

REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université BLIDA

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 de
MASTER en Sciences de la Nature et de la Vie
Option : Génétique
Thème

**Evaluation de l'expression de la E-cadhérine
au niveau de l'Iléon du lapin traité par un
insecticide et coadministré par les vitamines C
et E. Etude immunohistochimique de l'Iléon et
bioinformatique de la E-cadhérine**

Date de soutenance : 27/09/2020

Présenté par
Kasri fatma zohra & Larbi chérifa

Devant le jury :

Mme CHABANE D.	UB1	MAA	Présidente
Mme AMOKRANE A.	UB1	MAA	Examinatrice
Mme KHALDOUN H.	UB1	MCA	Promotrice
Mme ABDUL-HUSSEIN A.	UB1	MCA	Co-promotrice

2019 - 2020

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre gratitude avant tout à Dieu qui nous a donné la force, le courage et la volonté d'élaborer ce travail.

Nous tenons à remercier énormément notre promotrice et la directrice de ce mémoire Mme «**KHALDOUN H.** » pour la confiance qu'elle nous a accordée en acceptant d'encadrer ce travail et pour l'aide qu'elle a fournie et pour sa disponibilité tout le long du travail et la qualité de ses conseils.

Nous tenons à remercier notre co-promotrice Mme «**ABDUL HUSSEIN A.** » pour l'aide qu'elle a fournie et les connaissances qu'elle a su nous transmettre.

Nous tenons à remercier les membres du jury Mme **AMOKRANE A.** et Mme **CHABANE D.** d'avoir accepté de consacrer leur temps pour juger notre modeste travail.

Nous tenons à remercier tous les employés du CHU de KOLEA plus précisément les employés du laboratoire anatomopathologie, à leur tête Mme AMINA, qui nous a accepté et accueilli aimablement, ainsi que Mme BENDRADJI et MME WAHYOUN de nous avoir donné toutes les techniques nécessaires, et surtout pour la mise à notre disposition de tous le matériel nécessaires pour le bon déroulement de ce travail.

Nous tenons à remercier également le docteur AKLI et surtout le docteur AMROUSSI pour l'aide et pour le suivi ininterrompu de ce projet, ainsi que leur disponibilité et patience, et pour leur bonne humeur et encouragements.

Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos profonds remerciements et nos profondes reconnaissances aux responsables et au personnel de l'Université BLIDA1, à leur tête M^r **MOHAMED SAID**, pour la qualité de leur enseignement, et le savoir transmis tout au long de notre parcours universitaire.

Enfin, Nous tenons à exprimer nos remerciements et notre très grande considération à toutes personnes qui nous ont aidés pour réaliser ce travail.

Dédicace

On dédie ce modeste travail:

A nos parents, qui se sont sacrifiés sans compter pour que leurs enfants puissent réussir dans leur vie, ne négligeant ni les conseils ni les encouragements... on vous remercie profondément pour votre amour sans limites et votre soutien inconditionnel pendant toutes ces années,

A nos grands parents et nos chers frères et sœurs, Vous êtes notre force et notre motivation. A nos amies, avec qui on a partagé des moments de joie et de peine. Merci pour tout.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet amélioratif des vitamines C et E suite à une toxicité par un insecticide avermectine sur l'iléon des lapins mâles *Oryctolagus cuniculus*. Pour cela vingt lapins mâles ont été répartis en quatre lots : témoin (T), traité par les vitamines C et E (CE), traité par l'ivermectine (AV), traité par l'ivermectine et coadministré par les vitamines C et E (AV+CE). Une étude histopathologique et immunohistochimique (expression de la protéine E-cadhérine) du parenchyme iléonal ainsi qu'une étude bioinformatique du gène CDH1 par des logiciels d'analyse du génome NCBI et COSMIC ont été réalisés. L'observation microscopique du parenchyme iléonal des lapins traités par l'ivermectine 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 plaques de Peyer et un aplatissement de l'épithélium avec une désorganisation des villosités ainsi qu'une inflammation au niveau de l'axe de la villosité et dans la sous muqueuse. Cependant, l'examen immunohistochimique montre un immunomarquage membranaire et cytoplasmique modérée positive de l'expression de la protéine E-cadhérine chez les animaux témoins et coadministrés (AV + CE) au niveau des cellules inflammatoires et des cellules des villosités en anoikis. Bien qu'une expression cytoplasmique importante de la protéine E-cadhérine ait été constatée chez le lot traité par AV en comparaison avec les autres lots, l'hyperplasie observée chez les lapins traités par l'ivermectine les cellules des plaques de Peyer ne montrent aucune immunoréactivité par la E-cadhérine chez les quatre lots d'animaux. L'étude bioinformatique montre que les codons 244, 487 ; 832 situés dans le gène CDH1 de la protéine E-cadhérine sont les trois points chauds de mutation impliquant des modifications dans la séquence protéique provoquant ainsi l'apparition de nombreux cancers. La supplémentation par les vitamines C et E a permis de restaurer les lésions iléonales provoquées par l'ivermectine chez les lapins mâles.

