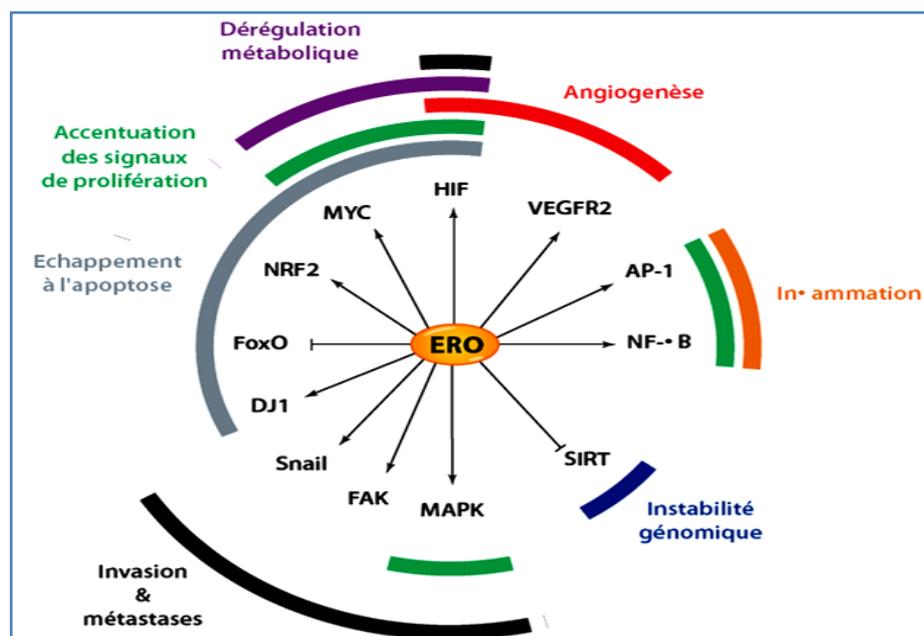
### 1.3. Cibles du stress oxydatif

Les ERO réagissent avec les premières molécules qu'elles rencontrent. Elles ont comme cible les lipides, les protéines, les glucides et les acides nucléiques (**Gamet et Payraastre, 2011**).

✚ **Les lipides** : Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé.

✚ **Les protéines** : à cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO. Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (formation de protéines carbonylées « PC »), Ces modifications conduisent généralement à **une perte de fonction catalytique ou structurale des protéines affectées** (**Fetoui et al., 2010**).

✚ **Les acides nucléiques** : Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Les bases qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. Ces attaques sont essentiellement causées par le HO•. Des modifications de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) ou encore la thymine en thymine glycol (**Grandjean, 2005**) entraîne un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN. Ainsi nous constatons que ces dommages peuvent participer à une mutagenèse, à **un arrêt des divisions cellulaires** par blocage des mécanismes de réplication, à un arrêt de la synthèse protéique par blocage des mécanismes de transcription / traduction, et enfin à une **mort cellulaire**. De ce fait, les ERO participent à la mise en place des caractéristiques du cancer (**Figure 2**).



**Figure 2** : Participation des ERO dans la mise en place des caractéristiques du cancer (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

### 3. PROLIFERATION CELLULAIRE / Apoptose P53 et Bcl2

L'entrée dans le cycle de division représente l'exécution du programme de prolifération cellulaire, en réponse aux messages apportés par des facteurs de croissance. La transduction de ces messages aboutit à la transcription de gènes nécessaires à l'initiation du cycle cellulaire. (Robertt, 2011).

Un cycle de division cellulaire, est constitué de 4 phases : G1, S, G2, et la mitose M. Les phases S et M sont séparées l'une de l'autre par deux périodes intermédiaires (phases G1 et G2) permettent la vérification de l'intégrité du matériel génétique et de la réparation d'erreurs éventuelles risquant d'être ensuite transmises aux cellules filles. Le passage d'une phase à la suivante passe par des **points de contrôle** à hauteur desquels le cycle s'interrompt en présence d'un ADN endommagé (Lüllmann, 2008).

Le contrôle du cycle cellulaire est d'une importance capitale dans l'oncogenèse, qui s'accompagne d'une perturbation de la régulation normale du cycle (Robert, 2011). Les machines centrales qui contrôlent la progression du cycle cellulaire sont les **kinases dépendantes des cyclines (CDK)**. Les Cdk sont activées par la phosphorylation d'une thréonine (160 pour Cdk2 et 172 pour Cdk4) par les kinases CAK (Pommier et Kohn, 2003).

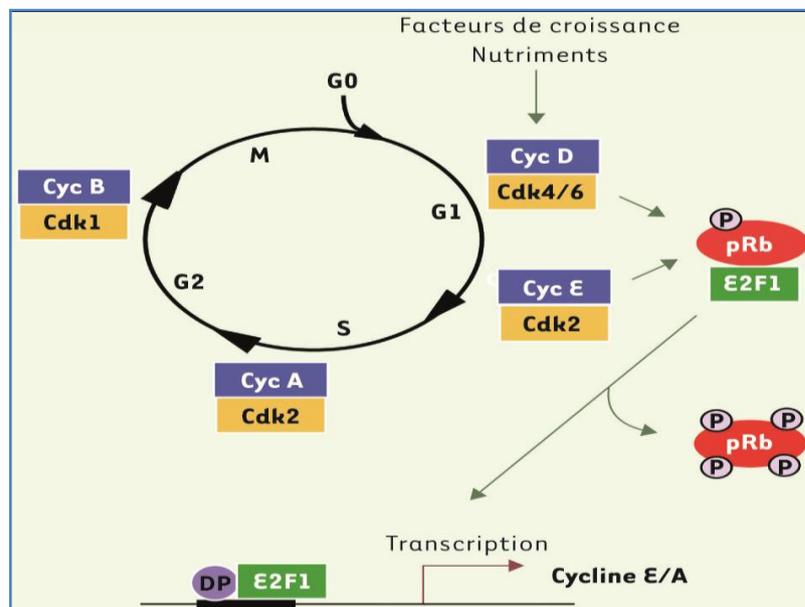


Figure 3: Régulation moléculaire du cycle cellulaire (Lagarrigue et al., 2011).

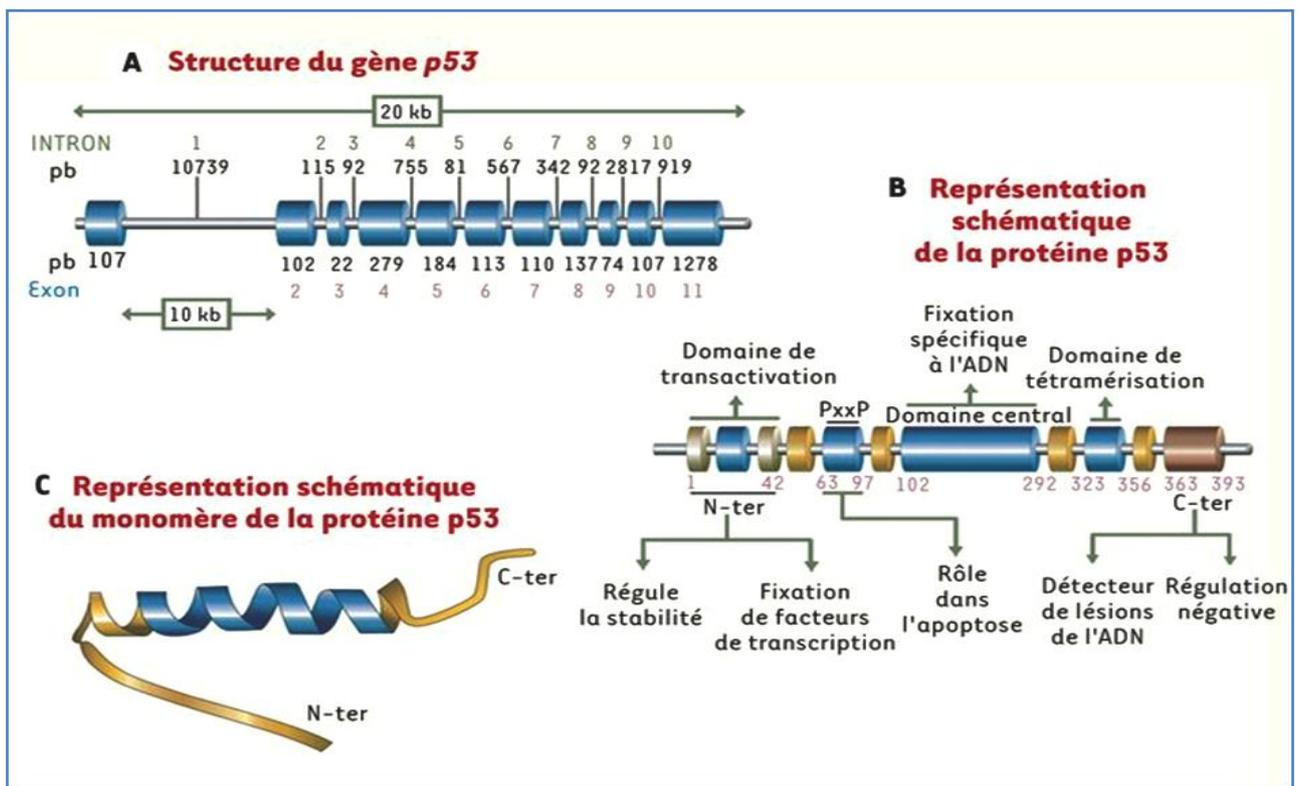
#### 3.1. Marqueur de prolifération la protéine P53

La protéine p53 est le produit d'un gène suppresseur de tumeur qui est la cible la plus commune pour la modification génétique dans le cancer humain. Le type **p53 non mute** est souvent trouvé dans les cellules dans un état latent, elle est active par réponse a des signaux intracellulaire et extracellulaire, l'activation implique l'augmentation des niveaux de protéine p53 totaux aussi bien des changements qualitative dans la protéine (Oren et Rotter, 1999).

### 3.1.1 Structure de la protéine P53

Le gène codant la protéine p53 humaine est localisé sur le bras court du chromosome 17, plus précisément sur la bande chromosomique 17p13.1 (Soussi, 2000). Il est composé de 11 exons et s'étend sur une longueur de 20 kb (Figure 4).

Il dispose d'une séquence intronique de 10 kb située entre la première et la deuxième séquence exonique. Cinq régions hautement conservées au cours de l'évolution sont localisées entre le second et le huitième exon. Il est généralement admis que le domaine central de la protéine p53 est codé par les exons 5, 6, 7, 8. (Dridi et al., 2006).



**Figure 4:** Structure du gène p53 et représentation schématique de la protéine P53 et du monomère de la protéine P53 (Dridi et al., 2006).

La protéine p53 est une phosphoprotéine de **393 acides aminés**. Les principaux domaines de la protéine p53 sont :

- ✚ **Domaine amino-terminal** (résidus 1-42) nécessaire à l'interaction avec les composantes de l'appareil transcriptionnel.
- ✚ **Région riche en résidus proline** (63-97) intervenant au cours de l'apoptose.
- ✚ **Domaine central hydrophobe** (102-292) dont la structure tridimensionnelle permet la fixation spécifique à l'ADN au sein duquel convergent la majorité des mutations inactivatrices en cause dans divers cancers humains.
- ✚ **Domaine de tétramérisation** (323-356).
- ✚ **Domaine carboxyterminal** (363-393) intervenant dans la régulation négative de p53 (Dridi et al., 2006).

La protéine **p53** peut être localisée dans le cytosol, le noyau ou les mitochondries. Le trafic nucléo-cytoplasmique de p53 est assuré par ses séquences **NLS** (signal de localisation nucléaire) et **NES** (signal d'exportation nucléaire) (Dridi *et al.*, 2006).

### 3.1.2. Fonction de p53

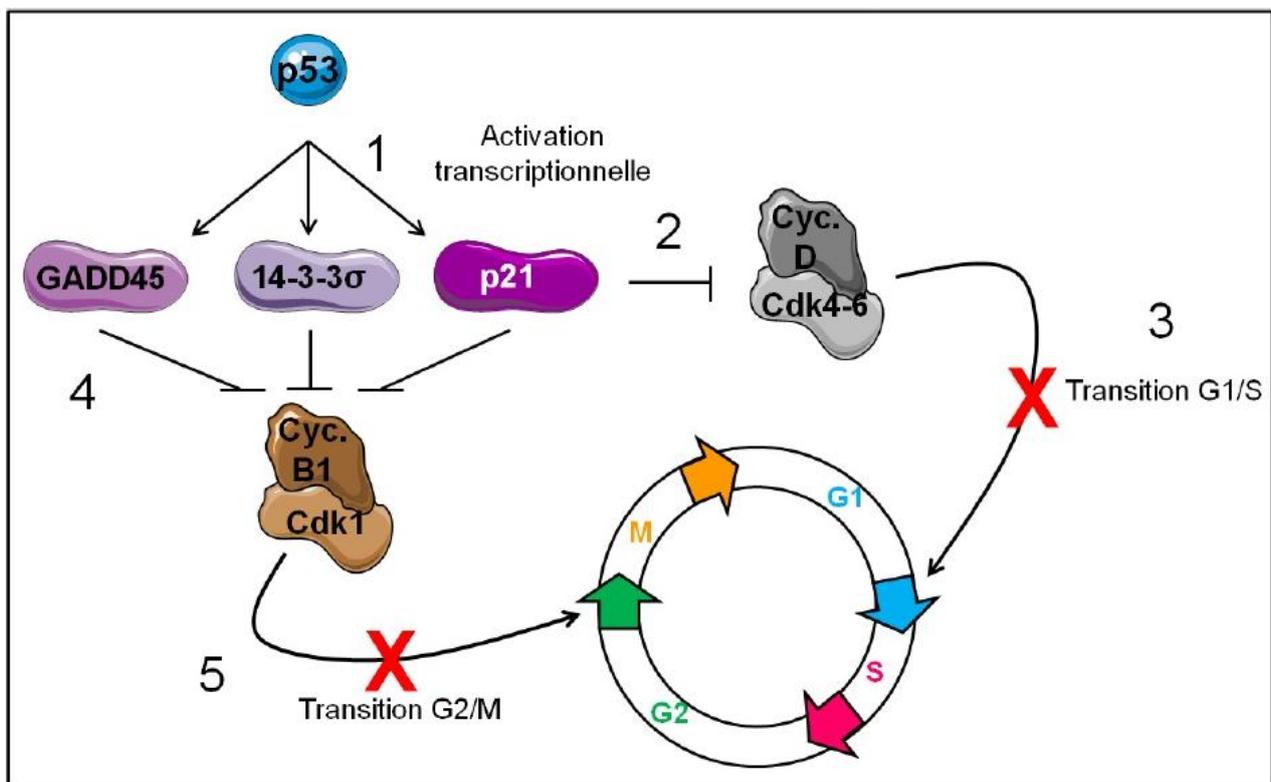
Le facteur de transcription P53 a été décrit pour la première fois en 1979. Depuis, cette protéine a fait l'objet de nombreuses études à cause de son implication dans divers processus biologiques tels que:

- ✚ Blocages des cellules dans le cycle cellulaire,
- ✚ Réparations des lésions de l'ADN.
- ✚ Mise en place de l'apoptose.
- ✚ Différenciation cellulaire.

La protéine p53 est activée par phosphorylation, déphosphorylation et acétylation, et elle devient un puissant facteur de transcription spécifique d'une séquence de l'ADN (Leblanc et May., 2002).

### 3.1.3.P53 : Régulation du cycle cellulaire et réparation de l'ADN

Les deux points de contrôle du cycle cellulaire sont essentiels au maintien de la stabilité génomique. Le gène suppresseur de tumeur p53 assure le bon déroulement du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité du génome.



**Figure 5 :** Implication de la protéine p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire (FPD, 2014).

En effet, suite à des dommages à l'ADN la phosphoprotéine p53 déclenche l'arrêt du cycle cellulaire. Ce contrôle négatif peut se faire par l'activation de la protéine p21 (**Figure 5**), qui inhibe l'activité des complexes cyclines A/CDK2 et cycline E/CDK2 au cours des phases G1-S et celle de la complexe cycline B1/CDK 2 au cours de la phase G2 (**Barboza et al., 2006**).

L'arrêt du cycle cellulaire induit par le TP53 est nécessaire pour permettre aux processus appropriés de réparation de l'ADN de se produire (**Barboza et al., 2006**).

#### **3.1.4.P53 et apoptose**

Il a été montré que la protéine p53 peut être localisée au niveau de la mitochondrie. Là, elle peut interagir, indépendamment de ses activités transcriptionnelles, avec des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bak, dont elle favorise l'oligomérisation et donc l'activation ou Bad, participant ainsi à l'apoptose (**Leu et al., 2004**).

P53 participe également à l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille **Bcl-2** : il a été montré que l'interaction entre p53 et les protéines Bcl-2 et Bcl-XL favorise la perméabilisation des membranes mitochondriales et la libération dans le cytosol de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c (**Bilim et al., 2008**).

P53 régule également la transcription de gènes codant pour des récepteurs à domaines de mort. Ces récepteurs membranaires, une fois activés par leurs ligands, induisent la voie extrinsèque de l'apoptose (**Takimoto et El-Deiry, 2000**). **La protéine p53 est donc un régulateur majeur de l'apoptose, de façon dépendante ou non de ses activités transcriptionnelles.**

#### **3.1.5.P53 et MDM2**

La régulation par Mdm2 est un mécanisme clé dans le contrôle du taux intracellulaire de P53. Mdm2 se fixe sur la protéine P53 au niveau des résidus 17 à 22, situés dans le domaine de trans-activation en N-terminal. Mdm2 inhibe ainsi la transcription induite par P53 et induit l'exportation de P53 du noyau vers le cytoplasme. De plus, mdm2 agit comme une E3-ubiquitine ligase sur P53 qui devient alors une cible de dégradation par le protéasome 26S (**Moll et Petrenko, 2003**).

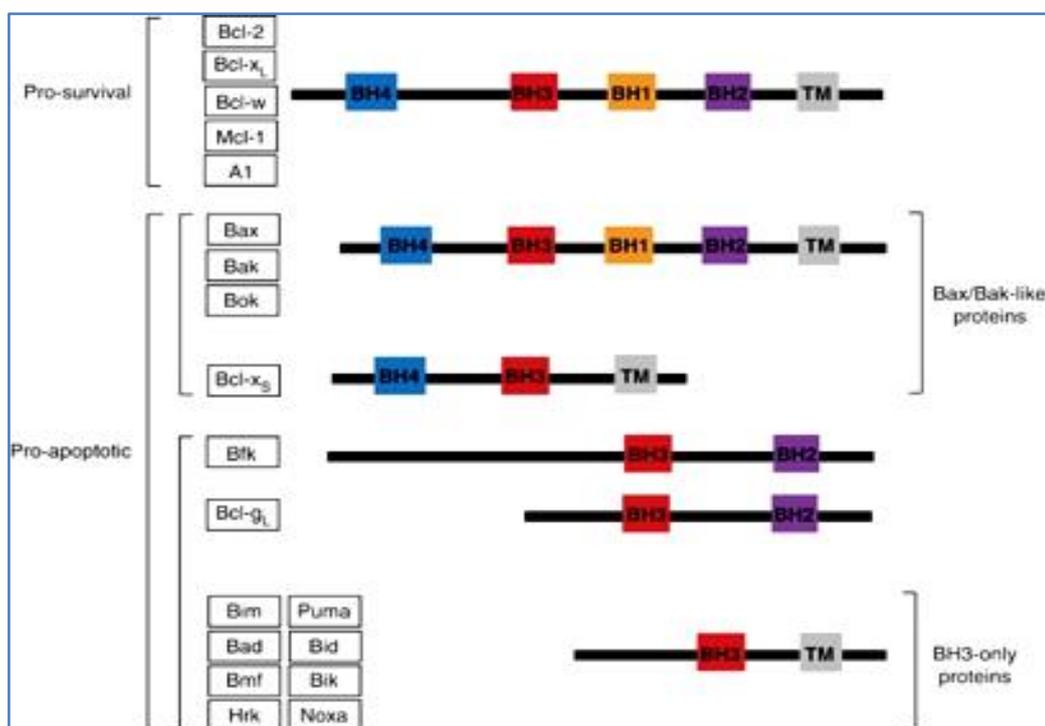
#### **3.2.Apoptose et Bcl2**

La protéine Bcl-2 a été identifiée en 1984. Quelques années plus tard, sa fonction anti-apoptotiques a été mise en évidence. Actuellement, une vingtaine de membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés. Les membres de la famille Bcl2 possèdent des activités pro- ou anti-apoptotiques : la balance entre les différents membres de cette famille protéique régule l'apoptose. (**Reed, 2008**).

### 3.2.1. Structure des protéines de la famille Bcl2

Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent entre 1 et 4 domaines BH (Bcl-2 Homology) et sont répartis en 3 sous-familles.

- Les protéines anti-apoptotiques « **Bcl-2 like** » : elles possèdent entre 2 et 4 domaines BH et peuvent présenter un domaine TM (Transmembranaire) permettant l'insertion dans les membranes cellulaires.
- Les protéines pro-apoptotiques « **Bax like** » : elles possèdent entre 2 et 3 domaines BH, ainsi qu'un domaine TM.
- Les protéines pro-apoptotiques « **BH3-only** » : elles possèdent seulement le domaine BH3 et peuvent présenter un domaine TM (Karnak et Xu, 2010).



**Figure 6** : Structure des membres de la famille Bcl-2 (Kelly et Strasser, 2011).

La plupart des membres de la famille Bcl-2 peuvent interagir entre eux via leurs domaines BH, ce qui participe à la régulation de leurs activités. Un grand nombre de protéines appartenant à la famille Bcl-2 sont régulées transcriptionnellement par la protéine p53.

Suite à un stress cellulaire, la protéine p53 induit la transcription des gènes cible codant pour les protéines pro-apoptotiques Bax, PUMA, Noxa, Bak et Bid et réprime la transcription de gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 (Homologs, 2009).

### 3.3 anoïkis et voies de signalisation

l'anoïkis qui ne concerne que les cellules adhérentes, car c'est une apoptose induite par le détachement cellulaire de la matrice extracellulaire. (Cabon et al., 2013), Les intégrines régulent la viabilité cellulaire par leur interaction avec l'ECM, détection des forces mécaniques résultant de

contacts et les convertissant en signaux intracellulaires. (**Taddei et al., 2011**). Le détachement de cellules épithéliales de la matrice extracellulaire sous-jacente déclenche leur élimination par une forme d'apoptose appelée anoikis (**Mailleux, 2008**). Elle implique une perte de l'attachement des intégrines  $\beta 1$ , la diminution de l'expression de l'EGFR, l'inhibition de la signalisation ERK1 et la surexpression de BIM, un membre de la famille Bcl-2. L'étude moléculaire de l'anoikis présente un intérêt en raison de la propriété des cellules cancéreuses épithéliales invasives et métastatiques à résister à ce type de mort. (**Cabon et al., 2013**).

Les cellules cancéreuses sont généralement résistantes à la mort induite par anoikis. Cette résistance leur conférerait potentiellement la capacité de survivre au voyage en dehors de la tumeur primaire et de former ainsi des métastases. (**Mailleux, 2008**).

## 2. VITAMINES C et E

Les vitamines, E ou  $\alpha$ -tocophérol et C ou acide ascorbique, semblent être des plus importants et puissants antioxydants dans la lutte contre le stress oxydant ( **Jane et al., 2000** ).

### 2.1. Définition des vitamines

Les vitamines sont des substances organiques sans valeurs énergétique propre, nécessaire a l'organisme et que l'animale (ou l'homme) ne peut pas synthétiser. Elles sont donc fournies a l'animale soit par sa flore digestive pour quelques-uns, soit plus généralement par l'alimentation (**Limbach et Guillard, 2007**) On considère communément 13 substances ou groupes de substances comme des vitamines .les principales molécules ayant une activité vitaminique sont listées dans le **tableau I (LEBAS, 2000)**.

**Tableau I** : Liste des principales substances à activité vitaminique.

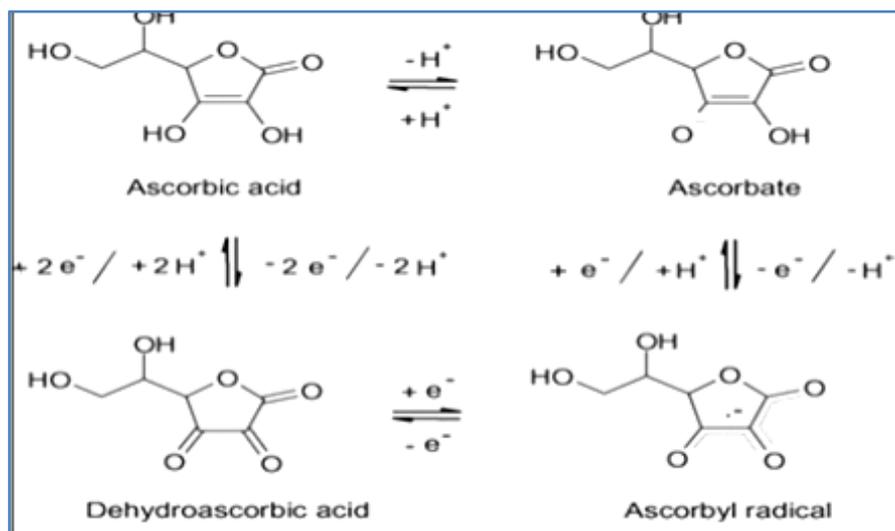
Nom	Nom chimique
<b>Vitamine A</b>	Rétinol - rétinal - rétinyl ester - acide rétinoïque -(bêta-carotène = provitamine A)
<b>Vitamine D</b>	Ergocalciférol (D2) - Cholécalfiérol (D3)
<b>Vitamine E</b>	alpha-Tocophérol - bêta-Tocophérol - gamma-Tocophérol - etc.
<b>Vitamine K</b>	Phylloquinone (K1) - Ménaquinone (K2) - Ménadione (K3)
<b>Vitamine B1</b>	Thiamine
<b>Vitamine B2</b>	Riboflavine
<b>Vitamine B3</b>	Acide nicotinique - Nicotinamide – Niacine
<b>Vitamine B5</b>	Acide Pantothénique
<b>Vitamine B6</b>	Pyridoxine - Pyridoxal – Pyridoxamine
<b>Vitamine B8</b>	Biotine
<b>Vitamine B9</b>	Acide Folique - acide ptéroylglutamique - famille des acides ptéroiques
<b>Vitamine B12</b>	Cyanocobalamine - Aquocobalamine – Hydroxocobalamine
<b>Vitamine C</b>	Acide ascorbique - Acide déhydroascorbique

(**LEBAS, 2000**).

## 2.2. Vitamines C ou acide ascorbique

### 2.2.1. Structure biochimique

La structure de l'acide ascorbique est apparentée à celle de sucre à 6 atomes de carbones, ayant un poids moléculaire 176,13 KA et une formule brute C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>. L'AA (ou 2-oxo-l-threo-hexono-4-lactone -2.3-enediol) comporte une fonction lactone, 2 carbone asymétrique (les carbons 4 et 5) deux fonctions alcool et une fonction enediol (HO -C=C-OH) sur les carbones 2 et 3 (**Chambial et al., 2013**).



**Figure 7:** les différents états de l'acide ascorbique (**Figuroa et Rivas, 2015**).

La vitamine c existe essentiellement sous deux formes : l'acide L-ascorbique forme réduite et l'acide L dehydroascorbique (ADHA) forme oxydée, en équilibre réversible dans les tissus. Le couple agit alors comme un puissant catalyseur de réactions d'oxydoréduction dans l'organisme (**Lykkesfeldt et al., 2014**).

### 2.2.2. Besoins

La vitamine C n'est pas produite par le corps humain, elle nécessite donc un apport exogène dans certaines situations pathologiques (stress, inflammation et infection) les besoins en vitamine C peuvent être accrues (**Czyzowska, 2016**).

### 2.2.3. Action antioxydant

Du fait de sa capacité à donner des électrons, l'ascorbate est un antioxydant puissant. Il piège les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) tels le radical hydroxyle (OH), l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et les espèces réactives dérivées de l'azote (ERN). L'ascorbate protège le plasma et les lipoprotéines de faible densité (LDL) en piégeant les ERO présentes dans la phase aqueuse avant qu'elles initialisent la peroxydation lipidique. Il joue aussi ce rôle antioxydant indirectement en régénérant d'autres antioxydants tels que le glutathion et la vitamine E (**Guilland et al., 2007**).

### 2.2.4. Toxicité de la vitamine C

La toxicité potentielle des doses excessive de supplément en vitamine C se relie aux événements intra-intestinaux et aux effets des métabolites dans le système urinaire les prises de 2 ou 3 g/jour produisent une diarrhée désagréable par les effets osmotique de la vitamine non absorbée en lumière intestinal dans la plupart des personnes. Les perturbations gastro-intestinales peuvent se produire après l'ingestion de moins de 1g parce que approximativement la moitié de cette dose ne serait pas absorbée. (Chepda et al., 1999).

### 2.3. Vitamine E ou $\alpha$ tocophérol

La vitamine E, de formule brute :  $C_{29}H_{50}O_2$ , a une masse molaire de 431 son synonyme est l' $\alpha$  tocophérol (Bourgois, 2003).

#### 2.3.1. Structure chimique

L' $\alpha$  tocophérol est le composé naturel dont l'activité vitaminique est la plus élevée, elle peut être synthétisée chimiquement ou isolée des huiles végétales. On considère aussi les tocotrienols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ...) qui se distinguent des tocophérols correspondants par la présence de doubles liaisons dans la chaîne latérale en 3', 7', et 11'. Ces composés sont moins actifs que les tocophérols correspondants. Ce sont des molécules très oxydables, d'où leur rôle d'antioxydants naturels (Wang et Quinn, 1999).

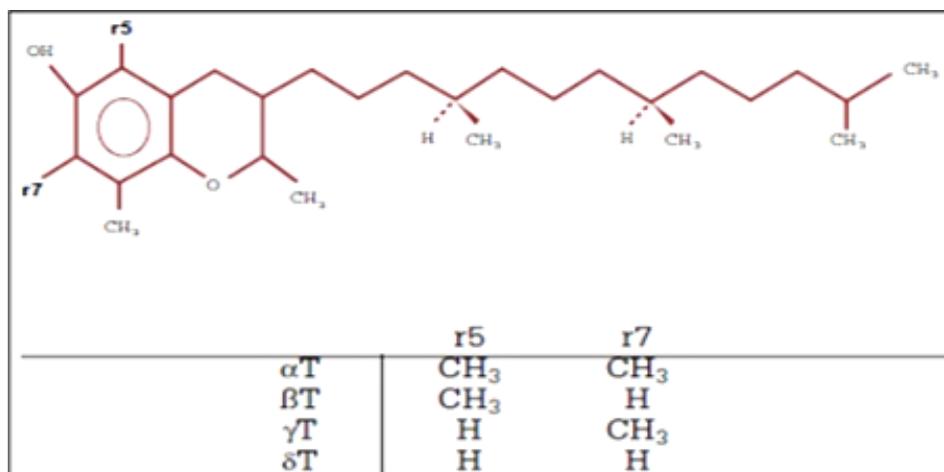


Figure 8 : Structure chimique des vitamines E (Wang et Quinn., 1999).

#### 2.3.2. Besoins

Les apports nutritionnels conseillés (ANS) en vitamine E sont variable en fonction de l'âge et de l'état physiologique. Ainsi les besoins en vitamine E des adultes sont estimés à 12 mg par jour tandis que chez les enfants, ils sont compris entre 4 et 11 mg (Dharancy, 2006).

**2.3.3. Rôle antioxydant**

La vitamine E est un antioxydant majeur des structures lipidiques, sa réactive réside dans sa capacité à capter les radicaux peroxyde formés lors du phénomène de peroxydation lipidique et donc a interrompe la chaine de propagation de ce processus. L'oxydation de l' $\alpha$ -tocophérol conduit a un radical tocophérol relativement stable du fait du noyau chromanol. (Delattre et al., 1999).

La vitamine E peut être secondairement régénérée en présence de la vitamine C ou d'autres réducteurs. Il existe donc un effet de **synergie amplificateur antioxydant** entre la vitamine E et la vitamine C et des systèmes enzymatique. (Guilland, 2011).

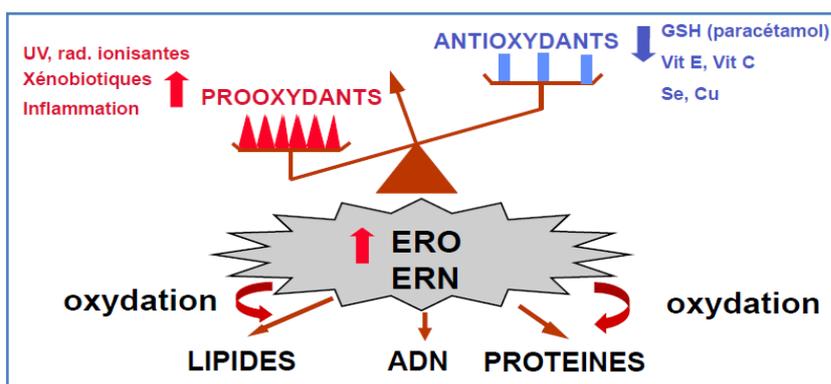


Figure 9 : Effet de synergie amplificateur antioxydant (DERAI, 2016).

**2.4.Synergie entre la vitamine E et C**

Du fait que les antioxydants agissent en synergie et de façon à éviter un éventuel déséquilibre de la balance pro-oxydants/antioxydants, il est souvent souhaitable de les administrer en association. Ainsi l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique améliorent l'utilisation du glucose par les tissus périphériques du diabétique, principalement le muscle squelettique, et ils inhibent de façon synergique l'oxydation des LDL.

De plus, l'acide ascorbique est indispensable à la régénération de l' $\alpha$ -tocophérol, en transférant un électron et un proton sur le radical tocophérol mentionne en régénérant le tocophérol et en s'oxydant mono électronique en acide radical monohydroascorbique (Buettner, 1993).

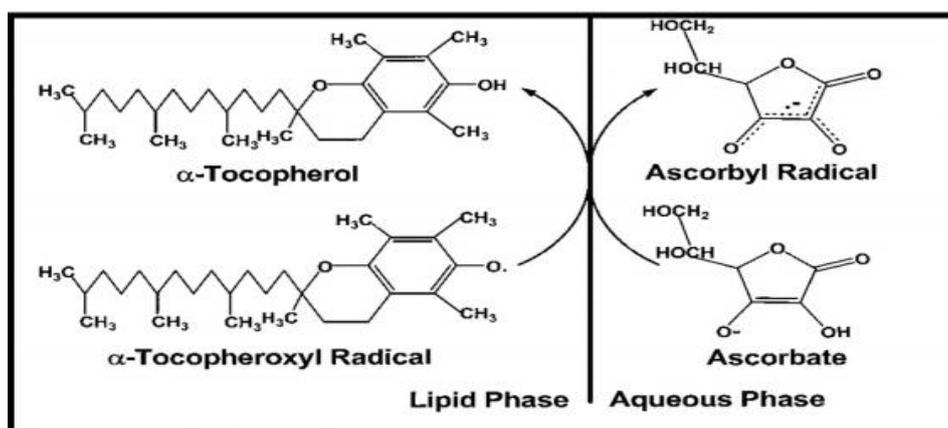


Figure 10 : Régénération d' $\alpha$ -tocophérol par l'acide ascorbique (DERAI, 2016).

### 3. TUBE DIGESTIF ET INTESTIN GRELE

La digestion est un processus biologique complexe qui permet à l'individu de tirer des aliments les nutriments indispensables à sa vie (Ménard et Dupont, 2014).

#### 3.1. Appareil digestif du lapin

L'appareil digestif est composé d'une succession de compartiments : la bouche, l'œsophage, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le cæcum, le côlon (proximal et distal), puis le rectum aboutissant à l'anus. L'intestin grêle représente une faible part du tractus digestif (56% de la longueur et 12% du volume de l'ensemble intestin grêle-cæcum-côlon), alors que le **cæcum est très développé** (Martignon, 2010). Lieu de passage et de séjour obligé pour les aliments ; le **cæcum** héberge une microflore très dense, constituée essentiellement des bactéries cellulolytiques ( Delteil et al.,2012) (Figure 11).

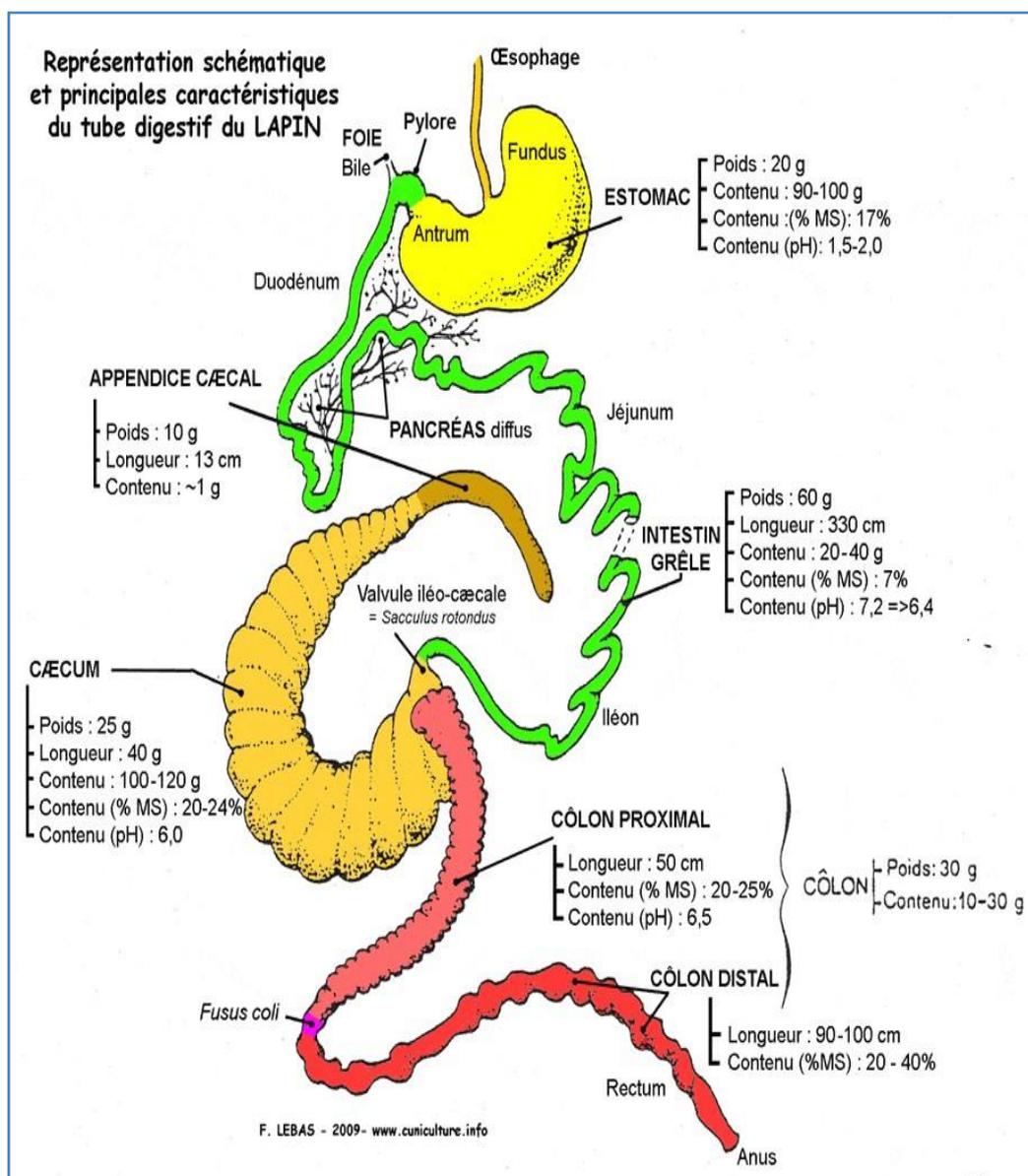


Figure 11: Schéma du tube digestif de lapin âgé de 12 semaines (Gidenne et Lebas, 2005).

### 3.2 Organisation anatomique de l'intestin grêle :

L'intestin grêle commence au niveau du sphincter pylorique de l'estomac, puis serpente dans la partie centrale et inférieure de la cavité abdominale pour s'aboucher dans le gros intestin (**Tortora et Derrickson, 2018**).

L'intestin grêle est composé de trois parties distinctes (**Fromont et Tanguy, 2001**).

- **Duodénum** : c'est l'endroit où se déverse le suc pancréatique et la bile qui va permettre la dégradation des aliments en nutriments
- **Jéjunum et iléon** : ce sont deux lieux d'absorption des nutriments vers le système sanguin.

### 3.2. Structure histologique de l'intestin grêle

Histologiquement, la paroi intestinale est formée de quatre tuniques concentriques :

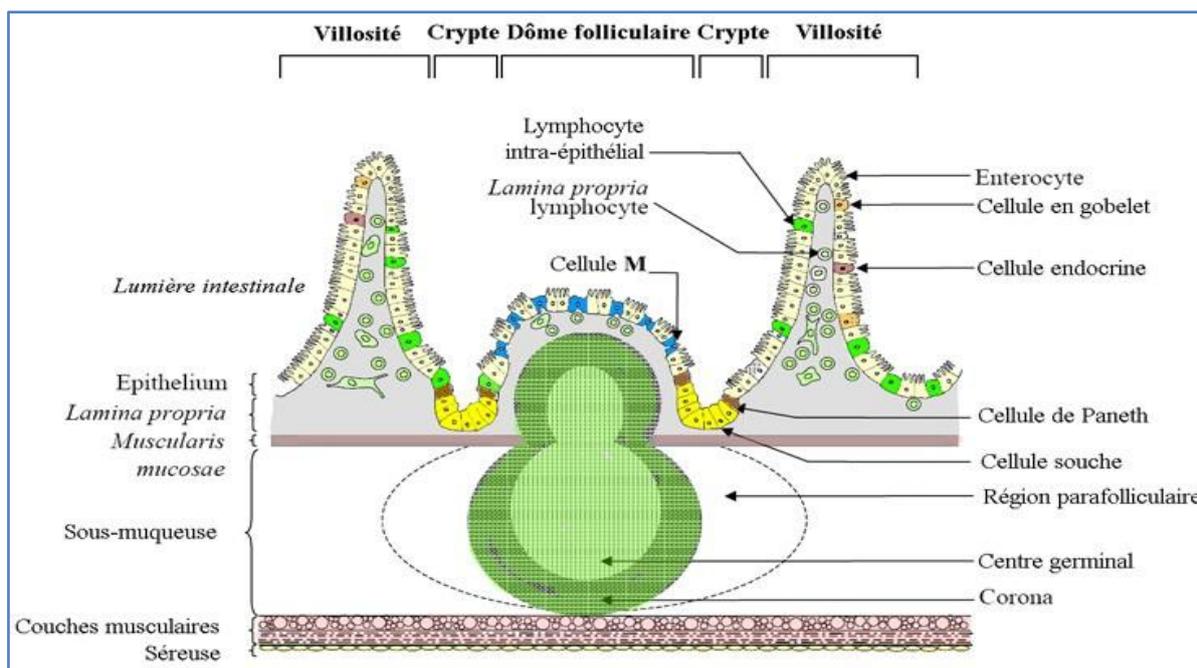
- ✚ **Muqueuse**
- ✚ **Sous muqueuse**
- ✚ **Musculeuse**
- ✚ **Séreuse ou péritoine**

Il existe des variations histologiques au niveau de la muqueuse et la sous muqueuse :

La musculeuse et la séreuse sont identiques (**Kierszenbaum, 2006**) (**figure 12**).

**3.2.1. Muqueuse intestinale** : Elle forme la tunique interne (**figure 12**), elle est composée par :

- l'épithélium des villosités.
- des glandes (ou cryptes) de Lieberkühn.
- le chorion (*lamina propria*).
- la musculaire muqueuse.



**Figure 12** : Organisation de la paroi digestive (LEBAS, 2006).

Dans le **chorion**, on trouve des cellules immunocompétentes (lymphocytes, plasmocytes et macrophages), le chorion de l'intestin grêle est un site important de réactions immunitaires (Kierszenbaum, 2006).

La **musculaire muqueuse** est une mince lamelle de cellules musculaires lisses ; elle est constituée de deux couches l'une interne circulaire d'où se détachent de grêles faisceaux destinés aux villosités et se terminant à leur partie apicale sur la lame basale l'autre longitudinale externe participe à la structure des valvules conniventes (Coujard et al., 1980).

### 3.2.2. Sous muqueuse :

La sous muqueuse est une couche épaisse de tissu conjonctif responsable de l'insensibilité et de l'élasticité du tube digestif. Elle contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui envoient des branches vers la muqueuse et la musculuse.

### 3.2.3. Musculeuse :

La couche profonde est circulaire, la couche externe longitudinale elles sont réunies par des faisceaux musculaires s communs (Coujard et al., 1980).

### 3.2.4. Séreuse :

Mince couche de tissu conjonctif, est recouverte du péritoine viscéral, couche séreuse revêtue d'un épithélium pavimenteux simple, ou mésothélium .le péritoine pariétal recouvre la face interne de la paroi abdominal (KIERSZENBAUM, 2006).

### 3.3.Épithélium intestinal :

Chez les mammifères l'épithélium est largement pourvu de plis qui forment les villosités intestinales. La muqueuse et la sous muqueuse sont encore plissées, essentiellement au niveau du jéjunum, très peu au niveau du duodénum et de l'iléon (Gilles *et al.*, 2006).

Chaque villosité est formée de *lamina propria*, à l'intérieure de ces villosités le tissu conjonctif contient, une artériole, une veinule, un réseau de capillaires sanguins, et un vaisseau chylifère, qui est un capillaire lymphatique (Tortora et Derrickson, 2018) et des cellules libres de défense (Lüllmann, 2008) (Figure 06).

L'épithélium intestinal associé aux follicules est spécialisé dans le transfert des pathogènes dans le tissu lymphoïde, les **plaques de Peyer** sont situées dans la partie base de l'iléon (Male *et al.*, 2007).

Chaque cellule épithéliale présente des replis à son pôle apical (bordure en brosse). L'ensemble de ces structures plissées fait que la surface de contact de l'intestin avec le contenu digestif a été estimée équivalente à celle de deux courts de tennis ou d'un terrain de football (Fioramonti, 2014).

#### 3.3.1. Prolifération et différenciation de l'épithélium intestinale :

Le compartiment de **prolifération** (figure 13) est localisé dans la **crypte**, alors que le compartiment de **différenciation** se situe dans la **villosité**. Plus les cellules sont spécialisées, plus elles migrent depuis le fond de la crypte vers la lumière de l'intestin (Arrighi, 2018).

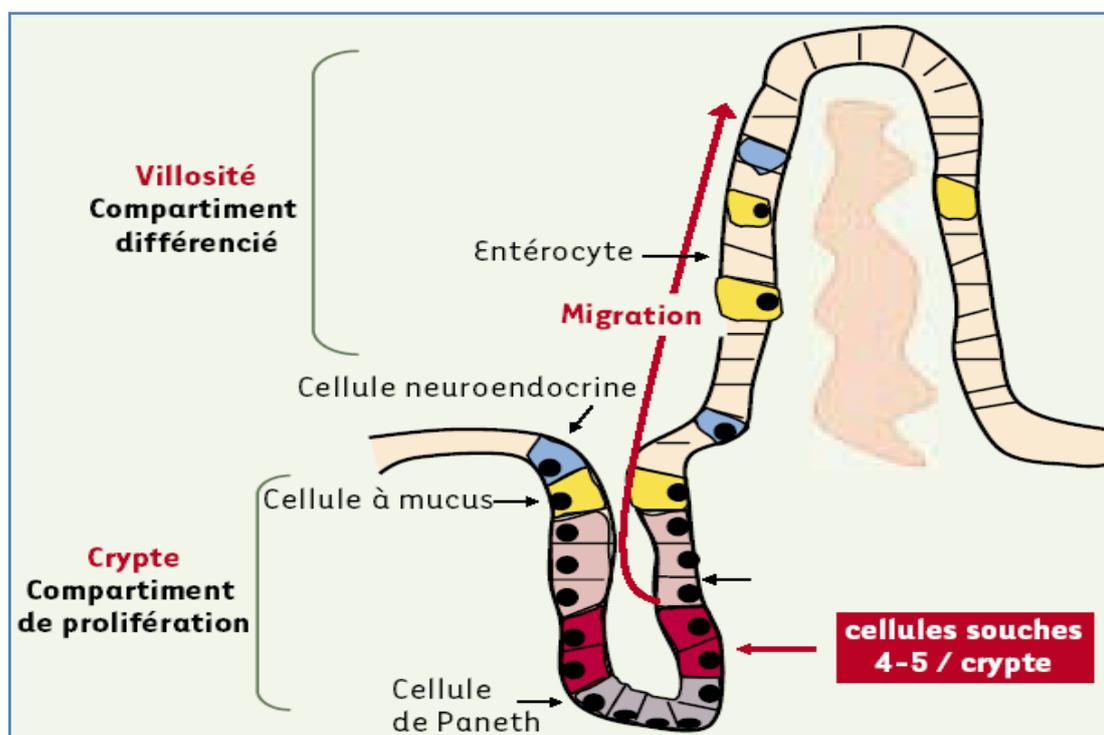


Figure 13 : Organisation anatomique de l'intestin grêle d'après (Andreu *et al.*, 2006).

### 3.3.2. Types cellulaires de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal provient de la différenciation des cellules souches retrouvés à la base de la crypte, localisées au niveau des villosités de l'intestin grêle et dans la partie supérieure des cryptes du côlon.

Selon leurs caractéristiques fonctionnelles, ces cellules appartiennent au :

- **Lignage absorbant** (entérocytes, cellules M et cellules en coupe) ou
- **Lignage sécréteur** (cellules de Paneth, cellules caliciformes, cellules entéro-endocrines, et cellules en houppes) (**Balbinot, 2017**).

• **Les entérocytes** : L'entérocyte est une cellule prismatique, qui a une fonction d'absorption ; le noyau ovoïde est allongé selon l'axe de la cellule est légèrement rejeté vers la base cellulaire. La membrane apicale différencié en plateau strié (bordure en brosse) est revêtue par le glycocalyx qui s'insinue entre les microvillosités jusqu'à leur base (**Coujard et al., 1980**) (**figure 06**).