Mots clés : Ivermectine, Vitamines C et E, Iléon, Histologie, Immunohistochimie, E-cadhérine, bioinformatique.

Abstract

The objective of this work is to evaluate the ameliorative effect of vitamins C and E following toxicity by an insecticide avermectin on the ileum of male rabbits *Oryctolagus cuniculus*. For this, twenty male rabbits were divided into four batches: control (T), treated with vitamins C and E (EC), treated with avermectin (AV), treated with avermectin and co-administered with vitamins C and E (AV + CE). A histopathological and immunohistochemical study (expression of the E-cadherin protein) of the ileonal parenchyma as well as a bioinformatic study of the CDH1 gene by NCBI and COSMIC genome analysis software were performed. Microscopic observation of the ileal parenchyma of rabbits treated with avermectin in comparison with the other three batches reveals lesions, namely an inflammatory infiltrate at the level of the connective axis of the intestinal villi; Peyer's patch hyperplasia and flattening of the epithelium with disorganization of the villi as well as inflammation in the villus axis and in the submucosa. However, immunohistochemical examination shows moderate positive membrane and cytoplasmic immunostaining of E-cadherin protein expression in control and co-administered (VA + CE) animals in inflammatory cells and villus cells in anoikis. Although significant cytoplasmic expression of the E-cadherin protein was observed in the AV-treated batch compared to the other batches, the hyperplasia observed in avermectin-treated rabbits, Peyer's patch cells showed no E-cadherin immunoreactivity in the four groups of animals. The bioinformatics study shows that codons 244, 487; 832 located in the CDH1 gene of the E-cadherin protein are the three mutation hot spots involving changes in the protein sequence causing the emergence of many cancers. Supplementation with vitamins C and E restored ileal lesions caused by avermectin in male rabbits.

Keywords: Avermectin, Vitamins C and E, Ileum, Histology, Immunohistochemistry, E-cadherin, bioinformatics

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم التأثير التحسيني للفيتامينات C و E بعد السمية بواسطة مييد حشري avermectin على دقاق ذكور الأرانب *Oryctolagus cuniculus*. لهذا الغرض ، تم تقسيم عشرين أرنبًا ذكرًا إلى أربع دفعات: مجموعة التحكم (T) ، تمت معالجتها بالفيتامينات C و E وتم علاجها باستخدام (AV) avermectin ، وتناولت معها فيتامينات E و C (AV+ CE) تم إجراء دراسة النسيجية المرضية والكيميائية المناعية التعبير عن بروتين (E-cadherin) للحمة اللفائفي بالإضافة إلى دراسة المعلومات الحيوية لجين CDH1 بواسطة برنامج تحليل الجينوم NCBI و COSMIC . تكشف الملاحظة المجهرية للحمة اللفائفي للأرانب المعالجة بالـ avermectin مقارنة بالدفعات الثلاث الأخرى عن الآفات ، أي تسلسل التهابي على مستوى المحور الضام للزغابات المعوية ؛ تضخم رقعة باير وتسطيح الظهارة مع اختلال في الزغابات وكذلك التهاب في محور الزغابات وتحت المخاطية ومع ذلك ، يُظهر الفحص الكيميائي المناعي غشاءً إيجابياً معتدلاً وتلميغاً مناعياً حشويًا لتعبير بروتين E-cadherin في حيوانات التحكم والمشاركة (VA +CE) في الخلايا الالتهابية وخلايا الزغابات في anoikis. على الرغم من ملاحظة التعبير السيتوبلازمي الهام لبروتين E-cadherin في الدفعة المعالجة بـ AV مقارنة بالدفعات الأخرى ، لوحظ تضخم في الأرانب التي عولجت بالـ avermectin ، لم تظهر خلايا التصحيح Peyer أي نشاط مناعي E-cadherin في مجموعات الحيوانات الأربع. تظهر دراسة المعلوماتية الحيوية أن الكودونات 244 ، 487 ؛ 832 الموجودة في جين CDH1 لبروتين E-cadherin هي النقاط الساخنة الثلاثة للطفرات التي تنطوي على تغييرات في تسلسل البروتين مما تسبب في ظهور العديد من السرطانات. مكملات الفيتامينات C و E تعيد الآفات اللفائفي التي يسببها avermectin في ذكور الأرانب.