De très nombreuses enzymes hydrolytiques (peptidases, amino-peptidases, disaccharidases, phosphatases alcalines, etc.) sont présentes au niveau du plateau strié des entérocytes. Ces diverses enzymes assurent les dernières étapes de l'hydrolyse des protides et des glucides alimentaires et livrent ainsi aux « transporteurs » de la membrane plasmique les acides aminés et le glucose qu'ils ont pour rôle de faire pénétrer à l'intérieur des entérocytes qui les déverseront dans les capillaires sanguins (**André et Poirier, 2003**).

• **Les cellules caliciformes** : Sont des cellules à mucus, elles sont moins nombreuses et secrètent en continu un mucus dont le rôle premier est de faciliter le glissement et la protection face aux ingesta progressant dans la lumière (**André et Poirier, 2003**) (**Figure 14**).

• **Les cellules entéro-endocrines** représentent une minorité des cellules de l'épithélium intestinal. Elles sont responsables de la production d'une trentaine d'hormones régulant la satiété, la motilité, l'immunité, et l'inflammation. Les cellules entérochromaffines, sécrétant principalement la sérotonine, sont les cellules entéro-endocrines les plus représentées de la muqueuse intestinale (**Noah et al., 2011**).

• **Les cellules de Paneth** : Le fond des glandes de Lieberkuhn est tapissé par des cellules dites de **Paneth** (**Gilles et al., 2006**). Elles font une partie de la voie sécrétrice et produisent des molécules visant à maintenir la crypte dans un environnement stérile (lysozyme, TNF- $\alpha$ , défensines) (**Ouellette, 2004**).

• **Les cellules M**, ou cellules à microplis, sont principalement retrouvées dans l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer, et, dans une moindre mesure, entre les autres types cellulaires différenciés des villosités (**Balbinot, 2017**).

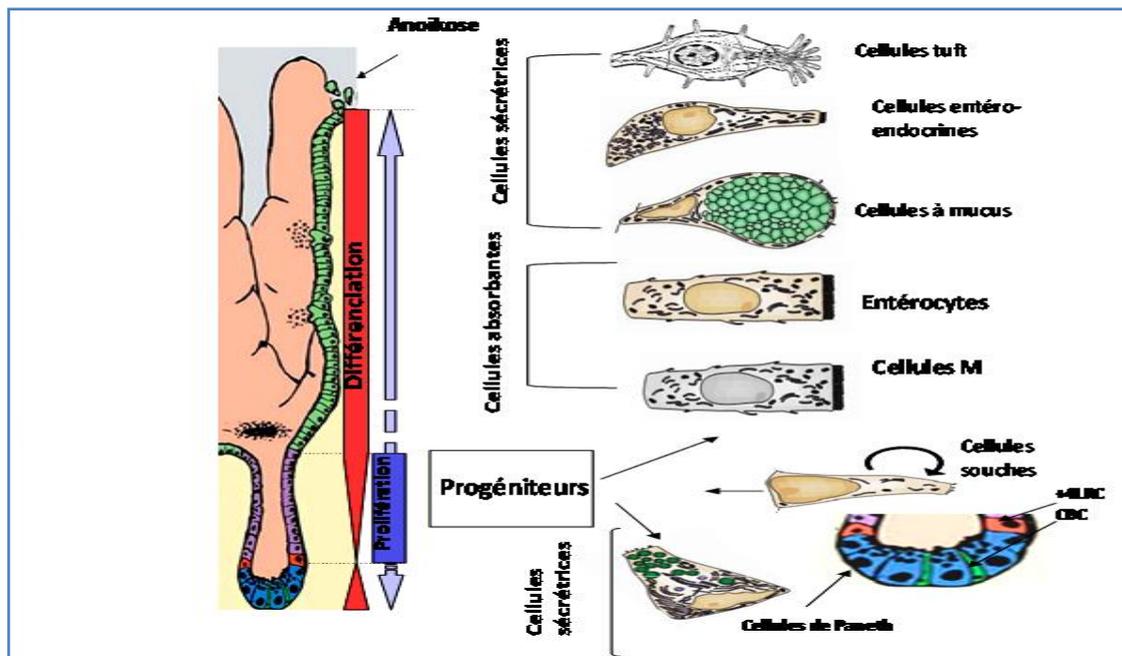


Figure 14 : Vue de détail d'une villosité illustrant les différents types de cellules (Crosnier et al., 2006).

### 5.5 Glandes de Brunner

La tunique conjonctive de la sous-muqueuse au niveau du duodénum contient des « **glandes de Brunner** ». Les glandes de Brunner (**figure 4**) sont des glandes muqueuses tubulo-acineuses produisant une sécrétion alcaline qui neutralise le chyme acide provenant de l'estomac (**Kierszenbaum, 2006**). Par un canal excréteur, le mucus s'évacue au fond des cryptes de Lieberkühn après traversée de la musculaire-muqueuse (**Catala et al., 2007**).

Les glandes sont constituées de grandes cellules en colonne avec cytoplasme abondant, transparent à mucineux avec des noyaux situés à la base. Dans le duodénum proximal, il peut s'étendre à travers la muqueuse musculaire et dans les cryptes sus-jacentes. Il est théorisé que le chyme dans le duodénum stimule les glandes pour sécréter un mucus alcalin qui aide à neutraliser l'acide de l'estomac (**Steinbach et Kane, 2012**). Les glandes de Brunner sécrètent aussi du lysozyme, facteur de croissance (**Steinbach et Kane, 2012**); et produisent de l'urogastrone, qui inhibe la sécrétion acide gastrique (**Itaba et al., 2006**).

#### 3.3.3. Hyperplasie des glandes de Brunner

L'hyperplasie des glandes de Brunner, également connue sous le nom de **Brunneroma** ou **hématome polypléide**, est une lésion rare, **bénigne et proliférative**, se développant à partir des glandes de Brunner du duodénum (**Kume et al., 2009**), caractérisée par des lobules des glandes de Brunner qui sont augmentés en taille et en nombre (**Dhouha et al., 2017**).

Représente 10,6% des **tumeurs bénignes** du duodénum. Plusieurs cas d'hyperplasie de la glande de Brunner causant une hémorragie, une obstruction ou une invagination intestinale. (**Kume et al., 2009**).

## 6. ETUDE BIOINFORMATIQUE

Lors de sa création, la bioinformatique correspondait à l'utilisation de l'informatique pour stocker et analyser les données de la biologie moléculaire. Cette définition originale a maintenant été étendue et le terme bioinformatique est souvent associé à l'utilisation de l'informatique pour résoudre les problèmes scientifiques posés par la biologie dans son ensemble. Il s'agit dans tous les cas d'un champ de recherche multidisciplinaire qui associe informaticiens, mathématiciens, physiciens et biologistes.

Pour aboutir à la formulation de ces modèles et à ces prédictions, il est indispensable de tout d'abord collecter et organiser les données à travers la création de bases de données (**Dardel et Képès, 2002**).

### 6.1 Les bases de données

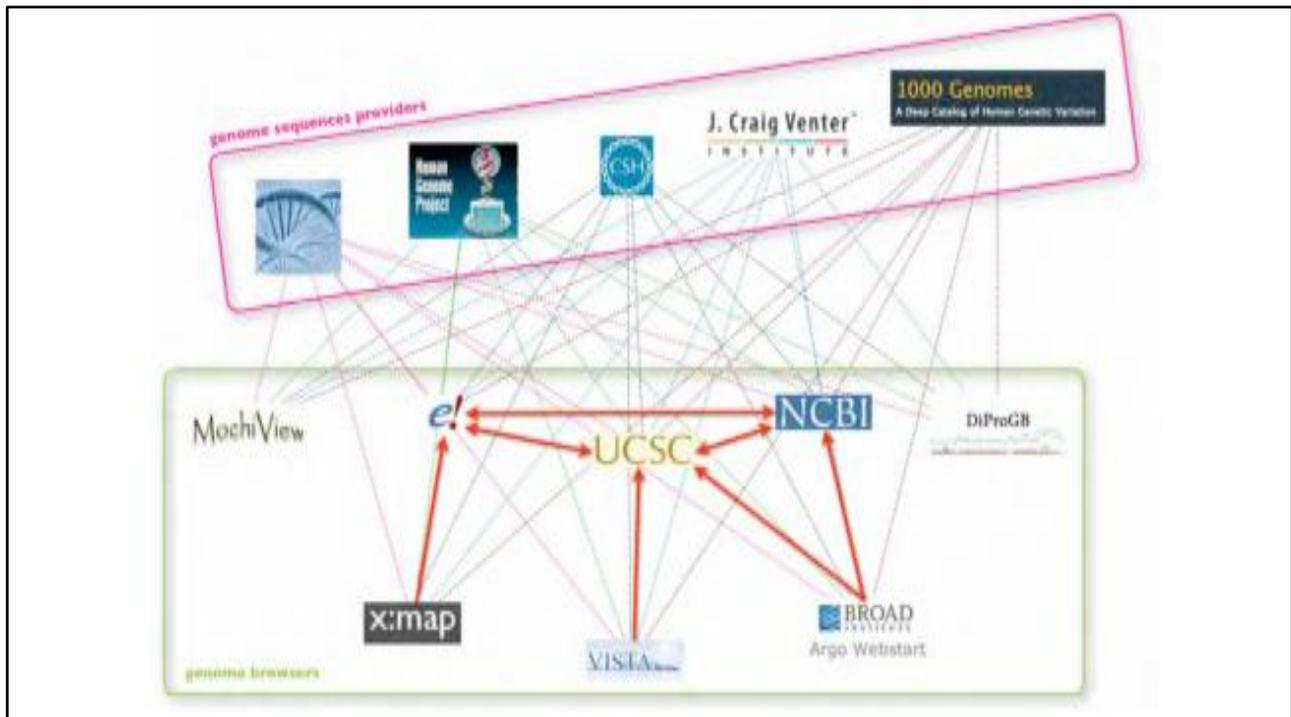
Une base de données est un ensemble structuré et organisé permettant le stockage de grandes quantités d'informations afin d'en faciliter leur utilisation. L'un des modèles les plus utilisés aujourd'hui est le modèle de bases de données relationnelles qui a été inventé en 1970 par **Edgar Frank Codd**.

#### 6.1.1 Banques de données utiles dans le domaine de la génétique

- **"GENOME BROWSERS"** : Ils correspondent à différentes bases de données qui permettent d'accéder aux données du génome humain (et de celui d'autres espèces) à l'aide d'une interface graphique. En plus des données de séquence, ces navigateurs permettent d'accéder à de nombreuses données d'annotation (gènes avec exons et introns, sites de fixation, régions d'homologie). Les plus populaires sont :

- **Ensembl** (European Bioinformatics Institute / Wellcome Trust Sanger Institute).
- **NCBI** (National Cancer for Biology Information).
- **UCSC** (University of California Santa Cruz).

Si l'ensemble des "Genome Browsers" permet d'accéder à de très nombreuses données, aucun d'entre eux ne génère ces données. Ils sont donc dépendants d'autres centres ou laboratoires de recherche qui eux les produisent. Ceci explique pourquoi les mêmes données sont partagées par ces différents navigateurs et c'est souvent l'interface qui oriente vers l'un plutôt que l'autre ou la richesse des outils d'analyse associés. (**Gibas et Jambeck, 2002**).



**Figure 15 : Représentation des liens entre les "Génome Browsers" et les fournisseurs de données (Deléage et Gouy, 2013).**

- **Structure des protéines** : Parmi les différents outils d'annotation fonctionnelle, attachons nous à ceux en relation avec la structure des protéines puisque cette connaissance sera d'un apport primordial pour l'interprétation des mutations responsables de maladies génétiques.

Les plus populaires sont :

- **Uniprot/Swiss Prot/Expasy** (Uniprot Consortium).
- **Protein Data Bank** (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics).
- **Topspan** (Open Protein Structure Annotation Network).
- **NCBI** (National Cancer for Biology Information).
- **PDBsum** (European Bioinformatics Institute) (Deléage et Gouy, 2013).

## 6.2 utilisation de la bioinformatique

- Prédiction des changement de stabilités des protéines .
- Prédiction de l'agrégation des protéines .
- Prédiction des régions désordonnés .
- Prédiction du caractère pathogène de mutation faux-sens .
- Prédiction du caractère pathogène de mutation intronique (Deléage et Gouy, 2013).

**CHAPITRE II**

**MATERIEL**

**ET**

**METHODES**

**PRESENTATION ET LIEU DE L'ETUDE**

L'objectif de l'étude est la recherche des effets toxiques d'une formulation insecticide de la famille des avermectines dont la matière active est l'abamectine (ABM), et l'effet d'une supplémentation vitaminique (vitamines C et E) après exposition subaiguë (21 jours) sur l'intestin (plus précisément le duodénum) des lapins males de souche local « *Oryctolagus cuniculus* ».

Le présent travail a été réalisé durant la période allant du mois de février jusqu'au mois de juin 2019 au sein du laboratoire d'anatomopathologie de l'hôpital de Beni Messous ou nous avons recherché les effets génotoxiques de l'abamectine par :

- ✚ Une étude histologique de l'intestin (coloration H&E)
- ✚ Une étude immunohistochimique (IHC) : Marqueurs de prolifération P53 et d'apoptose Bcl2 au niveau du duodénum de quatre lots d'animaux.
- ✚ Ce travail a été complété par une étude bioinformatique sur la P53.

## 1. Matériel

**1.1. Matériel biologique :** Notre travail vient compléter une étude de toxicité subaiguë par l'abamectine et l'effet amélioratif probable d'une Co-administration des vitamines C et E, dont le protocole suivi est détaillé par Abid et Koob (2016). Notre expérimentation débute à partir des organes inclus dans de la paraffine (blocs de paraffine).

**1.2. Matériel non biologique :** les produits utilisés dans l'étude sont : l'insecticide abamectine, les vitamines C et E.

Le matériel non biologique utilisé dans la présente étude est constitué de verrerie classique et appareillages et réactifs chimiques du laboratoire d'anatomopathologie (Annexe 1).

## 2. Méthode

### 2.1. Taxonomie du lapin :

L'étude a porté sur 20 lapins mâles de souche locale Algérienne (Figure 16). La position taxonomique du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est la suivante (**Lebas et al., 1984**).

Règne : **Animale**

Embranchement : **Vertébrés**

Classe : **Mammifères**

Super ordre : **Glires**

Ordre : **Lagomorphes**

Famille : **Léporides (lièvre et lapin)**

Sous-famille : **Leporinae**

Genre : ***Oryctolagus***

Espèce : ***Oryctolagus cuniculus***



**Figure 16:** lapin male *Oryctolagus cuniculus*

**2.2.Répartition des lots:** vingt lapins male ont été repartis en quatre lots comme suit :

LOT	1 <sup>er</sup> Lot : Témoin	2 <sup>ème</sup> Lot : Vit CE	3 <sup>ème</sup> Lot : ABM	4 <sup>ème</sup> ABM+Vit CE
Nombre	5	5	5	5
Traitement	H <sub>2</sub> O Distillée	200 mg/kg/p.c. de vitamine C et de vitamine E	10mg/kg/p.c. ABM	10 mg/kg/p.c. ABM + 200 mg/kg/p.c Vit CE

-1<sup>er</sup> lot control négatif : lot témoin recevant de l'eau distillée.

-2<sup>ème</sup> lot control positif : lapin traite par les deux vitamines C et E.

-3<sup>ème</sup> lot ABM : lapin traité par l'abamectine.

-4<sup>ème</sup> lot ABM + vitC + vitE : lapin traité par la vitamine C E et l'abamectine.

À la fin de l'expérience (21jours), les lapins ont été euthanasiés par décapitation cervicale et leurs organes ont été prélevés, l'intestin rapidement retirés et lavé à l'eau puis fixer pour l'étude histologique et immunohistochimiques.

### 2.3 Etude histologique

L'intestin a été coupé en petit fragments et déposé dans des cassettes en plastique, puis soumis aux étapes de l'étude histopathologique. La confection des blocs et les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du service d'anatomie pathologique (CHU Beni-Messous), La technique comporte les étapes suivantes :

#### 2.3.1. Fixation des échantillons

La fixation consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires. Elle permet de préserver les structures tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. La rapidité de l'opérateur ne suffit pas à assurer la qualité de la fixation: il faut encore que le fixateur pénètre le plus vite possible à l'intérieur des tissus.

La fixation a pour but donc d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après sacrifice des animaux et prélèvement des organes. Des fragments de l'intestin ont été alors mis dans le formol à 10% le fixateur classique le plus utilisé. Il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent.

### 2.3.2. Circulation

Étape consistant à faire pénétrer la paraffine au sein du tissu, comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène.

**2.3.1.1. Déshydratation** : La déshydratation se fait par immersion des cassettes (contenant les fragments de l'intestin) dans des bains d'alcool de degré croissant (70°, 90°, 100°) pendant ½ heure par bain pour éliminer l'eau des tissus.

**2.3.1.2. Éclaircissement** : Les cassettes sont ensuite émergés dans du xylène. Quatre bains de xylène à raison de 30 minutes par bain ont été effectués qui servent à remplacer l'alcool dans les tissus afin que celui-ci soit miscible dans la paraffine.

**2.3.1.3. Imprégnation dans la paraffine:** C'est la dernière étape de la circulation. La paraffine doit être chauffée pour se liquéfier, dans deux bain successifs de paraffine pure fondue à 60°C, afin d'éliminer l'xylène. L'ensemble des opérations sont effectuées dans un automate de type Leica pendant une durée de 12 heures.

### 2.3.3. Enrobage (inclusion)

A pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine ; l'inclusion a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Écoulement de la paraffine chauffée à 60° C dans les moules métalliques.
- Orientation des fragments dans la paraffine (les fragments sont placés dans le moule selon un certain angle ou une certaine position afin de voir toutes les structures désirées lors de l'examen microscopique).
- Placer les cassettes au dessus des moules. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine dur, à l'intérieur duquel le fragment prélevé est inclus.
- Les blocs sont ensuite démoulés.

Cette étape se fait grâce à l'automate d'inclusion. La partie froide de l'automate à inclusion permet de refroidir les blocs rapidement.

### 2.3.4. Réalisation des coupes

Les cassettes de paraffine contenant les prélèvements sont fixés sur un microtome de type Leica pour réaliser des ruban de coupes d'organe à une épaisseur de 2 à 4 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis dépliés (identifier les lames à l'aide

d'un diamant spéciale). Les lames portant les coupes de l'organe sont ensuite séchées dans une étuve à 100 °C afin de permettre un déparaffinage.

### 2.3.5. coloration histologique H&E

Une coloration histologique nécessite les étapes suivantes

**2.3.5.1. déparaffinage :** a pour but d'enlever la paraffine du tissu pour permettre au colorant de pénétrer, on fait passer les lames dans 4 bains de xylène pendant 3 à 5 minutes par bain.

**2.3.5.2. Hydratation :** sert à retirer le xylène du tissu et le faire remplacer par de l'eau. L'agent utilisé est l'alcool (3 bains de 2 minutes chacun à concentrations décroissantes 100°, 90°, 70°). Suivi d'un rinçage de 3 à 5 minutes à l'eau courant et enfin on passe à la coloration.

### 2.3.6. Coloration Hématoxyline –Eosine (HE)

La coloration d'hématoxyline –éosine est la coloration usuelle adoptée en anatomie pathologique. La coloration passe par les étapes suivantes :

- ✚ Un bain d'hématoxyline de Harris (un colorant basique nucléaire) pour la coloration des noyaux en bleu pendant 6 minutes.
- ✚ Rinçage à l'eau courant pour le lavage des lames.
- ✚ La coloration avec l'éosine (un colorant acide cytoplasmique) pour la coloration de cytoplasme en rose pendant 1 minute.
- ✚ Rinçage à l'eau courant pour le lavage des lames.
- ✚ Après la coloration, On procède à un séchage dans l'étuve

### 2.3.7. Montage des lames

Le montage est la dernière étape de la préparation des lames pour la lecture en microscopie. La protection des coupes colorées est réalisée grâce à des lamelles en utilisant l'Eukitt qui favorise le collage de la lamelle sur la lame. Il a pour but la protection des coupes contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxyde facilement à l'air. Après montage, les lames sont séchées sur papier absorbant et nettoyées au xylène. Elles sont alors prêtes à l'observation microscopique.

### 2.3.8. Etude microscopique

L'observation des lames a été faite à l'aide d'un microscope photonique de type Leica. Le grossissement 4 nous permis de voir la forme générale de l'organe, et les grossissement 10, 40 et 100 nous ont permis de faire l'étude structurelle et l'agencement des différents tissus dans l'organe.

## **2.4. Étude immunohistochimique (IHC)**

### **2.4.1. principe**

C'est une méthode de détection d'une protéine sur coupe tissulaire ou sur un étalement cytologique, à l'aide d'un anticorps (AC) révélé par une réaction colorimétrique enzymatique. L'immunohistochimie (IHC) est maintenant utilisée en routine et constitue un grand apport pour le diagnostic en oncologie, pour aider à classer une tumeur, pour identifier l'origine d'une métastase et dans certains cas pour aider à établir la malignité d'une lésion.

### **2.4.2. Mode opératoire**

Il existe différentes techniques plus ou moins complexes visant à amplifier le signal sans augmenter le bruit de fond : nous avons utilisé la technique peroxydase anti-peroxydase (PAP). Ce système d'amplification utilise un second AC qui sert de liaison entre l'AC primaire et le complexe PAP. On procède en 4 étapes : les 3 premiers mettent en cause des liaisons antigène-anticorps, la 4<sup>ème</sup> est une réaction enzymatique.

### **2.4.3. Réalisation des coupes**

Pour une bonne technique d'IHC la coupe doit être extra fine de 2 à 3  $\mu\text{m}$ , et ceci pour éviter le dépôt des marqueurs et des colorants ce qui donne un faux résultat. L'étalement des coupes se fait sur des lames sélanisées thermo résistantes à 98°C, elles ne se cassent pas et retiennent les fragments ce qui évite le décollement des coupes, sans donner de bruit de fond. On sèche les lames pendant une nuit pour l'adhésion des coupes sur les lames.

### **2.4.4. Déparaffinage et réhydratation**

Pendant le déparaffinage des lames on prépare le bain marie automatique à 98°C. Le déparaffinage et la réhydratation se font successivement dans 3 bacs de xylène pendant 5 minutes chacun, suivie d'une réhydratation par passage des sections dans des bacs d'alcools décroissants (100°, 90°, 70°) pendant 5 min chacun puis rincer avec l'eau distillée (5min).

### **2.4.5. Démasquage antigénique par la chaleur au bain marie**

Son but est de remédier aux effets secondaires de fixation formolée et ceci par la chaleur, dans un bain marie à 98°C pendant 35 min.

Ensuite, la solution de démasquage (**TRS**) est préparée (elle va être diluée à 1/10 dans l'eau distillée), pour démasquer les sites Antigéniques. Les bacs contiennent la solution de

démasquage sont mis dans le bain marie (10 min). Les lames sont mises ensuite dans les bacs à solution de démasquage et remises dans le bain marie (40 min).

- Sortir le bac du bain –marie et laisser refroidir sur la paillasse (20 min).
- Transférer le portoir dans un bac d'eau distillée (5 min) pour le rinçage.
- Lavage en TBS (tampon de lavage) pendant 5 min
- Préparation de la chambre humide (par une compresse mouillée), l'incubation doit se faire en obscurité et humidité, la lumière absorbe la positivité et la chaleur inhibe l'action des enzymes.
- Encerclement des prélèvements par DAKO-PEN (colle) pour éviter le déversement des marqueurs.

#### **2.4.6. Blocage des peroxydases endogènes**

Addition d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) à 3 % pendant 10 min ,pour éviter l'effet électrostatique positive et négative ainsi que les réactions chimique , également pour libérer les sites antigéniques, puis on rince a l'eau distillée (5 min) pour éliminer les débris des épitopes et les Ag soient nets Placer les lames dans 3 bains de TBS propre 5 minutes pour chacun.

#### **2.4.7. Application de l'Ac primaire**

- L'incubation des prélèvements avec une goutte de marqueur AC (anti p53 ou anti Bcl2) pendant 30 min dans la chambre humide.
- Rinçage par l'eau distillée ensuite dans le tampon TBS pendant 5 min.

#### **2.4.8. Application de l'Ac secondaire**

Dépôt de l'AC secondaire couplé à la peroxydase (01 goutte de l'HRP rabbit/ mouse (peroxydase de raifort) (15-30 min) puis rinçage au tampon TBS.

#### **2.4.9. Révélation**

- Préparer de la solution DAB : en mettant (01 ml du diluant « Substrat Buffer ») avec (20µl du concentré (Chromogène DAB). ajout d'une goutte du chromogène de la peroxydase (DAB) sur chaque lame (05-10min), donnant ainsi une coloration brunâtre donc positivité
- puis rinçage à l'eau distillée.

#### **2.4.10. Contre coloration**

Contre coloration : avec l'hématoxyline qui va colorer le noyau (1-2 min). Puis rinçage avec de l'eau distillée. Pour le montage, l'Eukitt (01 goutte) est utilisé sur la lame, cette dernière est couverte ensuite avec une lamelle (Observation microscopique).

### 2.5. Etude bioinformatique de la P53

le but de cette étude est d'établir un arbre phylogénétique de la p53 humaine et les différentes espèces ainsi d'aligner la séquence p53 avec les différents isoformes chez le lapin .

#### 2.5.1. NCBI

Le NCBI conduit des recherches dans la biologie informatique, développe des logiciels pour analyser des données de génome et fournir des informations biomédicales. Le NCBI n'est pas une base de données, mais il développe aussi des bases de données publiques.

- Refseq : fournit un ensemble complet, intégré, non redondant et bien annoté de séquences, y compris l'ADN génomique, les transcrits et les protéines. Les séquences RefSeq constituent une base pour les études médicales, fonctionnelles et de diversité. Ils fournissent une référence stable pour l'annotation génomique, l'identification et la caractérisation des gènes, l'analyse des mutations et du polymorphisme . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.

la séquence de gène p53 qu'on a utilisée dans cette étude a été fournie par RefSeq .

- BLAST : trouve les régions de similarité locale entre les séquences. Le programme compare les séquences de nucléotides ou de protéines aux bases de données de séquençage et calcule la signification statistique des correspondances. BLAST peut être utilisé pour déduire les relations fonctionnelles et évolutives entre les séquences ainsi que pour aider à identifier les membres des familles de gènes.

#### 2.5.2. COSMIC

Le Catalogue des mutations somatiques dans le cancer, est la ressource la plus importante et la plus complète au monde pour explorer l'impact des mutations somatiques dans le cancer humain.

On a utilisé COSMIC pour trouver les différentes mutations qui touchent le gène p53 , ainsi les régions les plus mutées et le type de cancer qui résulte de ces mutations <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic#> .

- Uniprot : on a utilisé Uniprot pour avoir la structure tridimensionnelle de la protéine p53 ainsi pour trouver les régions les plus touchées par les mutations sur la protéine. Et de trouver et d'aligner les isoformes de la p53 chez le lapin avec la p53 humaine . <https://www.uniprot.org/align/>

CHAPITRE III

RESULTATS

ET

DISCUSSION

**CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

Notre travail s'intéresse aux variations histologiques et immunohistochimiques de l'expression de la protéine P53 et de la protéine Bcl2 au niveau du parenchyme duodéal chez le lapin de souche local traité par un insecticide de la famille des avermectines et dont la matière active est l'abamectine ; tout en démontrant l'effet amélioratif d'une supplémentation des vitamines C et E.

Nos résultats ci-dessous regroupent une :

- Etude histologique du parenchyme duodéal chez le lapin témoin en comparaison avec le traité par l'abamectine et celui traité par abamectine et co-administré à la vitamine C et E;
- Etude immunohistochimique (IHC) de l'expression de la protéine P53 et BCL2 chez les quatre lots.
- Etude bioinformatique du gène P53.

## 1. RESULTATS

### 1.1. Etude histologique du parenchyme duodéal

Dans le présent travail nous avons réalisé une coloration histologique topographique **Hématoxyline Eosine (H&E)** qui associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris à une coloration des cytoplasmes et du collagène par l'éosine.

#### 1.1.1. Histologie du duodénum des lapins témoins

L'observation d'une coupe histologique au fort grossissement montre la présence de quatre tuniques une muqueuse constitué d'un épithélium à cellules caliciformes suivi d'une sous muqueuse (SM) caractérisée par la présence de glandes de Brunner (GB) ; une musculature constituée d'une couche circulaire interne (CMC) et d'une couche longitudinale externe (CML) l'ensemble est recouvert d'un tissu conjonctif l'adventice (A). Au fort grossissement on observe une muqueuse normale, avec des villosités (V) et des cryptes (C) peu profondes (**Planche 1**).

#### 1.1.2. Histologie du duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E.

L'observation d'une coupe histologique au fort grossissement montre une structure normale de la paroi intestinale ressemblant a celle des témoins composée d'une muqueuse, une sous muqueuse, une musculature constituée une couche circulaire interne (CMC) et d'une couche longitudinale externe (CML) et un adventice (A). Au faible grossissement on constate la présence d'un épithélium a cellules caliciformes suivi d'une sous muqueuse (SM) caractérisée par la présence de glandes de Brunner (GB) (**Planche 2**).

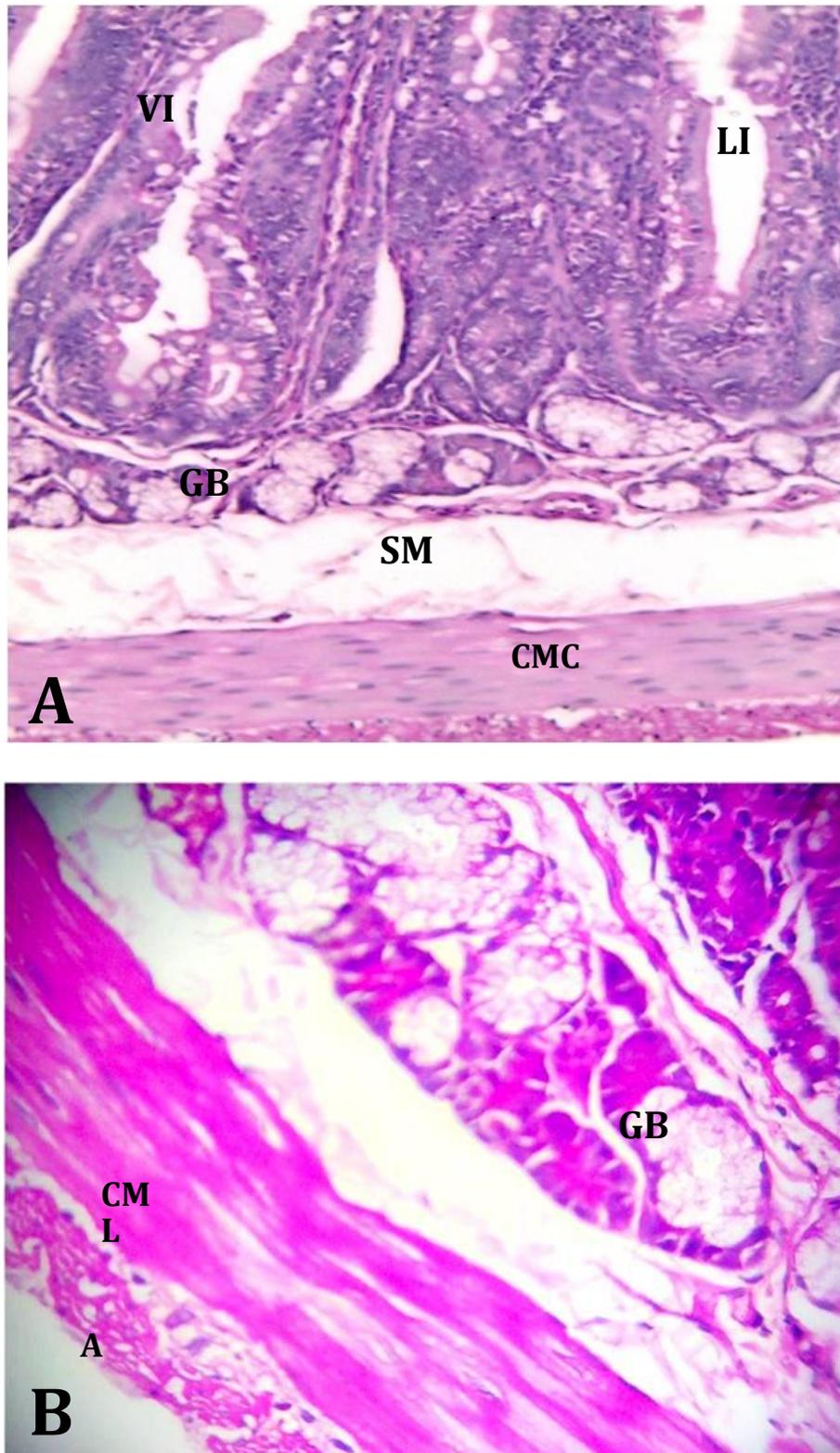
#### 1.1.3. Histologie du duodénum des lapins traités par l'ivermectine

L'observation d'une coupe histologique au fort grossissement montre plusieurs lésions au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse intestinale duodénale (SM) principalement une hyperplasie des glandes de Brunner (HGB) un aplatissement de l'épithélium avec une désorganisation des villosités (AVI) ainsi qu'une inflammation (IF) au niveau de l'axe de la villosité et dans la sous muqueuse (**Planche 3**).

#### 1.1.4. Histologie du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.

Le parenchyme duodéal montre au fort grossissement une structure moins altérée au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse intestinale (SM) avec absence d'hyperplasie des glandes de Brunner (HGB). Cependant nous avons enregistré la présence d'un infiltrat inflammatoire lymphoplasmocytaire (IF) au niveau de l'axe de la villosité et dans la sous muqueuse (**Planche 4**).

Histologie du duodénum des lapins témoins

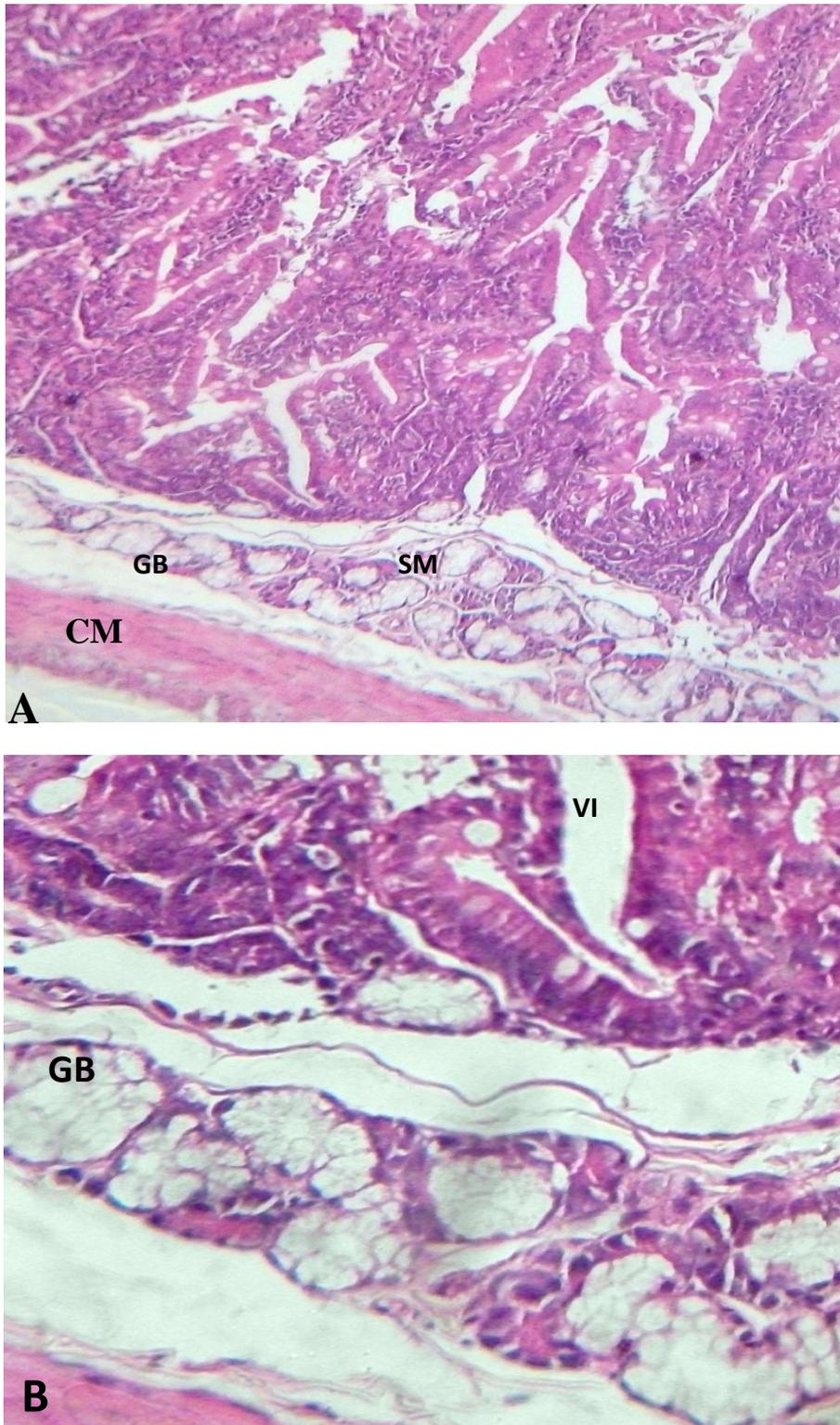


**Planche 1** : Histologie du parenchyme duodénales chez le lapin témoin coloration H&E

A : GrX10    B : Gr X 40

VI : Villosités intestinales, GB : Glandes de Brunner, LI : lumière intestinale, A : adventice, CMC : couche circulaire interne , SM : sous muqueuse, CML : couche longitudinale externe

Histologie du duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E

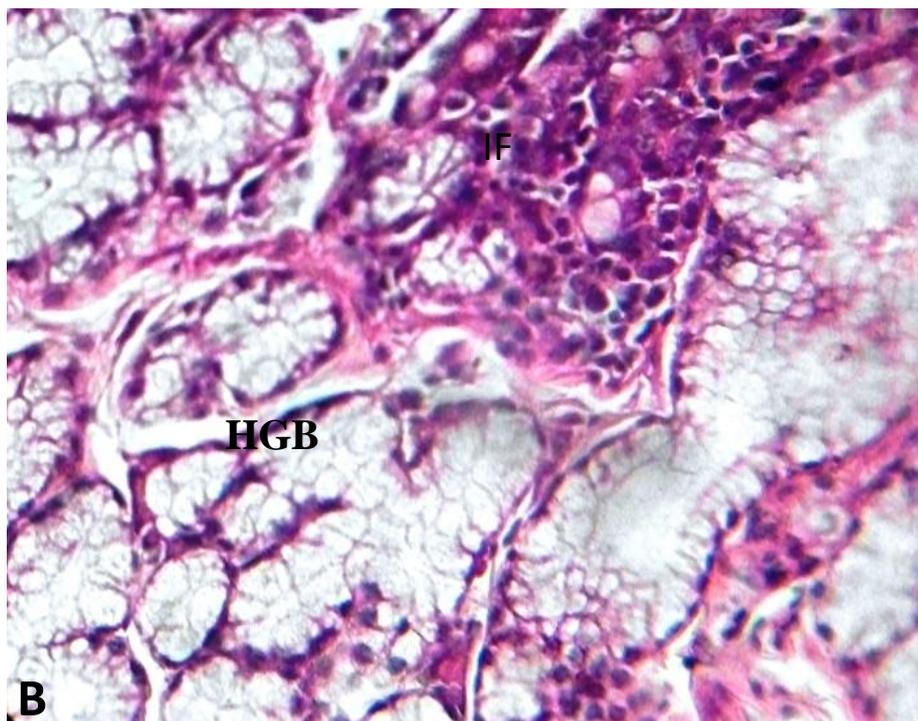
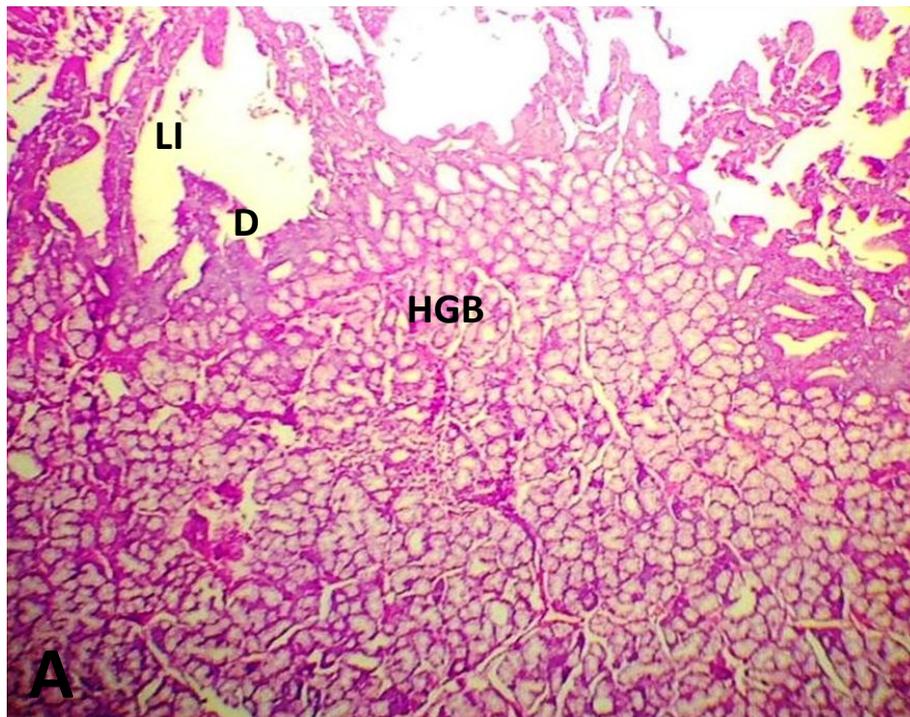


**Planche 2 :** Histologie du parenchyme duodénale chez le lapin supplementé par vitamines C et E coloration H&E.

A : GrX10    B : Gr X 40

V : Villosités intestinales, GB : Glandes de Brunner, LI : lumière intestinale SM : Sous Muqueuse, CM : Couche Musculaire

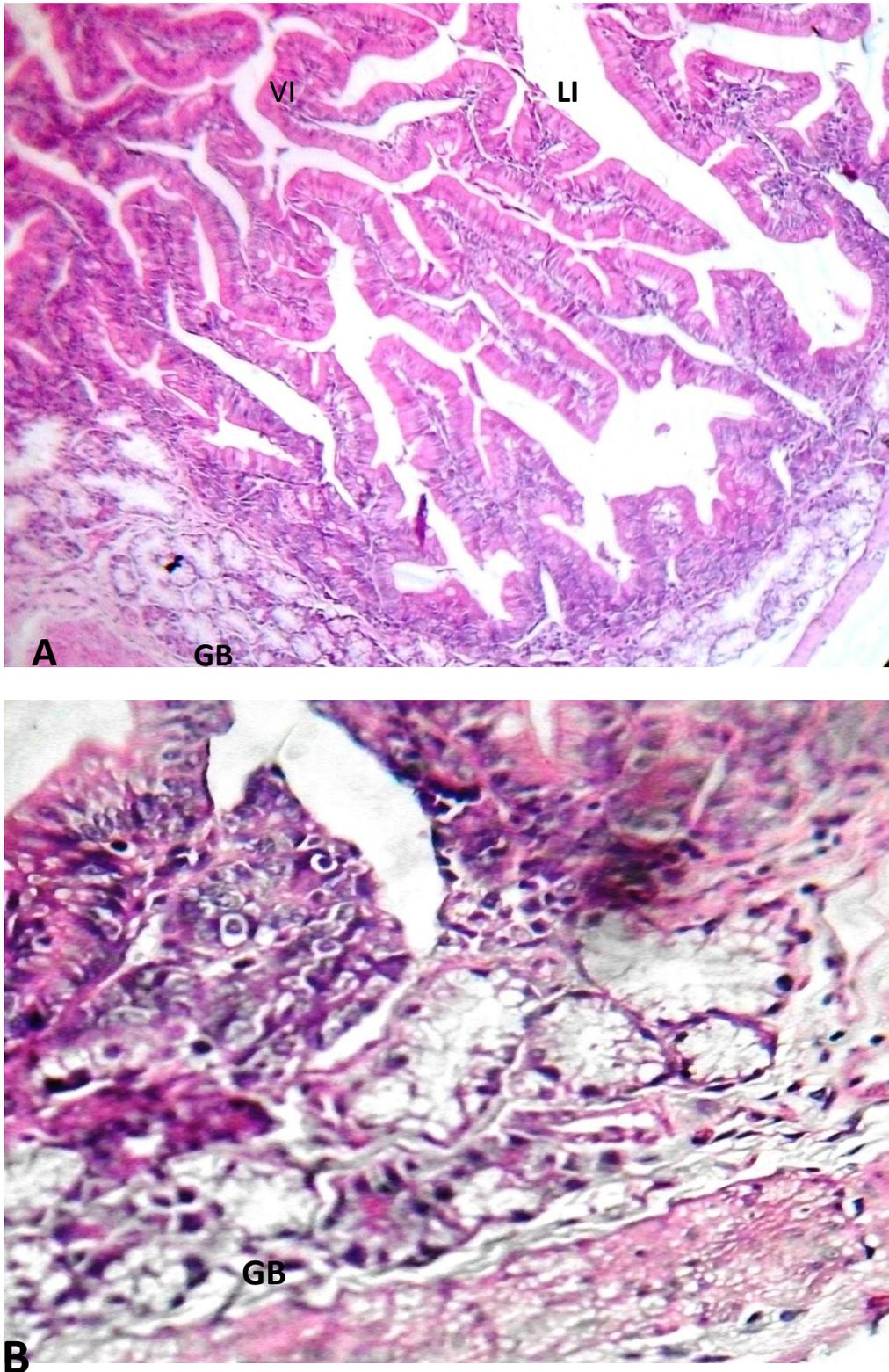
## Histologie du duodénum des lapins traités par l'ivermectine



**Planche 3 :** Histologie du parenchyme duodénale chez le lapin traité par l'ivermectine coloration H&E

A : GrX10    B : Gr X 40

HGB: hyperplasie des glandes de Brunner, IF : infiltrat inflammatoire, D : désorganisation des villosités LI : lumière intestinale

**Histologie du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E**

**Planche 4 :** Histologie du parenchyme duodénale chez le lapin traité par l'ivermectine et supplémenté par les vitamines C et E coloration H&E

A : Gr x 10/ B : Gr x 40V : Villosités intestinales, GB : Glandes de Brunner, LI : lumière intestinale

## 2. ETUDE IMMUNOHISTOCHEMIQUE (IHC)

2.1. **IHC P53** : les planches 5, 6, 7 et 8 montrent l'expression de la protéine P53 chez les animaux témoins ; supplémentés par les vitamines C et E ; traités par l'ivermectine et traités par l'ivermectine et supplémentés en vitamines C et E.

### 2.1.1. IHC P53 duodénum des lapins témoins

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en régénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, un faible marquage de la p53 des entérocytes (cytoplasmique et du plateau strié) et des cellules inflammatoires est observé (**Planche 5**).

### 2.1.2. IHC P53 duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E.

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en régénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, un faible marquage de la p53 des entérocytes (cytoplasmique et du plateau strié) et des cellules inflammatoires est observé. (**Planche 6**).

### 2.1.3. IHC P53 duodénum des lapins traités par l'ivermectine

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en régénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, une expression cytoplasmique modérée de la p53 des cellules inflammatoires et une expression cytoplasmique légère au niveau des entérocytes (cytoplasmique et du plateau strié) est observé et une absence de immunomarquage au niveau de l'hyperplasie des glandes de Brunner (**Planche 7**).

### 2.1.4. IHC P53 du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en régénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, une expression cytoplasmique légère de la p53 des cellules inflammatoires et

une expression cytoplasmique très légère au niveau des entérocytes (cytoplasmique et du plateau strié) et est observé. **(Planche 8)**.

IHC P53 duodénum des lapins témoins

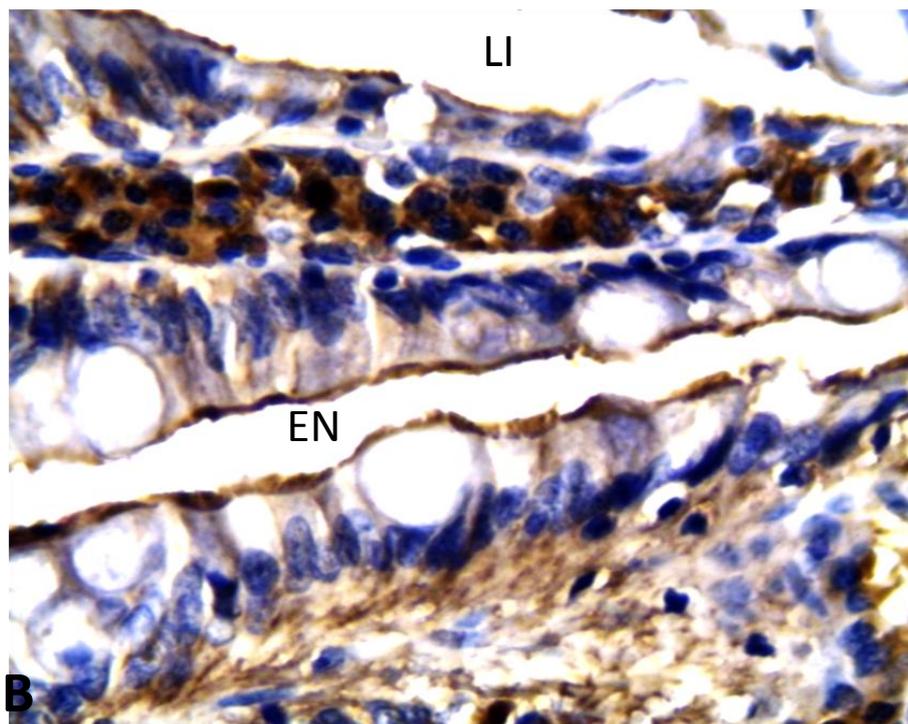
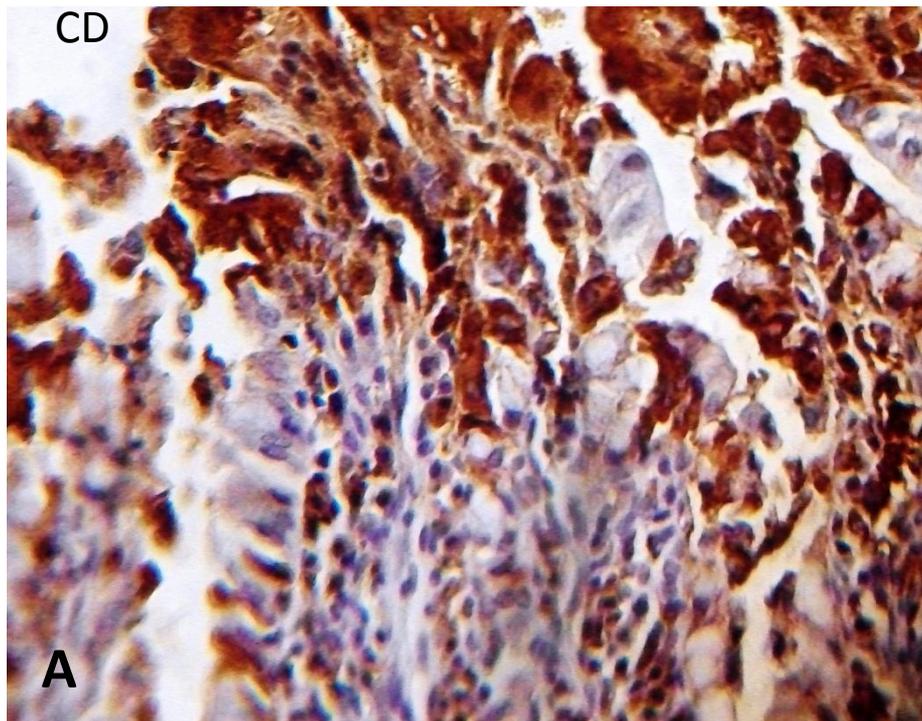


Planche 5 : IHC P53 duodénum des lapins témoins

A :Gr X 10 et B : Gr X 40

LI : Lumier intestinal , EN : entyrocyte, CD : cellules en régénérescence

IHC P53 duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E.