الكلمات المفتاحية: أفيرومكتين ، فيتامينات ج و ه ، إليوم ، علم الأنسجة ، كيمياء مناعية ، كاديرين ، معلوماتية حيوي

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps	Ag: Antigène
AV : Avermectine	BCL2 : Lymphome a cellules B 2
C1GLU : Récepteurs des canaux de chlorure dépendants du glutamate	CAM Molécules d'adhésion cellulaire
CDH1 : Cadherine type 1	CEI : Cellule épithéliale intestinale
CM : Chylomicrons	DAB : Chromogène
E-CADH : E-Cadherine	E-CAD : Domaine extracellulaire de la protéine E-Cadherine
EGF : Epidermal growth factor	Ensembl : Institue Européen de bioinformatique
ERO : Espèces réactives de l'oxygène	GALT : Gut associated lymphoïd tissu
HDL : Lipoprotéine de haute densité	HE : Coloration hématoxylène éosine
IgA : Immunoglobuline A	IL-10 : Interleukine 10
IHC : Etude immuhistochimique	LDL : lipoprotéine de densité faible
LPL : La lipoprotéine lipase	MALT : Mucosa associated lymphoïd tissu
MEC : Matrice extracellulaire	NCBI : Nationale cancer for biology information
PAP : Système anti-peroxydase	PBS : Solution de démasquage
RL : Radical libre	T : Témoin
ROS : Espèces reactives de l'oxygène	TM : Transmembranaire
VLDL : Lipoprotéine de densités très faible	VIT E C : Vitamine e et c

LISTE DES FIGURES

FIGURES	TITRES	PAGES
Figure 1	Structure chimiques des isomères de l'ivermectine	5
Figure 2	Etapes de la peroxydation lipidique	7
Figure 3	Régénération d' α -tocophérol par l'acide ascorbique	11
Figure 4	schéma représentant les couches de l'intestin grêle du lapin	12
Figure 5	Vue de détail d'une villosité illustrant les différents types de cellules	14
Figure 6	Polyclonalité des villosités intestinales	15
Figure 7	Les cellules immunitaires intestinales	17
Figure 8	Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires dans l'épithélium intestinal	19
Figure 9	Représentation schématique des différentes familles de cadhérines	20
Figure 10	Représentation schématique des différentes familles de cadhérines	21
Figure 11	Structure du gène CDH1 humain et de la région promotrice, et de la protéine E-cadhérine codée	22
Figure 12	les différentes étapes de l'étude bioinformatique.	24
Figure 13	lapin male <i>Oryctolagus cuniculus</i>	28
Figure 14	localisation de la E-cadhérine chez l'humain.	47
Figure 15	localisation de la E-cadhérine chez le lapin.	48
Figure 16	localisation de la E-cadhérine chez le poisson zèbre.	48
Figure 17	Quelques mutations répertoriées chez l'homme	49
Figure 18	Quelques mutations répertoriées chez la souris.	50
Figure 19	Alignement de la séquence E-cadhérine (humain, souris, rat et chien).	51
Figure 20	Arbre phylogénétique de la E-cadhérine (humain, souris, rat et chien	51