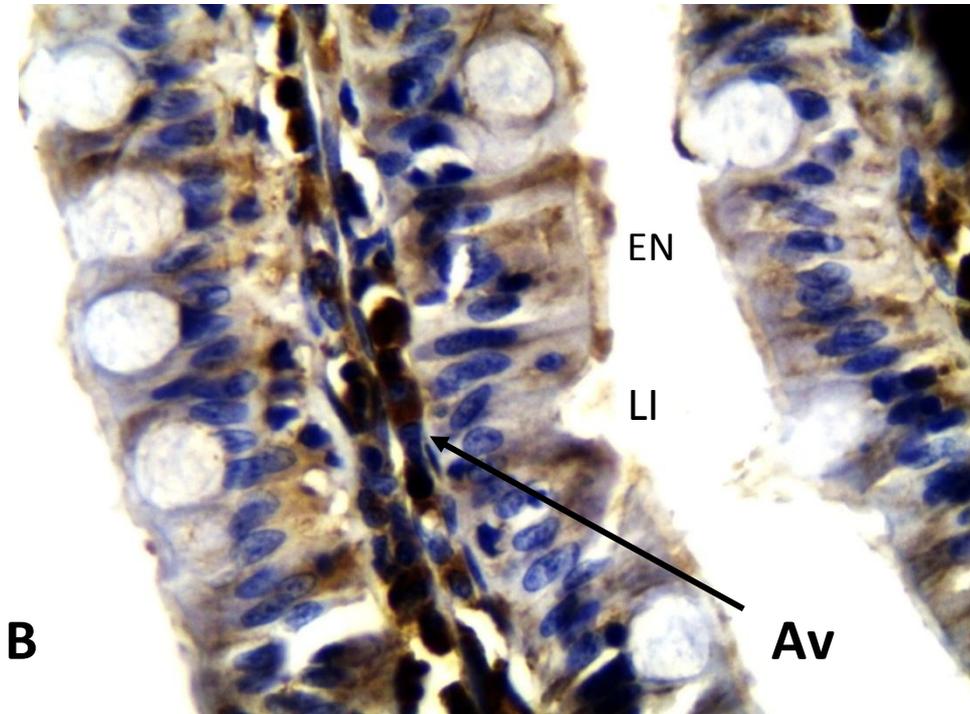
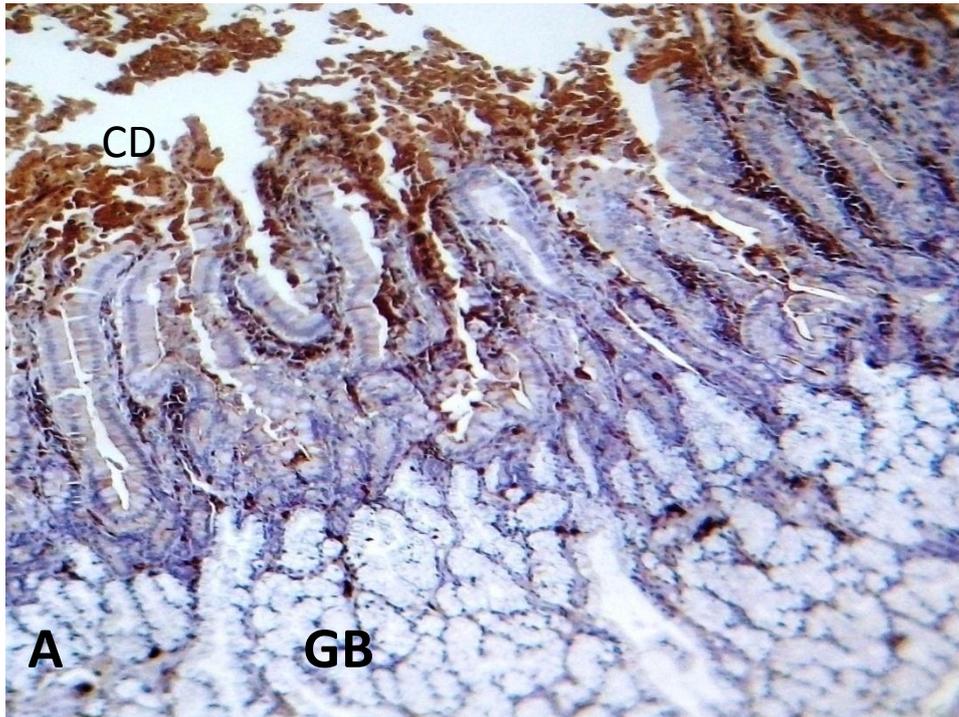
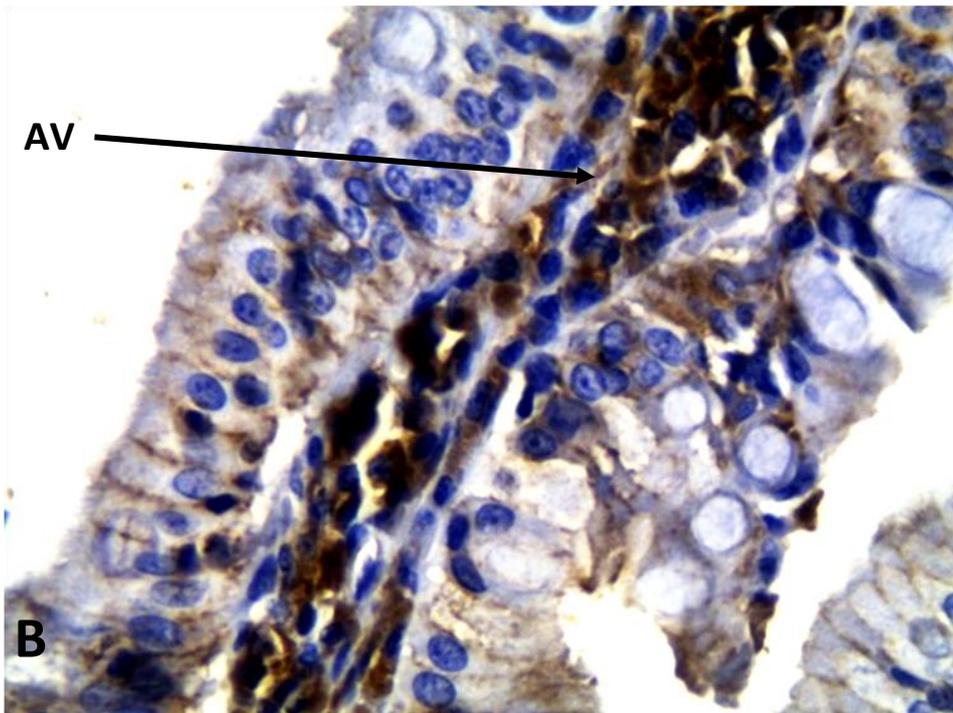
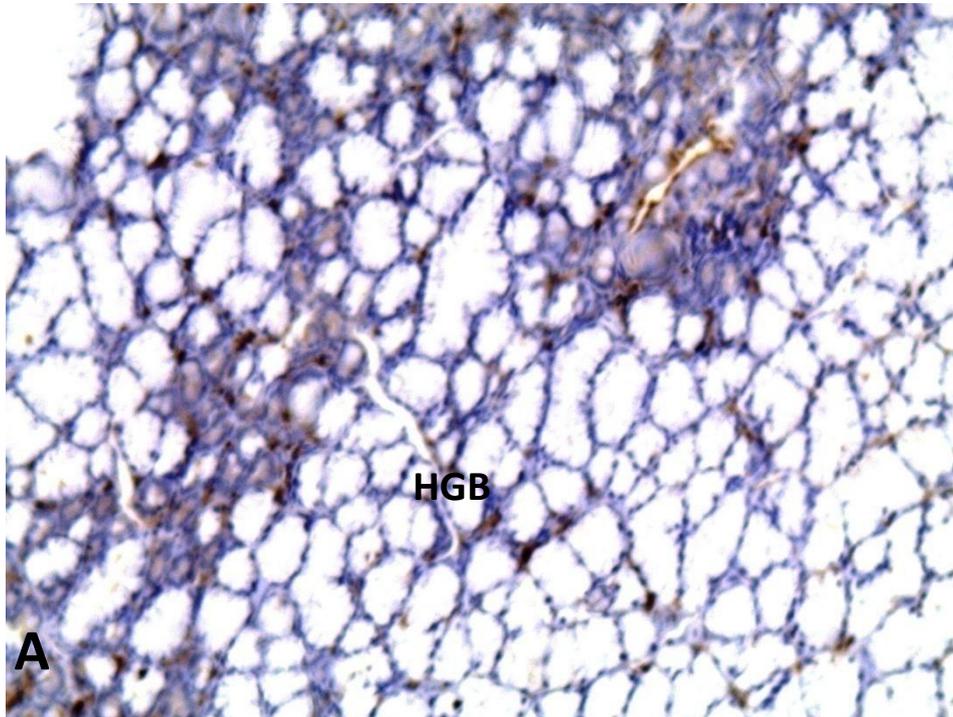


Planche 6: IHC P53 duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E.

A : Gr X 10 et B : Gr X 40

EN : entérocyte , LI : lumière intestestinale , AV : axe de villosité

**IHC P53 duodénum des lapins traités par l'ivermectine**

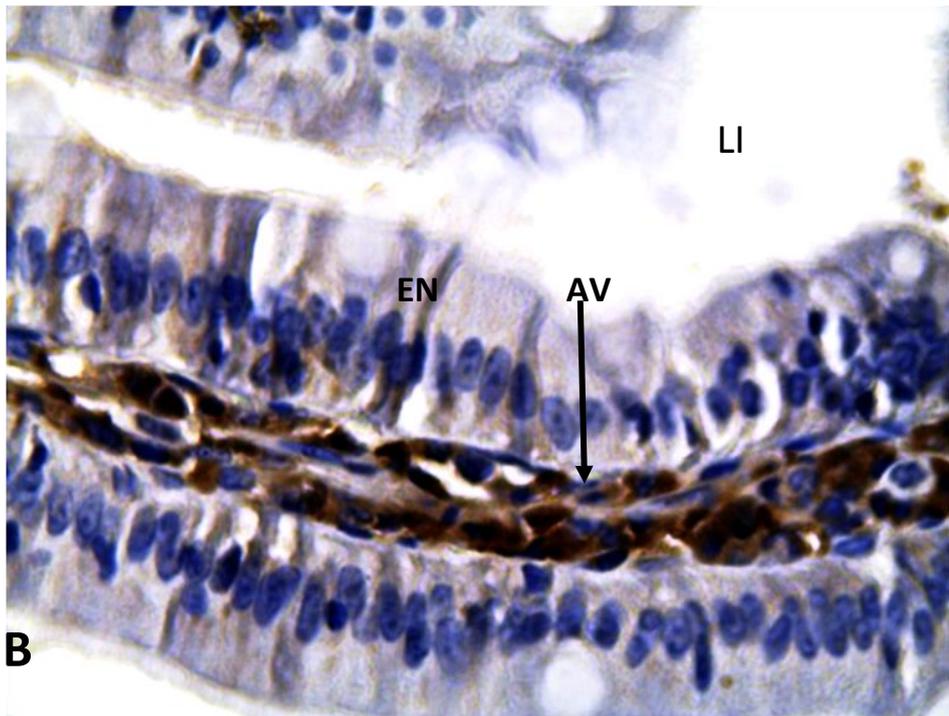
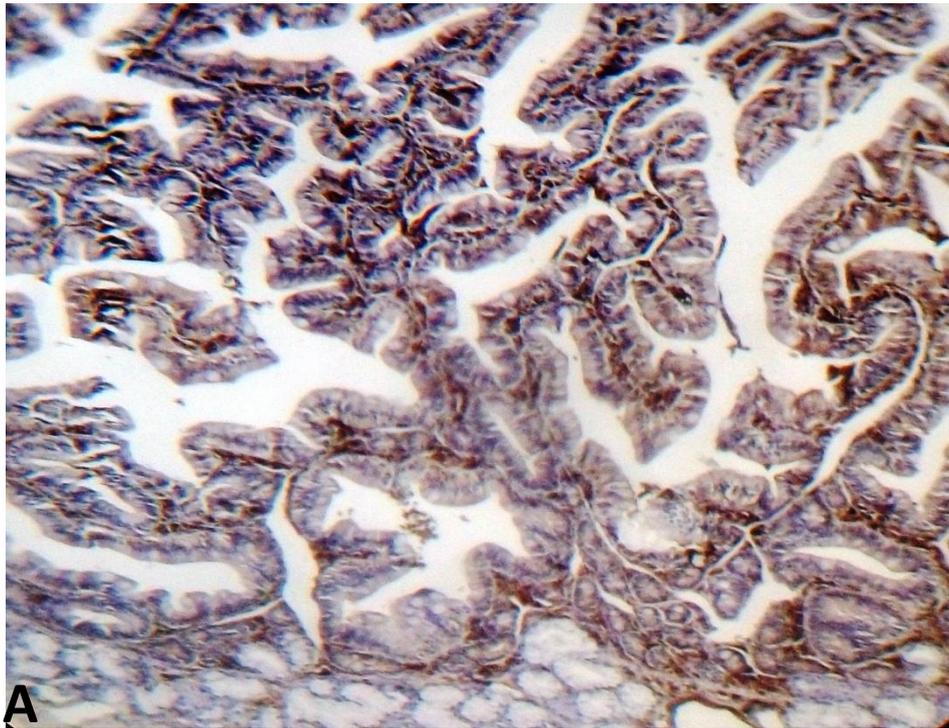


**Planche 7 : IHC P53 duodénum des lapins traités par l'ivermectine**

A :Gr X 10 et B : Gr X 40

AV : axe des villosités , HGB :hyperplasie des glandes de brunner

**IHC P53 du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.**



**Planche 8 : IHC P53 du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.**

A :Gr X 10 et B : Gr X 40

EN :entérocyte , AV : axe de villosité ,LI : lumière intestinale

### 1.1.IHC BCL2

#### 1.1.1. IHC BCL2 duodénum des lapins témoins

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en dégénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, un faible marquage de la bcl-2 des entérocytes (cytoplasmique et du plateau strié) et des cellules inflammatoires est observé (**Planche 9**).

#### 1.1.2. IHC BCL2 duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E.

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en dégénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, un faible marquage de la bcl-2 des entérocytes (cytoplasmique et du plateau strié) et des cellules inflammatoires est observé (**Planche 10**).

#### 1.1.3. IHC BCL2 duodénum des lapins traités par l'ivermectine

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en dégénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, une expression cytoplasmique modérée de la bcl-2 au niveau des cellules inflammatoires et expression cytoplasmique forte de la bcl-2 au niveau des entérocytes est observé et une absence de l'immunomarquage de bcl-2 au niveau de l'hyperplasie des glandes de brunner. (**Planche 11**).

#### 1.1.4. IHC BCL2 du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif au niveau des cellules apicales en dégénérescence. De même au niveau de l'axe conjonctif, les cellules inflammatoires plus précisément les lymphocytes sont immuno-réactives. Au fort grossissement, une expression cytoplasmique légère de la bcl-2 au niveau des cellules inflammatoires et expression cytoplasmique légère de la bcl-2 au niveau des entérocytes est observée. (**Planche 12**).

IHC BCL2 duodénum des lapins témoins

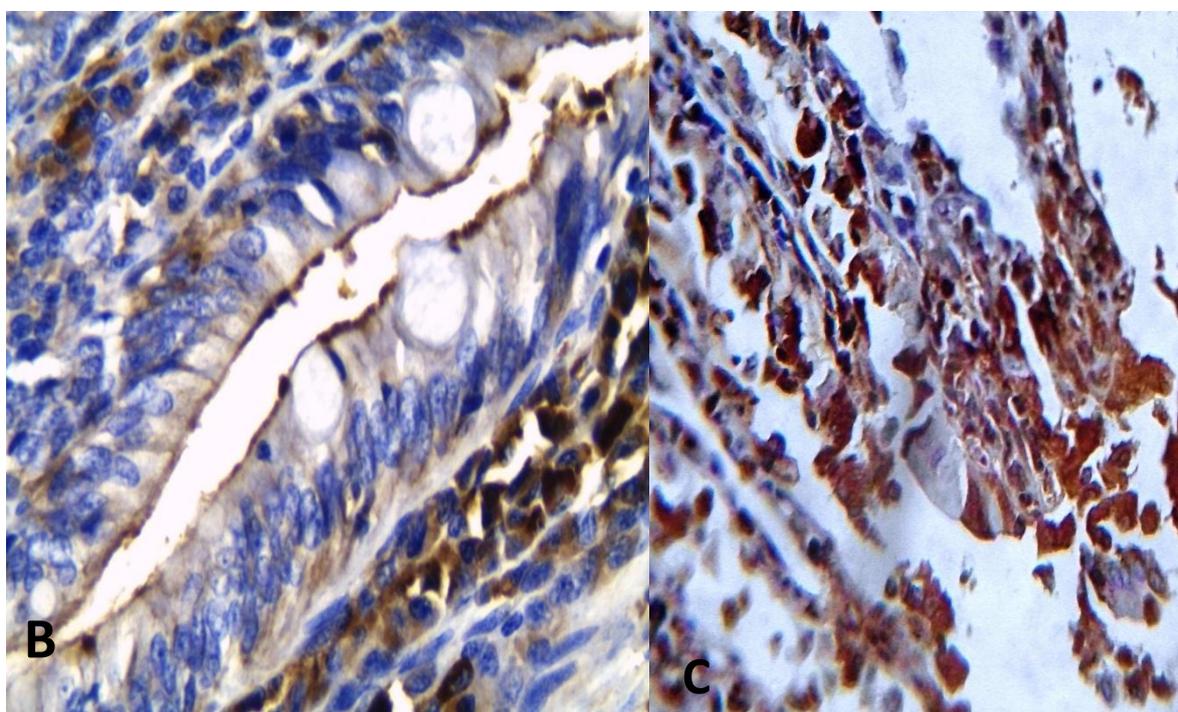
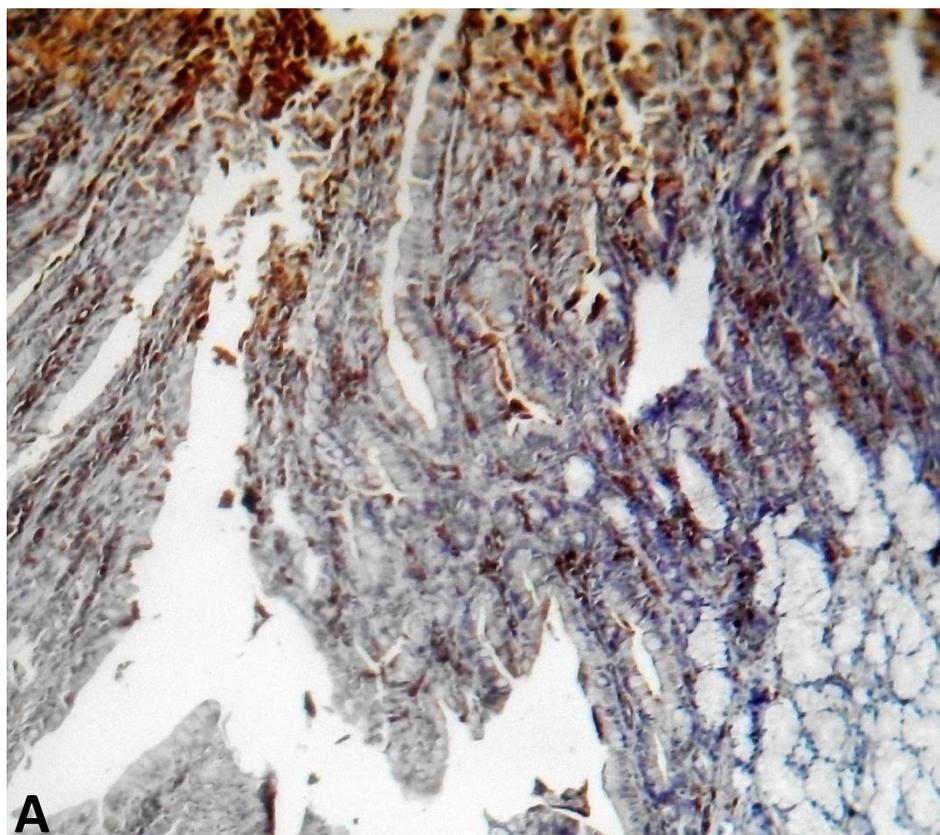
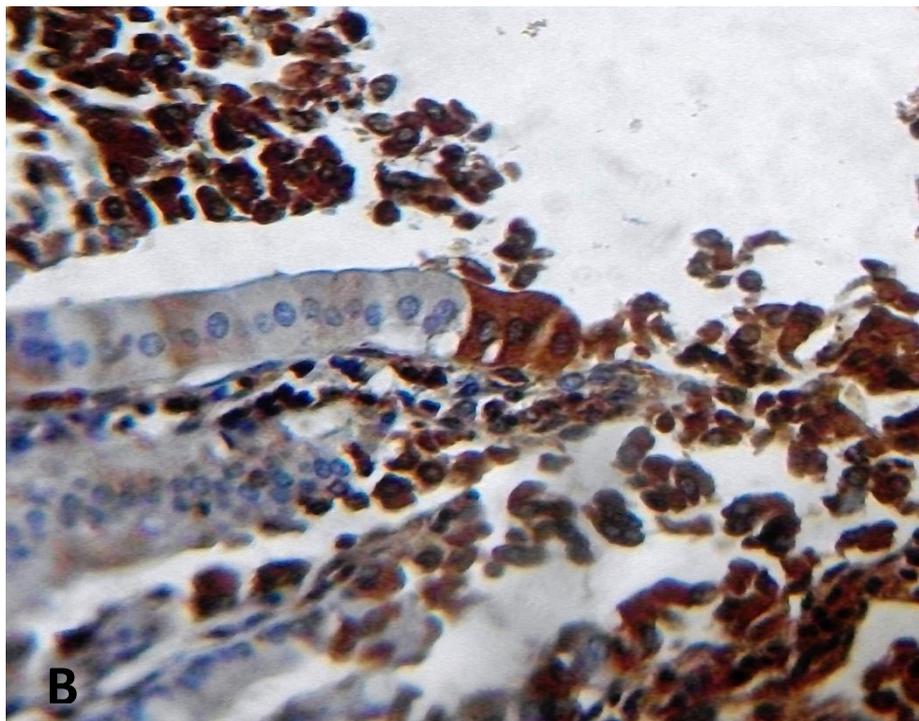
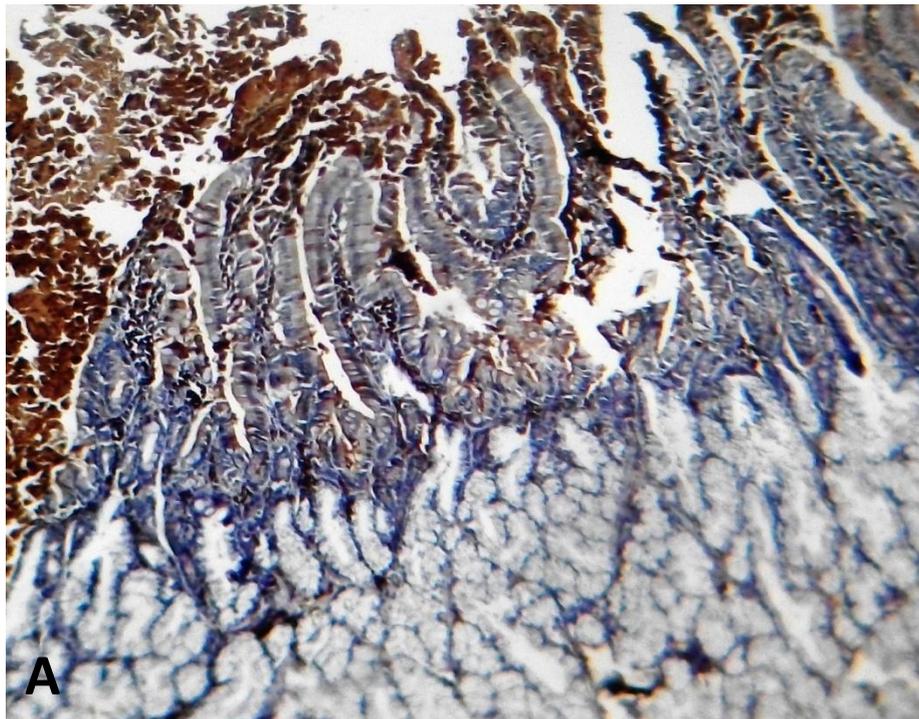


Planche 9 : IHC BCL2 duodénum des lapins témoins

A : Gr X 10 et C- B : Gr X 40

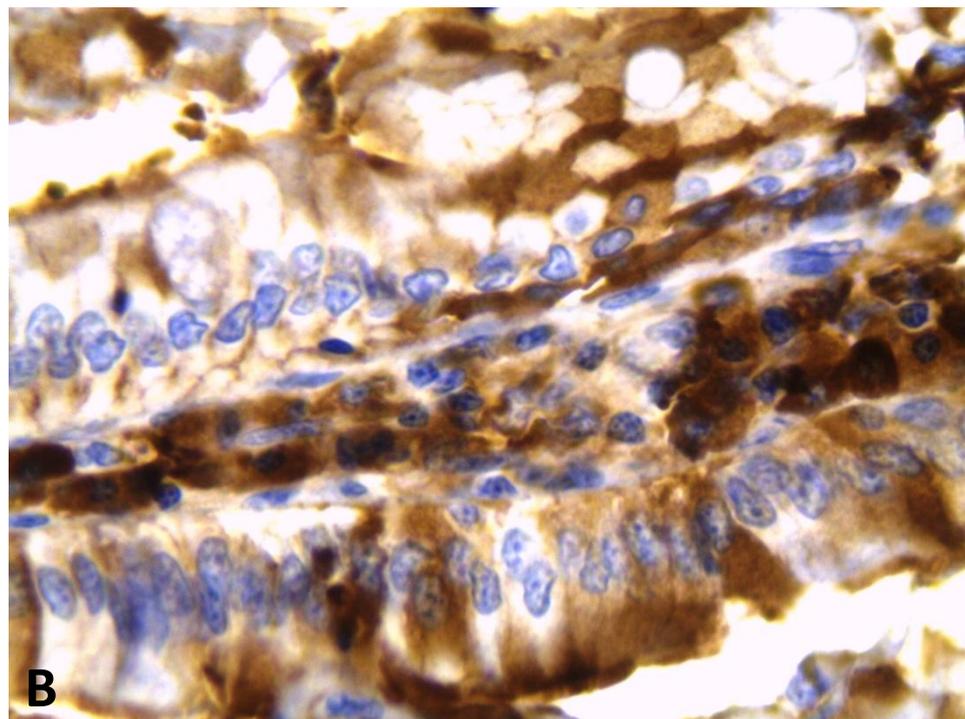
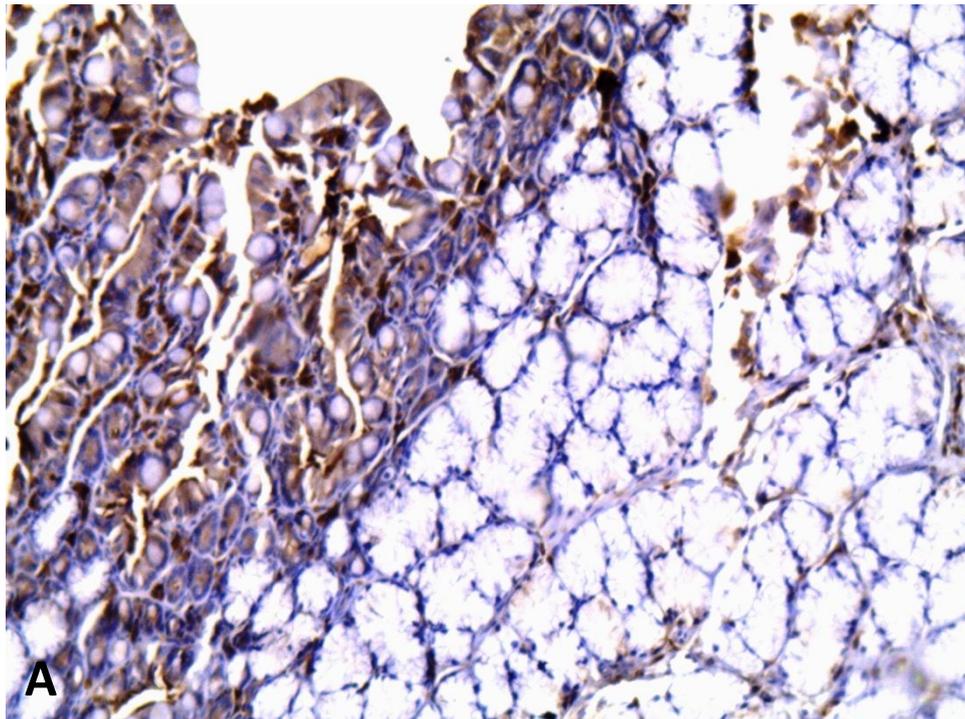
**IHC BCL2 duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E.**



**Planche 10 : IHC BCL2 duodénum des lapins supplémentés par les vitamines C et E.**

A : Gr X 10 et B : Gr X 40

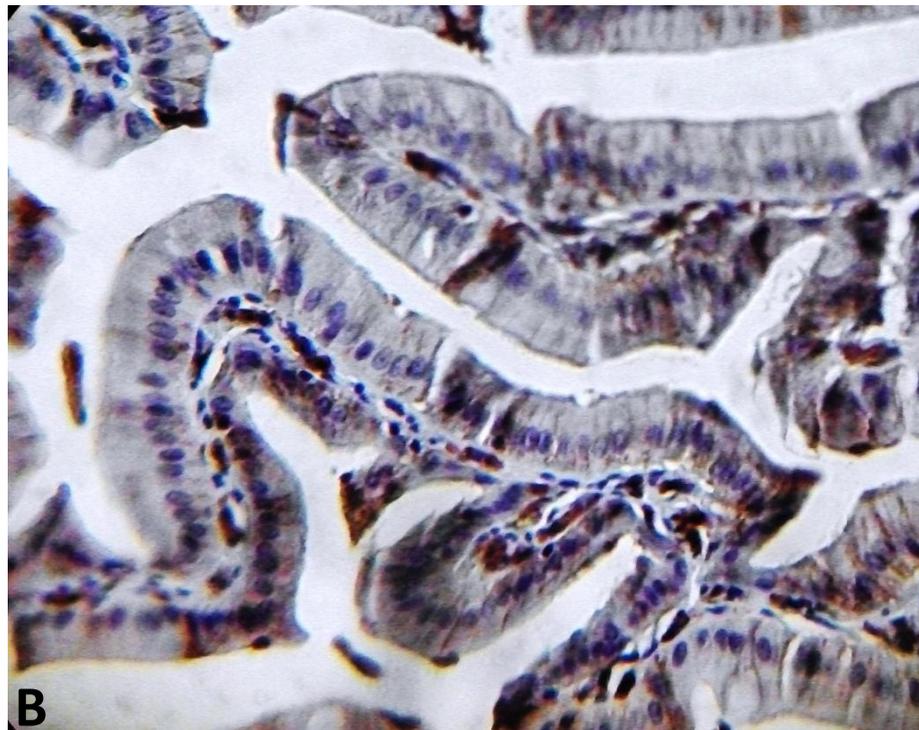
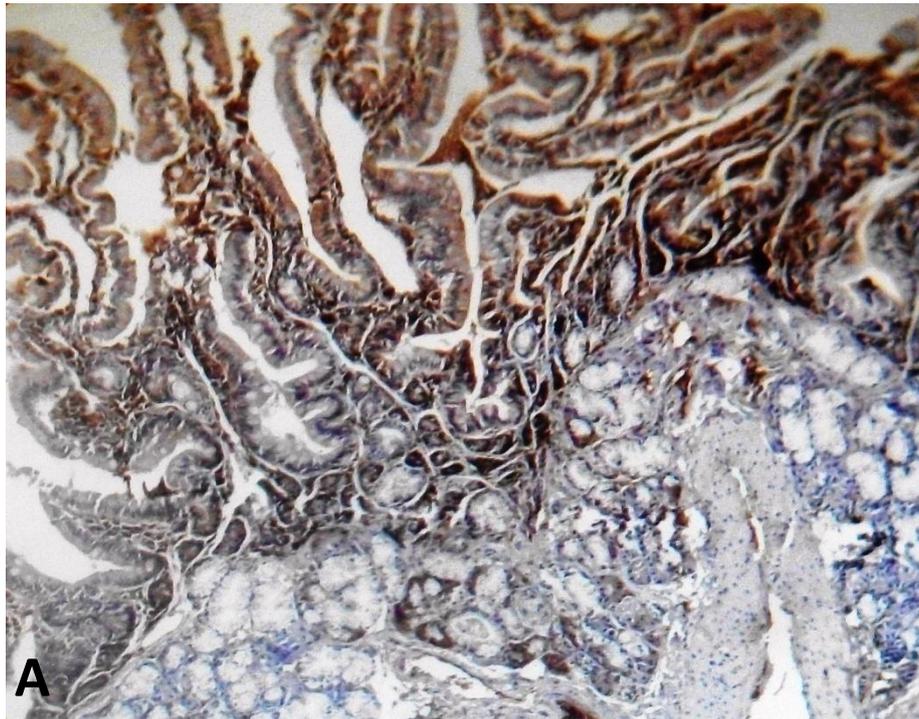
**IHC BCL2 duodénum des lapins traités par l'ivermectine**



**Planche 11 : IHC BCL2 duodénum des lapins traités par l'ivermectine**

A : Gr X 10 et B : Gr X 40

**IHC BCL2 du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.**



**Planche 12 : IHC BCL2 du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E. A : Gr X 10 et B : Gr X 40**

3. RESULTATS BIOINFORMATIQUE

3.1. Structure et mutations de la p53

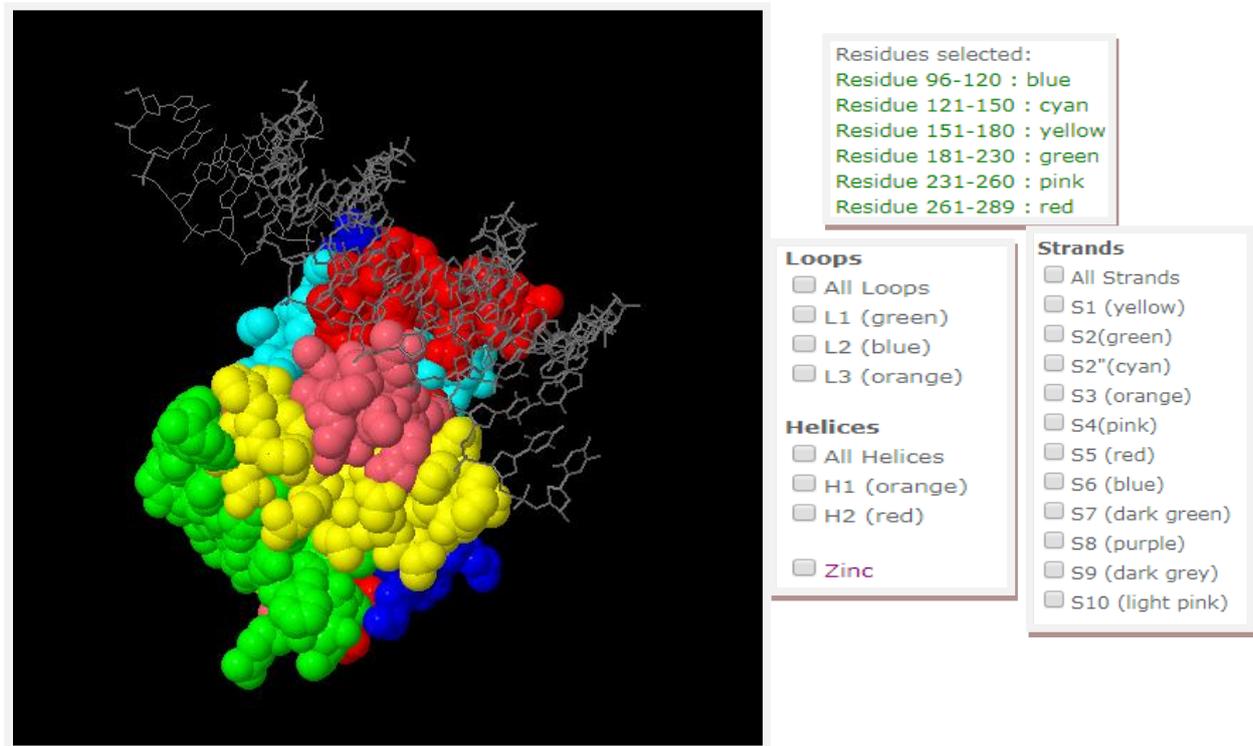


Planche13 : Liaison de la p53 a l'ADN (<http://p53.iarc.fr/MakeJMol.aspx>)

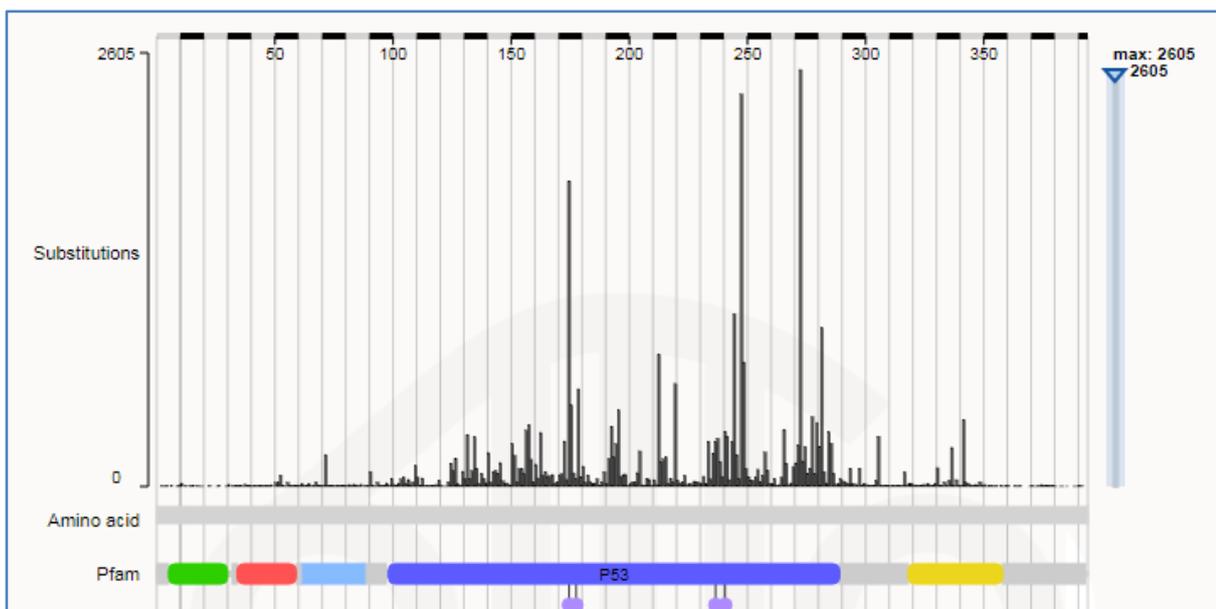


Planche 14 : Le nombre de mutation de gène p53 et les différentes domaines de gène p53.

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=TP53>

**Protein** | Cellular tumor antigen p53

**Gene** | TP53

**Organism** | *Homo sapiens (Human)*

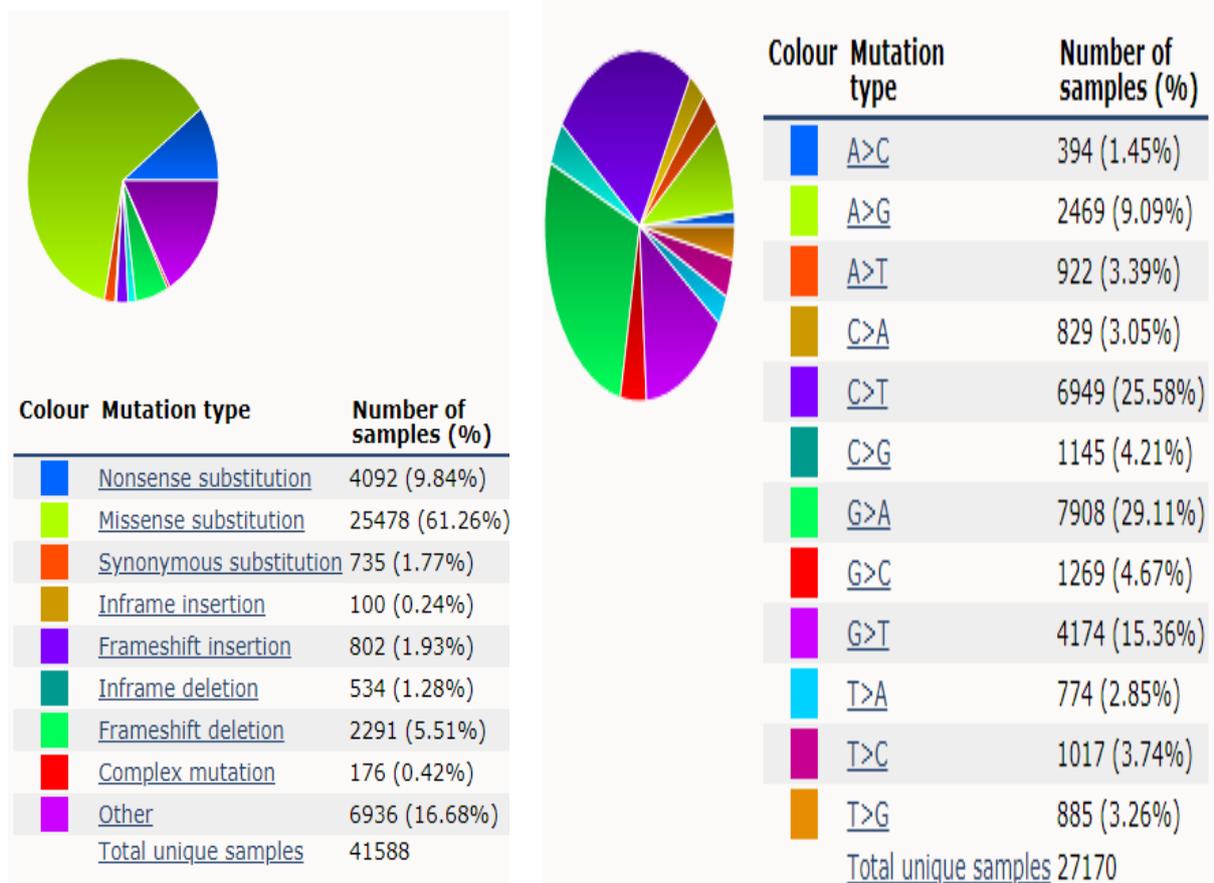
**Cofactor**<sup>i</sup>  
Zn<sup>2+</sup>  
Note: Binds 1 zinc ion per subunit.

Feature key	Position(s)	Description	Graphical view	Length
Metal binding <sup>i</sup>	176	Zinc		1
Metal binding <sup>i</sup>	179	Zinc		1
Metal binding <sup>i</sup>	238	Zinc		1
Metal binding <sup>i</sup>	242	Zinc		1

**Regions**

Feature key	Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
DNA binding <sup>i</sup>	102 - 292		Add  BLAST		191

**Planche15** : Sites de liaison au zinc



**Planche 16** : Type des mutations sur la p53.

3.2 Alignement des séquences :

3.2.1 Comparaison entre la p53 de réf et l'isoforme X1

Range 1: 22 to 412 <a href="#">Graphics</a>		▼ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
810 bits(2091)	0.0	Compositional matrix adjust.	390/391(99%)	391/391(100%)	0/391(0%)
Query 1	MEESQSDLSEPPLSQETFSDLWKLLPENLLTTSLNPPVDDLLSAEDVANWLNEDPEEG				60
Sbjct 22	MEESQSDLSEPPLSQETFSDLWKLLPENLLTTSLNPPVDDLLSAEDVANWLNEDPEEG				81
Query 61	LRVPAAPAPEAPAPAAPALAAPAPATSWPLSSVPSQKTYHGNYGFRLGFLHSGTAKSVT				120
Sbjct 82	LRVPAAPAPEAPAPAAPALAAPAPATSWPLSSVPSQKTYHGNYGFRLGFLHSGTAKSVT				141
Query 121	CTYSPCLNKLFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKKSQHMTVVRRCPHHERCS				180
Sbjct 142	CTYSPCLNKLFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKKSQHMTVVRRCPHHERCS				201
Query 181	DSDGLAPPQHLIRVEGNLRAEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMNCSSCM				240
Sbjct 202	DSDGLAPPQHLIRVEGNLRAEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMNCSSCM				261
Query 241	GGMNRRLPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEENFRKKGEPCELP PPGS				300
Sbjct 262	GGMNRRLPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEENFRKKGEPCELP PPGS				321
Query 301	SKRALPTTTTSSPQTKKKPLDGEYFILKIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAEKEPGGS				360
Sbjct 322	SKRALPTTTTSSPQTKKKPLDGEYFILKIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAEKEPGGS				381
Query 361	RAHSSYLKAKKGQSTSRHKKPMFKREGPDSD		391		
Sbjct 382	RAHSSYLKAKKGQSTSRHKKPMFKREGPDSD		412		
Range 2: 3 to 16 <a href="#">Graphics</a>		▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match			
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.1	Compositional matrix adjust.	7/14(50%)	9/14(64%)	0/14(0%)
Query 351	AQAEKEPGGSRAHS	364			
Sbjct 3	ATAQAGPGGSQEAS	16			

Planche 17: Alignement de séquence de référence p53 et l'isoforme x1

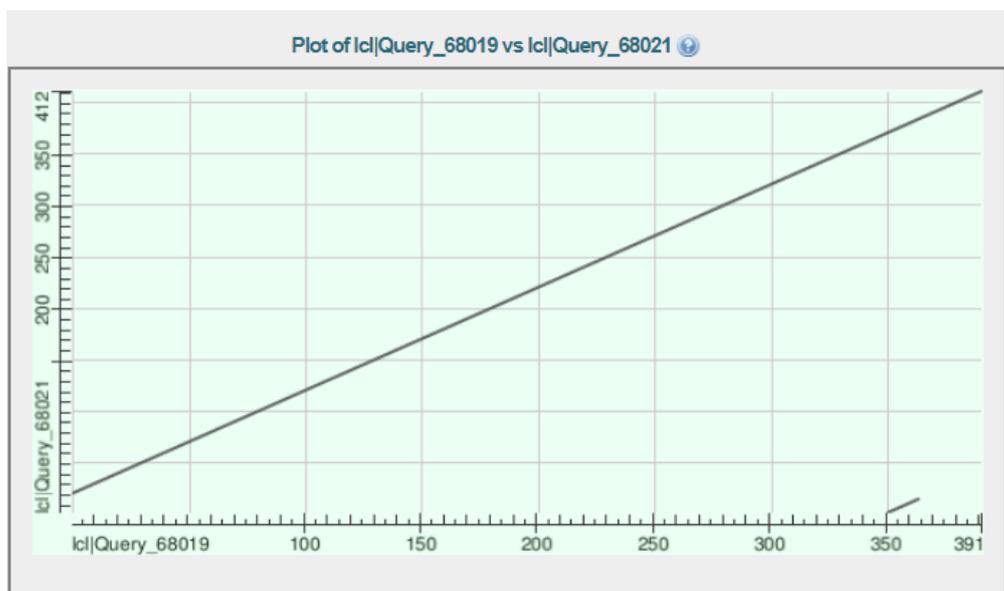


Planche 18: courbe d'alignement de sequence de reference p53 et l'isoforme x1

3.2.2 Comparaison entre la p53 de référence et l'isoforme x2

unnamed protein product  
Sequence ID: Query\_180099 Length: 412 Number of Matches: 2