LISTE DES PLANCHES

PLANCHES	TITRES	PAGES
Planche 1	Histologie de l'iléon des lapins témoins coloration H&E. A : Gr×10, B : Gr×40.	38
Planche 2	Histologie de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E coloration H&E. A : Gr×10, B : Gr×40.	39
Planche 3	Histologie du duodénum des lapins traités par l'ivermectine coloration H&E. A : Gr×10, B : Gr×40.	40
Planche 4	Histologie du duodénum des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E coloration H&E. A : Gr×10, B : Gr×40.	41
Planche 5	IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins témoins A : Gr×10, B : Gr×40.	43
Planche 6	IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine A : Gr×10, B : Gr×40.	44
Planche 7	E-cadhérine de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E A : Gr×10, B : Gr×40.	45
Planche 8	IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E A : Gr×10, B : Gr×40.	46

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
1 PESTICIDES.....	4
1.1 Définition.....	4
1.2 Classification	4
1.2.1 Classification selon la nature chimique.....	4
1.2.2 Classification selon la nature de la cible visée.....	4
1.3 Lactones macrocycliques et avermectines.....	5
1.3.1 Mode d'action des avermectines.....	6
1.3.2 Toxicité des avermectines	6
2 STRESS OXYDATIF	6
2.1 Définition.....	6
2.2 Radicaux libres	6
2.2.1 Sources des dérivés réactifs de l'oxygène.....	7
2.3 Dommages oxydatifs	7
2.3.1 Oxydation des lipides	7
2.3.2 Oxydation des protéines	8
2.3.3 L'oxydation de l'ADN	8
3 VITAMINES	8
3.1 Définition.....	8
3.2 Vitamine E.....	8
3.2.1 Définition et caractéristiques.....	8
3.2.2 Métabolisme	8
3.2.3 Rôles biologiques	9
3.3 Vitamine C.....	9
3.3.1 Définition et caractéristiques.....	9
3.3.2 Métabolisme	9
3.3.3 Rôle biologique	10
3.3.4 Synergie entre la vitamine E et la vitamine C.....	10
4 INTESTIN GRELE	11
4.1.1 Duodénum	11

4.1.2	Jéjunum	11
4.1.3	Iléon.....	11
4.2	Structure histologique de l'intestin grêle.....	12
4.3	Renouvellement de l'épithélium intestinal.....	12
4.4	Homéostasie de l'épithélium intestinale.....	14
4.5	L'anoikis	14
4.5.1	Spécialisation de la muqueuse intestinale	15
4.5.2	Fonctions majeurs de l'épithélium intestinal.....	16
4.5.3	Rôle immunitaire de l'intestin grêle.....	16
5	LES JONCTIONS INTERCELLULAIRES	18
5.1	Interactions cellule-cellule.....	18
5.2	Molécules d'adhésion cellulaire	19
5.3	Superfamille des cadhérines	19
5.3.1	Description	19
5.3.2	Les cadhérines classiques de type I.....	20
5.4	E-cadhérine	21
5.4.1	Structure de base de la protéine E-cadhérine et son gène codant et transcrit....	21
5.5	Rôle de la E-cadhérine dans l'anoikis des entérocytes.....	22
6	ETUDE BIOINFORMATIQUE.....	24
6.1	Définition.....	24
6.2	Bases de données	24
6.3	Les "GENOME BROWSERS"	25
6.4	Structure des protéines.....	25
6.5	Utilité de la bioinformatique dans le domaine génétique.....	25
	CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES.....	26
	PRESENTATION ET LIEU DE L'ETUDE.....	27
1.	Matériel.....	28
1.1.	Matériel biologique	28
1.2.	Matériel non biologique (Annexe1).	28
2.	Méthodes.....	28
2.1.	Taxonomie du lapin	28