Range 1: 22 to 412 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
810 bits(2091)	0.0	Compositional matrix adjust.	390/391(99%)	391/391(100%)	0/391(0%)
Query 1	MEESQSDLSLEPPLSQETFSDLWKLLENLLTTSLNPPVDDLLEADVANWLNEDPEEG				60
Sbjct 22	MEESQSDLSLEPPLSQETFSDLWKLLENLLTTSLNPPVDDLLEADVANWLNEDPEEG				81
Query 61	LRVPAAPAEAPAPAAPALAAPAPATSWPLSSSVPSQKTYHGNYGFRGLGFLHSGTAKSVT				120
Sbjct 82	LRVPAAPAEAPAPAAPALAAPAPATSWPLSSSVPSQKTYHGNYGFRGLGFLHSGTAKSVT				141
Query 121	CTYSPCLNKLFCQLAKTQCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKKSQHMTEVRRCPHHERCS				180
Sbjct 142	CTYSPCLNKLFCQLAKTQCPVQLWVDSTPPPGSRVRAMAIYKKSQHMTEVRRCPHHERCS				201
Query 181	DSDGLAPPQHLIRVEGNLRAEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDDCTTIHYNMNCSSCM				240
Sbjct 202	DSDGLAPPQHLIRVEGNLRAEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDDCTTIHYNMNCSSCM				261
Query 241	GGMNRRLPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEENFRKKGEPCELPDPPGS				300
Sbjct 262	GGMNRRLPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEENFRKKGEPCELPDPPGS				321
Query 301	SKRALPTTTTSSPQTKKKPLDGEYFILKIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAEKEPQGS				360
Sbjct 322	SKRALPTTTTSSPQTKKKPLDGEYFILKIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAEKEPQGS				381
Query 361	RAHSSYLKAKKGGQTSRHKKPMFKREGPDSD		391		
Sbjct 382	RAHSSYLKAKKGGQTSRHKKPMFKREGPDSD		412		

Range 2: 3 to 16 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
16.2 bits(30)	2.1	Compositional matrix adjust.	7/14(50%)	9/14(64%)	0/14(0%)
Query 351	AQAEKEPQGSRAHS	364			
Sbjct 3	ATAQAGPQGSQEAS	16			

Planche 19 : Aligement de la séquence p53 de référence et l'isoforme x2

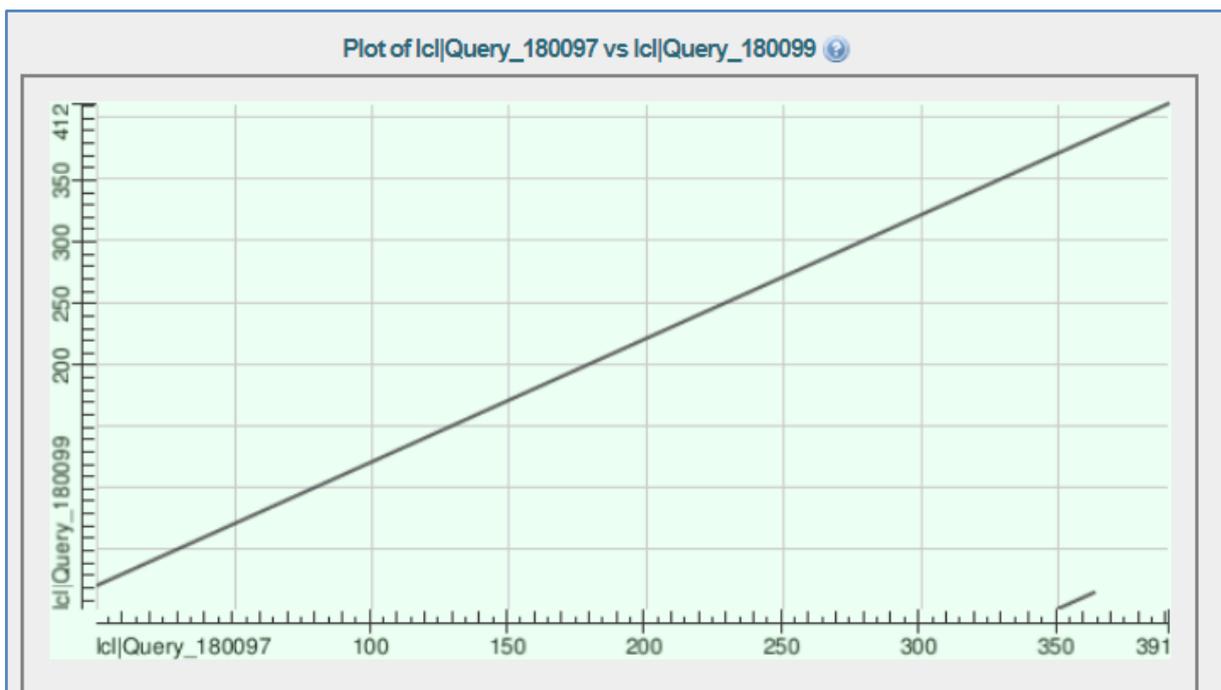


Planche 20 : courbe d'alignement de la séquence p53 de référence et l'isomère x2

3.2.3 comparaison de la séquence p53 entre les différentes espèces

<b>Identité ou Match (   ou * ou C )</b> <b>Substitution non conservative ou Mismatch ( néant )</b> <b>Substitution conservative ( + ou : ou . )</b> <b>Indel ou Gap ( - ou . )</b>					
P04637	P53_HUMAN	1	---	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTED	57
Q95330	P53_RABIT	1	---	MEESQDLSLEPPLSQETFSDLWKLLPENNLTTSLNPPVDDL-LSAEDVANWLNED	56
P02340	P53_MOUSE	1	MTAMEESQSDISLELPLSQETFSGLWKLLPPELILPSP--	HCMDL-LLLPQDVEEFFE--	55
			*** **	*:*****:***** :*: * :*: :*	
P04637	P53_HUMAN	58	PGPDEAPRMP	EAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSG	117
Q95330	P53_RABIT	57	P--	EEGLRVPAAPAPAPAPAPALAAPATSWPLSSSVPSQKTYHGNYGFRGLHSG	114
P02340	P53_MOUSE	56	-GPSEALRVSG	APAAQDPVTETPGPVAPAPATPWPLSFFVPSQKTYQGNYGFLGLQSG	114
			.*	*: * :* :*	
P04637	P53_HUMAN	118	TAKSVTCTY	SPALNKMFCQLAKTFCVQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCP	177
Q95330	P53_RABIT	115	TAKSVTCTY	SPCLNKLFCQLAKTFCVQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCP	174
P02340	P53_MOUSE	115	TAKVMCTY	SPPLNKLFCQLAKTFCVQLWVSATPPAGSRVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCP	174
			*****	***** :*****:*****:*****:*****	
P04637	P53_HUMAN	178	HHERCSDSD	DGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDLDRNTFRHSVVPVPEPVEGSDCTTIHYNM	237
Q95330	P53_RABIT	175	HHERCSDSD	DGLAPPQHLIRVEGNLRAEYLDLDRNTFRHSVVPVPEPVEGSDCTTIHYNM	234
P02340	P53_MOUSE	175	HHERCSDGD	DGLAPPQHLIRVEGNLYPEYLEDLDRNTFRHSVVPVPEPVEGSEYTTIHKYM	234
			*****	***** :*****:*****:*****:*****	
P04637	P53_HUMAN	238	CNSSCMGGM	NRRIPIITILEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRDRTEENLRKKGEPHH	297
Q95330	P53_RABIT	235	CNSSCMGGM	NRRIPIITILEDSSGNLLGRNSFEVRCACPGDRDRTEENFRKKGEPCC	294
P02340	P53_MOUSE	235	CNSSCMGGM	NRRIPIITILEDSSGNLLGRDSFEVRCACPGDRDRTEENFRKKEVLCP	294
			*****	***** :*****:*****:*****:*****	
P04637	P53_HUMAN	298	ELPPGSTKR	ALPNNT-SSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAG	356
Q95330	P53_RABIT	295	ELPPGSSKR	ALPTTTTSSSPQTKKKPLDGEYFILKIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAE	354
P02340	P53_MOUSE	295	ELPPGSAKR	ALPTCTS-ASPPQKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAHAT	353
			*****	***** :*****:*****:*****:*****	
P04637	P53_HUMAN	357	KEPGGSRAH	SSHLSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD	393
Q95330	P53_RABIT	355	KEPGGSRAH	SSYLKAKKGQSTSRHKKPMFKREGPDSD	391
P02340	P53_MOUSE	354	EESGDSRAH	SSYLKTKKGQSTSRHKKTMVKKVGPDS	390
			:*	*:*****:***** :* *****	

Planche 21 : Alignement de la séquence p53 (humain, lapin, souris).

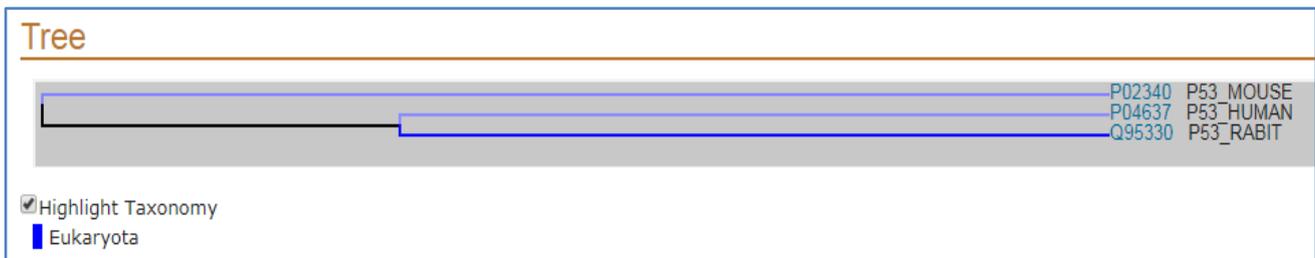


Planche 22 : Arbre phylogénétique de la p53 (humain, lapin, souris).

## 2. DISCUSSION

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés d'une part à l'étude des altérations histologiques et immunohistochimiques de la muqueuse intestinale duodénale, après un traitement par un insecticide avermectine et d'autre part l'effet amélioratif possible d'une supplémentation vitaminique antioxydant a savoir les vitamines C et E suite a une toxicité subaiguë chez le lapin male de souche locale « *Oryctolagus cunuculus* ».

Par une étude immunohistochimique de l'expression des marqueurs de prolifération cellulaire, les protéines p53 (gardien du génome) et bcl2 (protéine pro-apoptotique) nous avons prospecté l'effet de l'insecticide et la supplémentation en antioxydants (vitamines C et E) sur l'expression des deux gènes P53 et BCL2 dans le stress causé par l'insecticide. Nos résultats ont été soutenus par une étude bioinformatique de l'expression de la protéine P53.

Le choix de l'épithélium intestinal est principalement dû à sa délicate fonction d'absorber les nutriments tout en étant une ligne de défense vis-à-vis des agressions potentielles de l'environnement. Cette barrière est à la fois physique et chimique. La composante chimique est constituée principalement de molécules antimicrobiennes qui sont synthétisées essentiellement par les cellules épithéliales et qui détruisent ou inhibent la croissance des bactéries et/ou levures (**Haton, 2005**).

La composante physique est constituée de deux éléments principaux : les jonctions serrées qui empêchant la diffusion de molécules et de pathogènes, et la couche de mucus qui est fabriquée par les cellules caliciformes et par les glandes de Brunner du duodénum. Cependant, le renouvellement rapide des cellules épithéliales participe aussi au maintien physique de la barrière intestinale. De plus, l'épaisseur de la couche de mucus varie le long du tube digestif et est maximale dans l'iléon terminal et surtout le côlon permettant une plus large protection (**FDP, 2014**).

Dans notre étude nous avons remarqué que l'administration de l'ivermectine a provoquée plusieurs lésions histologiques au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse duodénale principalement un infiltrat inflammation au niveau de l'axe conjonctif des villosités intestinales; une hyperplasie des glandes du Brunner et un aplatissement de l'épithélium des villosités.

Initialement, l'observation microscopique de la muqueuse duodénale à révélé une inflammation au niveau de l'axe conjonctif des villosités de la muqueuse intestinale chez les animaux traités par l'insecticide. En effet, l'infiltration inflammatoire au niveau de l'intestin grêle à déjà été observée par plusieurs auteurs suite à une toxicité par des pesticides de la famille des

carbamates le bendiocarbe chez la souris (Apaydin et al., 2019) et le Lindane chez le poisson *Channa punctata* (Bhattacharjee et Das, 2015).

Tellemo et al., (2003) ont montré que l'inflammation au niveau l'intestin est principalement due a sa richesse en cellules lymphocytaires, cellules de Paneth, les neutrophiles, les macrophages les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes.

Plusieurs études expérimentales ont montrées que l'exposition aux pesticides peut avoir des effets néfastes sur le système immunitaire car les cellules immunocompétentes secrètent des médiateurs inflammatoire telle que des cytokines, des chimiokines et des espèces réactive de l'oxygène (ROS) et des espèces réactive de l'azote (Gangemi et al., 2016). Nos résultats sont en accord avec ceux de Vismaya et Rajini, (2014) qui ont montrés que chez le rat traité par un insecticide organochloré le Monocrotophos un dysfonctionnement de l'intestin grêle avec hyperplasie des cellules caliciformes est observé.

Donc, les pesticides génèrent des espèces réactives oxygénées et/ou azotées (ROS / RNS) qui affecte le niveaux d'antioxydant dans les cellules et provoque un épuisement des antioxydants et la production de ROS / RNS cette condition peut conduit à une inflammation des organes cibles (Astiz et al., 2012).

La vitamine E est un antioxydant liposoluble elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine C est un antioxydant, hydrosoluble, se trouve dans les cytosols et les fluides extracellulaires ; elle réduire le radical  $\alpha$ - tocophérol et permet une meilleure efficacité de la vitamine E. Les vitamines E et C semblent être les plus puissant et importants antioxydants dans la lutte contre le stress oxydant (Lobo et al., 2010).

Ceci permet d'expliquer nos résultats histologiques chez les lapins traités par l'insecticide et Co supplémenté par les vitamines C et E ou l'inflammation n'a pas intéressée l'ensemble des animaux.

Encore que, l'étude immunohistochimique a révélé un immunomarquage cytoplasmique et/ou nucléaire positive de l'expression des protéines P53 et BCL2 aussi bien chez les témoins que chez les animaux traités. Ce résultat peut-être expliqué par le faite qu'au niveau intestinal, il existe une activation des lymphocytes T de manière basale, même en l'absence d'infection. Cette activation est en grande partie sous la dépendance de bactéries du microbiote intestinal et jouerait un rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale (FPD, 2014).

La protéine P53 est responsable du contrôle du cycle cellulaire, en inhibant la prolifération permettant l'arrêt du cycle cellulaire ou apoptose. Elle favorise le processus de réparation des structures cellulaires endommagées, comme l'ADN. L'épithélium intestinal a une capacité permanente de renouvellement par anoikis est remplacé tous les 4 à 5 jours chez l'homme (**Zouiten-Mekki et al., 2013**).

L'anoikis c'est une apoptose induite par le détachement cellulaire de la matrice extracellulaire (**Cabion et al., 2013**). L'absence de contact avec la MEC ou l'engagement dans une MEC inappropriée conduit à l'activation d'anoikis à partir de récepteurs de mort (voie extrinsèque impliquant la P53 et la BCL2) et de mitochondries (voie intrinsèque) (**paoli et al., 2013**). L'impact de ces deux voies apoptotiques peut être renforcé lorsqu'elles convergent vers Bid, qui est une cible de la protéine p53 (**Haupt et al., 2003**) ceci peut-être expliqué par l'expression cytoplasmique légère de la P53 dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle chez les lapins témoins chez les Co-supplémenté avec la vitamine C et E.

Au niveau intestinal, la capacité de l'épithélium à maintenir un équilibre entre prolifération, apoptose et différenciation est en partie due au dialogue entre l'épithélium et son environnement. Plusieurs facteurs de transcription maintenant l'état de prolifération des cryptes ont été mis en évidence par leur rôle oncogénique (**Schonhoff et al., 2004**). Ce qui permet d'expliquer l'IHC positive chez les animaux témoins des deux protéines P53 et BCL2 au niveau apical des villosités intestinales qui témoigne la régénération des entérocytes par anoikis.

Les principales fonctions des glandes des Brunner est de fournir une protection à la première partie du duodénum des dommages causés par l'acidité du chyme gastrique (**kume et al., 2009**). Nos résultats histologiques révèlent une hyperplasie des glandes de Brunner qui serait probablement due à une stimulation chronique des sécrétions acides de l'estomac ou une diminution de la fonction exocrine du pancréas (**Shruthi et al., 2018**).

(**Noda et al., 2001**), supposent que l'hyperplasie et l'hypertrophie de l'intestin grêle observées chez des rats diabétiques induits expérimentalement sont dues à la suppression de l'apoptose. Notre observation microscopique révèle une IHC positive de la P53 chez les lapins traités par l'insecticide. (**Sen et al., 2001**) attribuent l'hyperplasie de la muqueuse intestinale à l'hyperphagie et à la régulation positive de la prolifération cellulaire et à l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose. Ces interprétations expliquent clairement l'absence de l'immunomarquage par la P53 et BCL2 des glandes de Brunner.

De plus, plusieurs auteurs ont montré que la Co administration des vitamines C et/ou E, chez les rats intoxiqué par des avermectines, permet de réduire les altérations tissulaires (hépatique, rénal, testiculaire...etc.) (Magdy et al., 2016 ; Khaldoun Oularbi et al., 2017).

Dans notre étude nous avons remarqué que l'administration de l'ivermectine a provoqué une surexpression cytoplasmique de la P53 dans les cellules inflammatoires et épithéliales. Ceci pourrait être expliqué par les dommages de l'ADN causé par les radicaux libres suite à l'administration de l'insecticide. Des résultats similaires ont été reportés par (Astiz et al., 2012) dans leur synthèse sur l'effet moléculaire des pesticides.

Nous avons remarqué aussi que la Co-administration des vitamines C et E a diminué l'expression cytoplasmique de la P53 probablement suite à une réduction de l'accumulation des radicaux libres.

L'étude bioinformatique consiste à construire un arbre phylogénétique de gène P53 entre les différentes espèces et d'aligner la séquence de P53 humain et de lapin pour trouver les différents isoforme.

Cette étude de gène P53 a montré que Les différentes mutations de la protéine P 53 recensées sur les différentes bases de données nous montre son implication dans l'apparition des différents cancers .

le domaine centrale de gène p53 ou le domaine de liaison a l'ADN est le plus touché par les mutation, les 3 codon les plus muté sont le codon 175 ou on trouve 1907 mutations., 248 on trouve 2451 mutations , 273 on trouve 2605 mutations ( planche 14 ) , ainsi , selon la( planche 16 ) , qui présentes les différents mutation qui peuvent touche le gène p53 , nos résultats montre que les mutations faux sens sont les plus retrouvés dans les différent mutation ( 61, 26 % ) , cependant la substitution des nucléotides G par A (29,11% ) , C par T ( 25,58 % ) G par T (15,36% ) sont les plus présents au sein des différents base de données ce qui confirme que les îlots CpG sont les points le plus muté au niveau de l'ADN ,ainsi ,on a trouvé qu'il Ya 2568 substitutions pour lesquelles les changements nucléotidiques sont inconnus .

L'étude structurale de la protéine p53 dans UNIPROT montre que l'activation de la p53 exige la liaison au **zinc** qui est un cofacteur, à la position 176, 179, 238, 242 ainsi que le domaine centrale de l'ADN à une longueur de 192 résidus.

L'alignements de la séquence p53 de référence et l'isoforme x1 et l'isoforme x2 chez le lapin montre une cassure de 13 Pb entre les 2 séquences. Ainsi que, l'arbre phylogénétique de la séquence p53 chez l'humain, le lapin et la souris montre qu'il ya plus de similarité entre la séquence humain et lapin que chez les souris.

---

CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVE.

## CONCLUSION

L'exposition chronique aux pesticides peut avoir un impact sur la santé humaine et animal et provoqué un stress oxydatif par la génération des radicaux libre. Cependant, l'administration de molécules antioxydantes permet de renforcé les enzymes de détoxification cellulaires pour éliminé ces radicaux libres. A travers cette étude, nous avons montré les effets toxiques de l'ivermectine ainsi que l'effet protecteur d'une supplémentation vitaminique (acide ascorbique et alpha-tocophérol) sur l'histologie du duodénum des lapins.

A la lumière de nos résultats, on constate que l'ivermectine entraîne une perte de l'organisation structurale de la paroi duodénale, des lésions au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse duodénale particulièrement un infiltrat inflammatoire au niveau de l'axe conjonctif des villosités intestinales; une hyperplasie des glandes de Brunner et un aplatissement de l'épithélium des villosités.

Nous avons également remarqués que la supplémentation en vitamines C et E a restaurée les lésions en réorganisant le parenchyme duodéal avec réduction de l'inflammation et absence de l'hyperplasie. Cependant malgré l'hyperplasie observée chez les animaux traités par l'ivermectine les cellules des glandes de Brunner ne montrent aucune immunoréactivité ni par la P53 ni la bcl-2.

Les données histopathologique et immunohistochimique confirment la toxicité et la génotoxicité de l'ivermectine. En conclusion les vitamines C et E possèdent des propriétés thérapeutique qui peuvent empêcher les effets néfastes provoqué par l'ivermectine.

Nous avons identifiés à travers notre étude bioinformatique les différents mutations qui peuvent toucher le gène p53 et d'après l'alignement des séquences nous avons constaté une casseur au niveau de l'ADN entre la séquence de références et les deux isoformes chez le lapin.

En perspectives il serait intéressant :

- D'utilisé d'autres anticorps comme la KI67, les caspases en immunohistochimie pour confirmé la prolifération des glandes de Brunner.
- Etudier la génotoxicité causé par ce xénobiotiques par d'autres méthodes plus performantes de biologie moléculaire méthode (western blot, southern blot) et la méthode de micronoyau pour pouvoir confirmé des cibles thérapeutiques
- Réaliser une étude bioinformatique de la Bcl-2.