2.2.	Répartition des lots	28
2.3.	Etude histologique	29
2.3.1.	Fixation des échantillons	29
2.3.2.	Circulation	29
2.3.3.	Réalisation des coupes	30
2.3.4.	Coloration histologique H&E.....	30
2.4.	Etude immunohistochimique (IHC) :	31
2.4.1.	Principe :	31
2.4.2.	Mode opératoire :	32
2.4.3.	Etapas de l'IHC	32
CHAPITRE III RESULTATS et DISCUSSION		37
1.	ETUDE HISTOLOGIQUE.....	37
1.1.	Histologie de l'iléon des lapins témoins	37
1.2.	Histologie de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E.....	37
1.3.	Histologie de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine.	37
1.4.	Histologie de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.	37
2.	ETUDE IMMUNOHISTOCHEMIE (IHC).....	42
2.1.	IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins témoins	42
2.2.	IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine.....	42
2.3.	IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E.	42
2.4.	IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.....	42
3.	Analyse Bioinformatique de la E-cadhérine chez le lapin	47
4.	Discussion.....	52
CONCLUSION et PERSPECTIVES.....		58
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		59
ANNEXE		68

INTRODUCTION

Pour la plupart, les pesticides sont des produits chimiques utilisés en agriculture pour détruire les ravageurs, les plantes adventices et les agents phytopathogènes. Cette utilisation des pesticides a montré ses avantages notamment dans l'augmentation des rendements de production par l'élimination ou la réduction des prédateurs des cultures. Toutefois, derrière ces bienfaits, se cachent des effets insidieux dont les méfaits sur l'environnement, sur la qualité des produits agricoles, et sur la santé des populations (**Benedetti et al., 2017**).

Selon le rapport de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le nombre annuel d'intoxications par pesticides est estimé entre 1 et 5 millions de personnes, dont plusieurs milliers de cas mortels; d'autres études ont confirmées cette lourde mortalité liée aux pesticides en estimant le nombre annuel de décès à environ 300 000 cas. Il est estimé que 99 % de ces intoxications mortelles sont enregistrées dans les pays en développement qui sont particulièrement touchés par ce fléau en raison d'un manque de réglementation (**Achour et al., 2011**). L'Algérie n'est pas loin de ce risque en utilisant environ 6000 à 10 000 tonnes de pesticides par ans (**Moussaoui, 2015**).

Les avermectines sont des insecticides employés dans les produits phytosanitaires et dans les médicaments antiparasitaires. L'exposition aux pesticides est l'un des facteurs de risque qui favorise l'augmentation du stress oxydatif en produisant des radicaux libres oxygénés. Ce risque est largement considéré comme étant un composant critique de la plupart des voies pathologiques (**Bonnefont et al., 1997**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres résultant du métabolisme de l'oxygène. Les ERO peuvent endommager la structure des macromolécules (acides nucléiques, protéines, lipides, hydrates de carbone), générer de nouveaux produits oxydants, provoquer une toxicité cellulaire et des mutations génétiques (**Moussart., 2011**). De plus, le stress oxydatif modéré provoque la perte du contact cellule-cellule qui est assuré par la protéine E-cadherine. Les E-cadhérines pourraient, par l'activation du récepteur de l'épidermal growth factor (EGF), augmenter l'expression de Bcl-2. La perte de telles interactions participerait au déclenchement du phénomène d'anoikis (**Shen et Kramer, 2004**).

Cependant, les vitamines C et E sont des antioxydants hydrosolubles considérés comme les plus efficaces des antioxydants pour la lutte contre le stress oxydatif (**Friedman et al., 2000**).

Lors de sa création, La bioinformatique est un champ de recherche multidisciplinaire où travaillent de concert biologistes, informaticiens, mathématiciens et physiciens pour stocker, traiter, comparer et analyser de grandes quantités de données afin de mieux comprendre les processus biologiques. A leur tour, ces connaissances peuvent mener à des découvertes permettant d'améliorer la qualité de vie – par exemple, concevoir des traitements médicaux plus efficaces. Et pour comprendre l'évolution des séquences génétiques.

Notre travail s'intéresse aux variations histologiques de l'iléon et immuno-histochimiques de l'expression de la protéine inter-jonctionnelle E-cadhérine au niveau de l'iléon chez le lapin traité par un insecticide de la famille des avermectines dont la matière active est l'abamectine. L'objectif de notre travail est d'étudier la toxicité subaiguë causée par l'abamectine et l'effet amélioratif des vitamines E et C coadministrés, dont le protocole est détaillé par **Kara et Rahmani (2016)**, suivie d'une étude bioinformatique de la protéine E-cadhérine. Notre expérimentation débute à partir des organes inclus dans de la paraffine (blocs de paraffine) répartis en 04 lots témoin : (T), traité par les vitamines C et E (CE), traité par l'ivermectine (AV), traité par l'ivermectine et coadministré par les vitamines C et E (AV+CE). L'observation microscopique du parenchyme iléonal des lapins traités par l'ivermectine 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 plaques de Peyer et un aplatissement de l'épithélium avec une désorganisation des villosités ainsi qu'une inflammation au niveau de l'axe de la villosité et dans la sous muqueuse. Cependant, l'examen immunohistochimique montre un immunomarquage membranaire et cytoplasmique modérée positive de l'expression de la protéine E-cadhérine chez les animaux témoins et coadministrés (AV + CE) au niveau des cellules inflammatoires et des cellules des villosités en anoïkis. Bien qu'une expression cytoplasmique importante de la protéine E-cadhérine ait été constatée chez le lot traité par AV en comparaison avec les autres lots, l'hyperplasie observée chez les lapins traités par l'ivermectine les cellules des plaques de Peyer ne montrent aucune immunoréactivité par la E-cadhérine chez les quatre lots d'animaux. L'étude bioinformatique montre que les codons 244, 487 ; 832 situés dans le gène CDH1 de la protéine E-cadhérine sont les trois points chauds de mutation impliquant des modifications dans la séquence protéique provoquant ainsi l'apparition de nombreux cancers. La supplémentation par les vitamines C et E a permis de restaurer les lésions iléonales provoquées par l'ivermectine chez les lapins mâles.

CHAPITRE I

RAPPEL

BIBLIOGRAPHIQUE

1 PESTICIDES

1.1 Définition

Etymologie : pesticide dérive du mot anglais '*pest*' qui désigne tout animal ou plante susceptibles d'être nuisible pour l'homme et à son environnement et de '*cide*', du latin *caeder* signifiant tuer, abattre (**Gatignol et Etienne, 2010**).

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés dans l'agriculture pour protéger les récoltes des insectes, des champignons, des mauvaises herbes et d'autres nuisibles. En plus de leur utilisation dans l'agriculture, on les emploie également pour protéger la santé publique dans la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales, comme les moustiques (**OMS, 2016**).

1.2 Classification

Selon **Calvet (2005)**, les pesticides sont classés en fonction de :

- La nature chimique de la principale substance active.
- La nature de la cible visée.

1.2.1 Classification selon la nature chimique

Les pesticides peuvent être classés en fonction de la famille chimique à laquelle appartiennent les substances actives.

- ✚ **Pesticides organiques** : Sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les triazines, les urées substituées et les pyréthrénoïdes.
- ✚ **Pesticides inorganiques** : sont des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu bien avant les débuts de la chimie organique de synthèse.
- ✚ **Biopesticides** : Ce sont des substances dérivées de plantes et d'animaux. Elles peuvent être constituées d'organismes tels que les moisissures, les bactéries, les virus, les nématodes, composés chimiques dérivés de plantes et phéromones d'insectes (**Boland et al., 2004**).

1.2.2 Classification selon la nature de la cible visée

Il existe plusieurs catégories de pesticides dont les principales sont :

- ✚ **Herbicides** : Ils sont destinés à éliminer les végétaux entrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance.
- ✚ **Fongicides** : Permettent de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou encore des bactéries.
- ✚ **Insecticides** : Forment le groupe de pesticides qui représente le plus de risque pour l'homme (**El-Bakouri, 2006**). Ils sont utilisés pour la protection des plantes contre les

insectes, ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Dans notre étude on porte un intérêt particulier à un insecticide, lactone macrocyclique, de la famille des avermectines décrit ci-dessous.

1.3 Lactones macrocycliques et avermectines

Les lactones macrocycliques endectocides sont des produits de fermentation d'actinomycètes du genre *Streptomyces*, qui génèrent au cours de leur croissance de nombreux composés qui se répartissent en deux familles : les avermectines et les milbémycines.

Le nom des AVERMECTINES (A : anti, Verm : ver, Ect : ectoparasite, IN : produit pharmaceutique) dérive de l'ensemble des propriétés acaricides, insecticides et nématocides.