---

# REFERENCES

# BIBLIOGRAPHIQU

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **FPD. (2014). LES FONDAMENTAUX DE LA PATHOLOGIE DIGESTIVE. Chapitre 2. Microbiote et immunité intestinale. © CDU-HGE / Editions Elsevier-Masson.**
2. **Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009).** Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12.
3. **Albagli, O. (2015).** Protéger et sévir : p53, métabolisme et suppression tumorale. *Médecine/sciences*, 31(10), 869–880.
4. **Almasiova, V., Lukacinova, A., Holovska, K., Cigankova, V., Nistiar, F. (2012).** Effect of life time low dose exposure to cadmium on lipid metabolism of Wistar rats. *J microb Biotech Food*, 2, 293–303.
5. **André, J.M., Poirier, J. (2003).** cours d'histologie , l'appareil digestif , PCEM2, service d'histologie –embryologie université paris –VI pierre et Marie curie , faculté de médecine pitié – Salpêtrière ; 86p.
6. **Andreu, P., Perret, C., & Romagnolo, B. (2006).** Wnt et cellules souches intestinales : des liaisons dangereuses. *Médecine/sciences*, 22(8-9), 693–695.
7. **APAYDIN, F.G., BAS, H., KALENDER, S., ADIGUZEL, C., KALENDER, Y. (2019).** Histopathological Effect of Bendiocarb on Small Intestine Tissues of Rats: Role of Vitamins C and E. *Journal of Science*, 32(2), 402-407.
8. **Arrighi, N. (2018).** les cellules souches des innovations thérapeutiques sous contrôle. Britain.
9. **Astiz, M., Alaniz, M., & Marra, A. (2012).** The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. *Neurochemistry International*, 61(7), 1231–1241.
10. **BALBINOT, C. (2017).** Fonction et mode d'action du gène homéotique intestinal Cdx2 dans les cancers de l'intestin. Thèse de doctorat, université de Strasbourg, Strasbourg.
11. **Barboza, A., Geng, L., Zhenlin, J., Adel, K., El-Naggar, et Guillermina, L. (2006).** P21 Delays Tumor Onset by Preservation of Chromosomal Stability . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 198, 42-47.
12. **Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, L. (2005).** Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 538, 117–127.
13. **Benedetti, D., Lopes Alderete, B., de Souza, C. T., Ferraz Dias, J., Niekraszewicz, L., Cappetta, M., Da Silva, J. (2017).** DNA damage and epigenetic alteration in soybean farmers exposed to complex mixture of pesticides. *Mutagenesis*, 33(1), 87–95.
14. **Bennefont-rousset, D., Therond, P., et Delatte, J. (2003).** Radicaux libre et antioxydants .*medicine science*, 59-81.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

15. **BENZIANE, D. (2014).** Effet d'un régime enrichi en chlorpyrifos chez le rat wistar: étude de l'activité enzymatique des cholinestérases comme indicateur biologique. Thèse de master, université Telemansane, 51.
16. **Bhattacharjee, D., & Das, S. (2015).** Intestinal Histopathology as a Biomarker for Lindane Toxicity in Teleost Fish, *Channa punctata*. *G.J.B.A.H.S*, 4(3), 16-18.
17. **Bilim, V., K. Yuuki, T., Itoi, A., Muto, T., Kato, A., Nagaoka, T., Motoyama, et Tomita. (2008).** Double Inhibition of XIAP and Bcl-2 Axis Is Beneficial for Retrieving Sensitivity of Renal Cell Cancer to Apoptosis . *British Journal of Cancer*, 98(5), 941-49.
18. **Bourgeois, C. (2003).** Les vitamines dans l'industrie agroalimentaire, Lavoisier Paris.
19. **Buettner, G. (1993).** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, 300, 535–43.
20. **Cabon, L., Martinez-Torres, C., & Susin, S. A. (2013).** La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Médecine/sciences*, 29(12), 1117–1124.
21. **CAIRNS, T., SHERMA, J. (1996).** Emerging strategies for pesticides analysis. CRC press, Boca Raton. Florida-USA, 754, 125-135.
22. **Camille, M., Mireille, S. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27, 405-12.
23. **Catala, M., André, M., Katsanis, G., Poirier, J. (2007-2008).** cours d'histologie , organes, systèmes et appareils, PCEM2, service d'histologie –embryologie université paris –VI pierre et Marie curie , faculté de médecine pitié –Salpêtrière, 26p.
24. **Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K., John, P. J., & Sharma, P. (2013).** Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28(4), 314–328.
25. **Chepda, T., Perier, C., Chamson, A., & Frey, J. (1999).** Effets pro- et antioxydants de l'ascorbate. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 13(2), 115–120.
26. **Cherin, P., Voronska, E., Fraoucene, N., & Jaeger, C. (2012).** Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme. *Médecine & Longévité*, 4(2), 68–74.
27. **CLAVET, R., BARRIUSO, E., BEDOS, C., BENOIT P., CHARNAY, P., COQUET Y. (2005).** Les pesticides dans le sol conséquences agronomiques et environnementales. France Agricole, Paris. 625 p.
28. **Coujard, R. Poirier, J. Racadot, J. (1980).** précis d'histologie humaine. Paris.
29. **Crosnier, C., Stamataki, D., & Lewis, J. (2006).** Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics*, 7(5), 349–359.
30. **Czyzowska, Agata. (2016).** « Vitamin C ». In Reference Module in Food Science, Elsevier.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

31. **Dardel , F. Képès, F.(2002).** Bioinformatique: génomique et post-génomique. Editions Ecole Polytechnique, 254.
32. **Delattre, J., Bonnefont-Rousselot, D., Bordas-Fonfrede, M., Jaudon, C. (1999).** Diabète sucré et stress oxydant. *Ann Biol Clin*, 57, 437-44.
33. **Delteil, L. Bréchet, C. Fournier, E. Leborgne, M. (2012).** Nutrition et alimentation des animaux d'élevage. Dijon.
34. **Deng, Q., Xiao, L., Liu, Y., Zhang, L., Deng, Z., & Zhao, C. (2019).** Streptomyces avermitilis industrial strain as cell factory for Ivermectin B1a production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 4(1), 34–39
35. **DERAI EL-HADJELA. (2016).** Effet de la combinaison de la vitamine C et la vitamine E sur le métabolisme et la distribution du zinc chez des rats diabétiques sous un régime alimentaire pauvre en zinc.these de l'université d'annaba .
36. **Délage , G . Gouy , M.(2013).** Bioinformatique: Cours et cas pratique. Dunod, 207.
37. **Dharancy, S. (2006).** La vitamine E. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 30(4), 559.
38. **DHOUHA, B., AHLEM, L., SANA, B., SAADIA, R. (2017).** Unexpected cause for duodenal obstruction: Brunner's gland hyperplasia. *PATHOLOGICA*, 109, 414-417.
39. **Djellouli, F. (2013).** Aspect qualitatif et quantitatif des lipoprotéines sériques chez les agriculteurs utilisant les pesticides. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en biologie.
40. **Dourmishev, A., Dourmishev, L., & Schwartz, A. (2005).** Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. *International Journal of Dermatology*, 44(12), 981–988.
41. **Dridi, W., Kada, K., Macoura, G., Josée, L., Marc, B., Raouf, F., et Régen, D. (2006 ).** Activité dominante négative des protéines p53 mutées . *médecine/sciences*, 22(3), 301-7.
42. **El-Demerdash, F., Dewer, Y., ElMazoudy, H., & Attia, A. (2013).** Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6), 897–901.
43. **FAURIE, C. FERRA, C. MEDORI, P. DEVAUX, J. HEMPTINNE, L. (2003).** Ecologie approche scientifique et pratique. Ed. Lavoisier, Paris, 407 p.
44. **Fetoui, H., Makni, M., Mouldi Garoui, E., & Zeghal, N. (2010).** Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6), 593–599.
45. **Figuroa, M., Rodrigo, et Selva Rivas, A. (2015).** Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain . *Frontiers in Physiology* 6 (décembre).
46. **Fioramonti, J. (2014).** Etapes clé du devenir des aliments dans le tube digestif. *Innovations Agronomiques*, 36, 1-13.
47. **Fromont, A. Tanguy, M. (2001).** l'élevage de lapins. Dijon.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

48. **Gamet-Payrastre, L. (2011).** Effets physiopathologiques des mélanges de pesticides. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 46(2), 82–85.
49. **Gangemi, S., Gofita, E., Costa, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Nikitovic, D., Fenga, C. (2016).** Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). International Journal of Molecular Medicine, 38(4), 1012–1020.
50. **Gidenne, T. et Lebas, F. (2005).** Le comportement alimentaire du lapin. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole, 29-30, 183-196.
51. **Gilles, R. Anctil, M. Baguet, F. Charmantier, G. Péqueux, A. Plumier, J-C. Sébert, P. (2006).** physiologie Animal. Paris.
52. **GRANDJEAN D. (2005).** Le stress oxydatif cellulaire, conséquences pathologiques chez le chien, Le nouveau praticien vétérinaire, 106, 22 – 24.
53. **Guilland JC, Herbeth B, Le Moel G (2007).** Les vitamines. Biologie Médicale, 38 : 17-80.
54. **Guilland, C. (2011).** Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition. Oléagineux, Corps Gras, Lipides, 18(2), 59–67.
55. **Hallez, R. (2016).** Métabolisme et cycle cellulaire, deux processus interconnectés chez les bactéries. Médecine/sciences, 32(10), 843–848.
56. **Haton C. (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat, Université Paris VI, Paris.
57. **Haupt, S. (2003).** Apoptosis - the p53 network. Journal of Cell Science, 116(20), 4077–4085.
58. **Homologs. (2009).** Multiple Bcl-, et Not Bax Or Bak. Cell Biology.
59. **Itaba, S., Iwasa, T., Sadamoto, Y., Nasu, T., Misawa, T., & Nakamura, K. (2006).** An unusual duodenal polyp: pedunculated Brunner's glands hyperplasia. Gastrointestinal Endoscopy, 63(7), 1070–1071.
60. **Jane, E., Wayne, H.F., Jim, I. (2000).** Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes, Diabetes Care, 23,733-738.
61. **Kaminsky, S. (2003).** THE SMALL INTESTINE AS A XENOBIOTIC-METABOLIZING ORGAN. Drug Metabolism and Disposition, 31(12), 1520–1525.
62. **Karnak, David., et Liang, X. (2010).** Chemosensitization of Prostate Cancer by Modulating Bcl-2 Family Proteins . Current Drug Targets, 11(6), 699-707.
63. **Kelly, N., Strasser, A. (2011).** The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. Cell Death and Differentiation, 18(9), 1414-24.
64. **Khaldoun Oularbi, H. (2014).** Biochemical and histopathological changes in the kidney and adrenal gland of rats following repeated exposure to lambda-cyhalothrin. Journal of Xenobiotics, 4(1), 8-13.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

65. **Khaldoun Oularbi, H., Richeval, C., Lebaili, N., Zerrouki-Daoudi, N., Baha, M., Djennas, N., Allorge, D. (2017).** Ameliorative effect of vitamin C against hepatotoxicity induced by emamectin benzoate in rats. *Human and Experimental Toxicology*, 36(7), 709–717.
66. **Khaldoun-Oularbi, H., Richeval, C., Djenas, N., Lhermitte, M., Humbert, L., Baz, A. (2013).** Effect of sub-acute exposure to abamectin “insecticide” on liver rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Xenobiotics*, 25(2), 63-70.
67. **Kierszenbaum, L. (2006).** histologie et biologie cellulaire : une introduction à l’anatomie pathologique. Paris.
68. **Kume, K., Yamasaki, M., Narita, R., & Yoshikawa, I. (2009).** A case of Brunner’s gland hyperplasia with features of duodenal cancer. *Gastroenterology Insights*, 1(1), 8.
69. **Lagarrigue, S., Blanchet, É., Annicotte, S., et Fajas, L. (2011).** Le double jeu des régulateurs du cycle cellulaire. *Médecine/sciences*, 27(5), 508–513.
70. **Lebas, F., Tinel, B., Loupiac, B. (1984).** Survey of commercial rabbit feeds. Relations between components. *Cuniculture*, 8(5), 240-244.
71. **Lebas, F. (2006).** physiologie digestive et comportement alimentaire chez le lapin, 45.
72. **Lebas, F. (2000).** Vitamins in rabbit nutrition Literature review and recommandations. *World Rabbit Science*, 8, 185-92.
73. **Leblanc, V., Pierre, M. (2002).** Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l’ADN. *MEDECINE/SCIENCES*, 18, 577-84.
74. **Leu, J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M., George, D. (2004).** Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol*, 6, 443–450.
75. **Li, Y., Qin, Y., Liu, S., Xing, R., Yu, H., Li, K., & Li, P. (2016).** Preparation, Characterization, and Insecticidal Activity of Avermectin-Grafted-Carboxymethyl Chitosan. *BioMed Research International*, 2016, 1–8.
76. **Li, Y., Qin, Y., Liu, S., Xing, R., Yu, H., Li, K., & Li, P. (2016).** Preparation, Characterization, and Insecticidal Activity of Avermectin-Grafted-Carboxymethyl Chitosan. *BioMed Research International*, 2016, 1–8.
77. **Limbach, S., et J.-C. Guillard. (2007).** « Vitamines ». In *Traité de nutrition artificielle de l’adulte*, 127–143. Paris: Springer Paris.
78. **Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health /*Pharmacogn*, 4 (8), 118-126.
79. **LOPEZ, B., GOMEZ, S., REY, M., CANCHO G., SIMAL, J. (2005).** Détermination of carbonates and organophosphorus pesticides by SDME-GC in natural water, analytical and bionanalytical chemistry. 383, (4), 557-561.
80. **Lüllmann-Rauch, R. (2008).** Histologie. Paris.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

81. Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Gu, W. (2001). Negative Control of p53 by Sir2 $\alpha$  Promotes Cell Survival under Stress. *Cell*, 107(2), 137–148.
82. Lykkesfeldt, J., Alexander, J., Michels, B. (2014). Vitamin C, *Advances in Nutrition*, 5, 1, 16–18.
83. Magdy, B. W., Mohamed, F. E., Amin, A. S., & Rana, S. S. (2016). Ameliorative effect of antioxidants (vitamins C and E) against abamectin toxicity in liver, kidney and testis of male albino rats. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 77, 69–82.
84. Male, D. Brostoff, J. Roth, D.B. Roitt, I. (2007). *Immunologia*. Spania.
85. Martignon, M. (2010). Conséquences d'un contrôle de l'ingestion sur la physiopathologie digestive et le comportement alimentaire du lapin en croissance. Thèse de doctorat, université de Toulouse, Toulouse.
86. Ménard, O. et Dupont, D. (2014). Atouts et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'in vitro à l'in vivo. *Innovations Agronomiques*, 36, 27-41.
87. Moll, M. Oleksi, R. (2003). the MDM2-p53 interaction. *molecular cancer research*, 1(14), 1001.
88. Noah, T., Donahue, B., and Shroyer, N. (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res*, 317, 2702–2710.
89. Noda, T., Iwakiri, R., Fujimoto, K., Yoshida, T., Utsumi, H., Sakata, H., Hisatomi, A., Aw, T. (2001). Suppression of apoptosis is responsible for increased thickness of intestinal mucosa in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*, 50 (3), 259–264.
90. Oren, M. et V. Rotter. (1999) .Introduction: P53 – the First Twenty Years. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLSn*, 55, 1: 9-11.
91. Ouellette, A. (2004). Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18(2), 405-19.
92. Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3481–3498.
93. Pitterna, T., Cassayre, J., Hüter, O. F., Jung, P. M. J., Maienfisch, P., Kessabi, F. M., Tobler, H. (2009). New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4085–4095.
94. Pommier, Y. et Kohn, K. W. (2003). Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine/sciences*, 19(2), 173–186.
95. Rajasekharan, S. K., Lee, J.H., Ravichandran, V., Kim, J.-C., Park, J. G., & Lee, J. (2019). Nematicidal and insecticidal activities of halogenated indoles. *Scientific Reports*, 9(1).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

96. **Reed, J. C. (2008).** Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, 111(7), 3322–3330.
97. **Robert, J. (2011).** Signalisation cellulaire et cancer : un manuel pour les étudiants et les oncologues. Paris.
98. **Saxena, R. and Garg, P. (2010).** Vitamin E provides protection against in vitro oxidative stress due to pesticide (Chlorpyrifos and Endosulfan) in goat RBC. *GERF Bulletin of Biosciences*, 1(1), 1-6.
99. **Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M., & Leiter, A. B. (2004).** Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. *Endocrinology*, 145(6), 2639–2644.
100. **Sen, S., Roy, M., & Chakraborti, A. S. (2011).** Ameliorative effects of glycyrrhizin on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(2), 287–296.
101. **Shruthi, K.V., Rajesh, S., Akmal, A., Reshma, S. (2018)** . Brunner’s gland hyperplasia: a rare case report; 5(1) ,333-335.
102. **Siddique, S., Syed, Q., Adnan, A., & Ashraf Qureshi, F. (2014).** Isolation, Characterization and Selection of Avermectin-Producing *Streptomyces avermitilis* Strains From Soil Samples. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(6).
103. **Soussi, Thierry. (2000).** Gènes et cancers. John Libbey Eurotext.
104. **Steinbach, T. J., & Kane, J. D. (2012).** Brunner’s Gland Hyperplasia in the Sand Rat (*Psammomys obesus*). *Veterinary Pathology*, 50(4), 709–714.
105. **Takimoto, R., et El-Deiry. (2000).** Wild-Type P53 Transactivates the KILLER/DR5 Gene through an Intronic Sequence-Specific DNA-Binding Site. *Oncogene*, 19 ,14, 1735.
106. **Toledo, F., Bluteau, O., & Simeonova, I. (2007).** Réactivation de p53 dans les tumeurs : une stratégie antitumorale prometteuse. *Médecine/sciences*, 23(6-7), 565–567.
107. **Tortora, G. J. Derrickson, B. (2018).** Anatomie et physiologie. Paris.
108. **Vismaya, & Rajini, P. S. (2014).** Oral exposure to the organophosphorus insecticide, Monocrotophos induces intestinal dysfunction in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 71, 236–243.
109. **Wang, M., Quinn, P.J. (1999).** vitamine E and its function in membrane. *Progress in lipid reaserch*, 38(4) ,309-36.
110. **Zhang, L., Rana, I., Shaffer, M., Taioli, E., & Sheppard, L. (2019).** “Exposure to Glyphosate-Based Herbicides and Risk for Non-Hodgkin Lymphoma: A Meta-Analysis and Supporting Evidence,” *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, In Press.
111. **Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., Filali, A. (2013).** Rôle de la cellule épithéliale dans l’homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l’intestin. *Médecine/sciences*, 29(12), 1145–1150.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

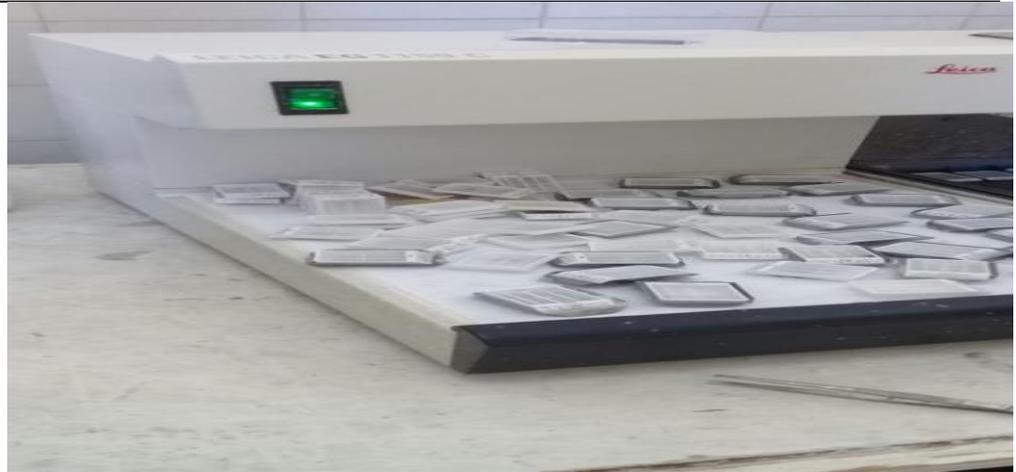
- 112. Mailleux, A. A., Overholtzer, M., & Brugge, J. S. (2008).** L'entose, mort cellulaire par cannibalisme entre cellules tumorales. *Médecine/sciences*, 24(3), 246–248.
- 113. Cabon, L., Martinez-Torres, A.-C., & Susin, S. A. (2013).** La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Médecine/sciences*, 29(12), 1117–1124.
- 114. Taddei, M., Giannoni, E., Fiaschi, T., & Chiarugi, P. (2011).** Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*, 226(2), 380–393.
- 115. Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., & Winton, D. J. (2005).** Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine paneth cell longevity in the murine small intestine. *Developmental Dynamics*, 233(4), 1332–1336.

Annexe I

Matériels	Images
<p>-L'histokinette Leica TP1020: automate de fixation et d'imprégnation.</p>	 <p>A photograph of a Leica TP1020 automatic processor. It is a white, cylindrical machine with a control panel on the front featuring several buttons and a small digital display. On top of the machine, there are several glass jars containing liquids of different colors (yellow, green, and clear), which are used for the fixation and impregnation steps of tissue processing.</p>
<p>-Distributeur de paraffine Leica.</p>	 <p>A photograph of a Leica EG 1150 H paraffin distributor. The machine is white with a control panel on top that includes a digital display showing '11:54' and several buttons. Below the control panel, there is a large tray where numerous small, rectangular paraffin blocks are being distributed. The machine is used to precisely dispense paraffin for embedding tissue sections.</p>
<p>-pince -les moules</p>	 <p>Two photographs showing laboratory tools. The left image shows a pair of long, thin metal tweezers resting on a wooden surface. The right image shows several rectangular metal molds of different sizes, which are used for embedding tissue sections in paraffin.</p>

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Refroidisseur de paraffine



-Cassettes en paraffine .

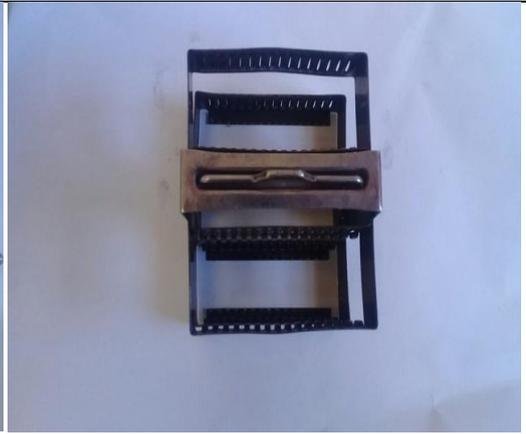


-Microtome Leica RM2235



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

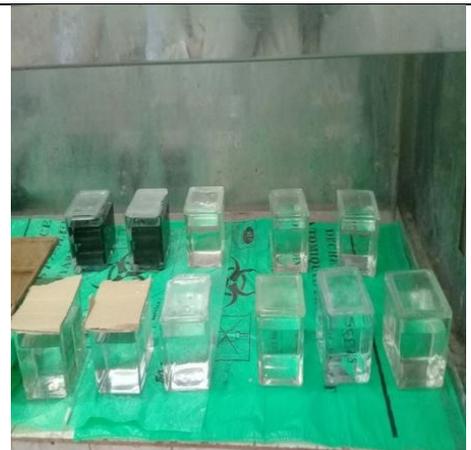
- diamant spéciale  
pour  
l'identification des  
lames  
-Panier pour les  
lames



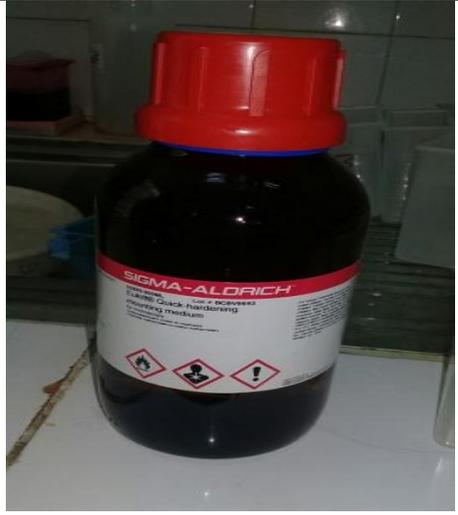
-étuve  
-lames colorées  
-lamelles



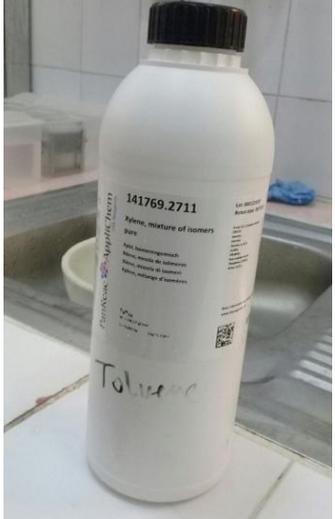
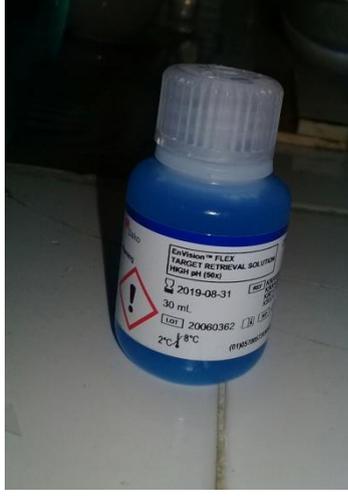
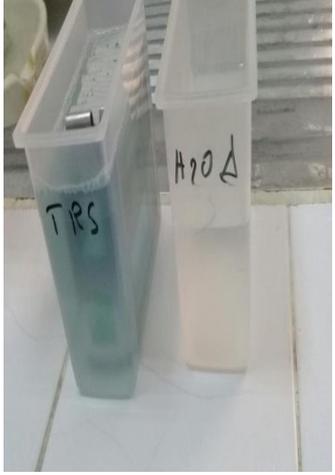
Eau distillée  
-Bec à alcool et a  
xylène



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

<p>-Hématoxyline Eosine -Eukitt</p>		
---	---	--

### Annexe II : matériels utilisé pour l'étude immunohistochemique

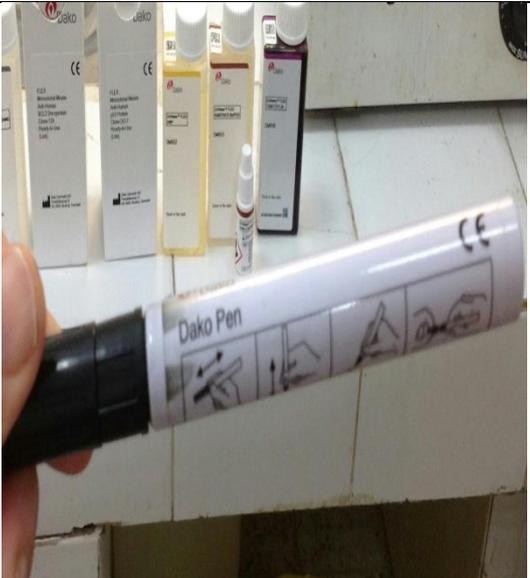
Matériel et réactifs	image		
<p>-Bec à alcool et à xylène. -xylène</p>			
<p>la solution de démasquage (TRS) (diluée à 1/10 dans l'eau distillée).  -Eau distillée</p>			

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Bain marie



-TBS  
(tampon de lavage)  
-Da kopéne



-AC anti P53 :  
monoclonal  
mouse anti  
human P53  
Protein clone  
DO-7

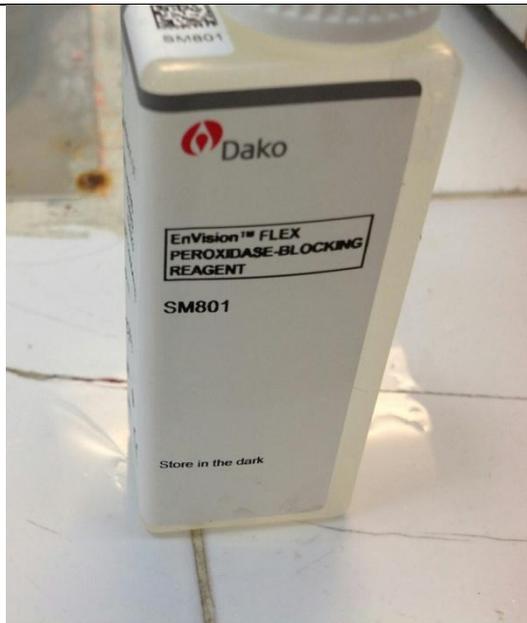


- AC anti Bcl-2  
: monoclonal  
mouse anti  
human Bcl-2  
Oncoprotein  
clone 124



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-peroxidase-  
BLOCKING  
REAGENT  
-Substrat  
Buffer  
-DAB  
chromogène



-HRP rabbit/  
mouse.  
-  
Hématoxylin  
e