L'innovation découle de la capacité de ce produit à traiter et à éliminer les endoparasites (nématodes) et ectoparasites (arthropodes) ; d'où le concept d'endectocides (**Figure 1**).

Les avermectines sont issus de la culture de *Streptomyces avermitilis* à partir de laquelle huit composés naturels ont été isolés : A1a, A1, bA2a, A2b, B1a, B1b, B2a, B2b. Les composés A et B diffèrent par la présence respective d'un groupement méthoxyl et hydroxyl sur le carbone C5.

L'indice 1 et 2 permet de signaler la présence ou l'absence de la double liaison sur les carbones C 22 et C 23, enfin l'indice a et b permet d'indiquer la nature du substituant butyl ou isoproyl en position C 25. Les homologues a et b ont une activité identique, leur séparation est difficile et sans intérêt au cours de la fermentation à grande échelle si bien que certains auteurs simplifient la nomenclature à quatre types au lieu de huit A1, A2, B1, B2 (**Shoop et al., 1995**).

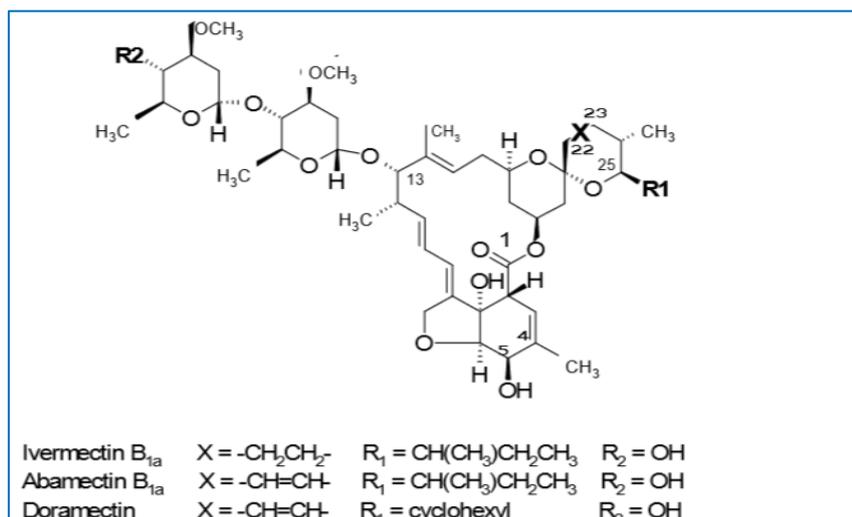


Figure 1 : Structure chimiques des isomères de l'ivermectine

1.3.1 Mode d'action des avermectines

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.

Les effets paralysants sur les muscles pharyngiens sont associés à l'interaction des avermectines et des récepteurs des canaux de chlorure dépendants du glutamate (ClGlu), le rôle physiologique du ClGlu dans le pharynx est de régulariser l'action du glutamate libéré par les motoneurons pharyngiens, le glutamate exogène inhibe le pompage du pharynx, qui est imité par l'ivermectine.

Par contre, la paralysie des muscles somatiques est associée aux récepteurs des canaux de chlorure dépendants de l'acide 4-aminobutanoïque, l'action des avermectines est qu'elles accroissent la perméabilité des muscles aux ions chlorure, ce qui à son tour réduit le potentiel excitateur et la résistance à la pénétration des tissus.

En présence d'avermectines, 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**).

1.3.2 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 (**Rajasekharan et al., 2019**).

2 STRESS OXYDATIF

2.1 Définition

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la capacité des mécanismes protecteurs de l'organisme à neutraliser ces composés toxiques avant qu'ils occasionnent des dégâts aux différents constituants de nos cellules : ADN, protéines, lipides... et peuvent provoquer à long terme le vieillissement des cellules et conduire à des maladies (cancer, Alzheimer, Parkinson...) (**Favier, 2003**).

2.2 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires sur leur couche externe. La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande instabilité, Ils retrouveront leurs stabilités en participant à des

réactions chimiques dont la conséquence est l'oxydation des lipides membranaires, l'oxydation des acides aminés composant les protéines et l'oxydation des glucides composant les acides nucléiques (**Tremellen, 2008**). De façon générale, les radicaux libres contribuent au stress oxydatif par une série de réactions en chaîne. Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO ou ROS) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote ERA).

2.2.1 Sources des dérivés réactifs de l'oxygène

Nos cellules sont continuellement agressées par des radicaux libres, essentiellement des espèces réactives de l'oxygène, dont la formation est liée aussi bien à des facteurs exogènes qu'endogènes (**Castronovo, 2003**). Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (**Castronovo, 2003**). Dans l'organisme il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus et les organites, que ce soit au niveau des mitochondries, des membranes, du réticulum endoplasmique, ou tout simplement dans le cytosol. D'une manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés (**Thannickal et Fanburg, 2000**).

2.3 Dommages oxydatifs

2.3.1 Oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des espèces oxygénées activées (EOA) en raison de leurs hydrogènes facilement oxydables. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives : initiation, propagation et terminaison (**Halliwell and gutteridge, 1999**) (**Figure 2**).

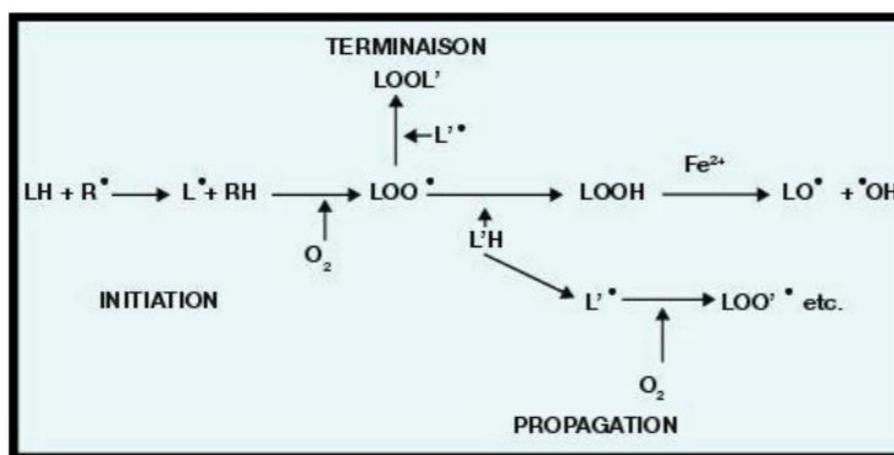


Figure 2: Etapes de la peroxydation lipidique (**Michel et al., 2008**).

2.3.2 Oxydation des protéines

En présence d'EOA, les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leurs structures primaires et secondaires. Les modifications oxydatives des protéines par les ERO provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (Levine, 2002).

2.3.3 L'oxydation de l'ADN

L'ADN nucléaire et mitochondrial constitue une cible cellulaire importante. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîne l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Cadet *et al.*, 2002).

3 VITAMINES

3.1 Définition

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, chimiquement très hétérogènes, de faible poids moléculaire, nécessaires à l'organisme, ce dernier ne peut pas les synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent être fournies par l'alimentation.

3.2 Vitamine E

3.2.1 Définition et caractéristiques

La vitamine E ou tocophérol est une vitamine lipophile, elle est très répandue dans la nature, on la trouve aussi bien dans les aliments d'origine animale (viandes, œufs, foie, lait et ces dérivés) que dans les aliments d'origine végétale (huiles d'origine végétale ainsi que dans les fruits secs tels que noisettes, arachides et amandes) (Cristina *et al.*, 2003), elle regroupe deux grandes familles, la famille des tocophérols qui comprend 4 substances: l' α -tocophérol, qui est la **vitamine E proprement dite**, le β tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol (Moralesband *et al.*, 2009).

La fonction naturelle de la vitamine E est d'être antioxydante. Grâce à ce rôle, elle assure la protection des membranes cellulaires et prévient le durcissement et vieillissement des cellules. Elle aide également à maintenir la santé du système immunitaire en protégeant la vie des globules rouges dans la circulation sanguine.

3.2.2 Métabolisme

La vitamine E est absorbée depuis la lumière intestinale vers l'entérocyte au niveau duquel elle est incorporée au sein des chylomicrons (CM) (Sokol *et al.*, 1987). A partir de l'intestin

grêle, les CM chargés de vitamine E, sont transportés par la voie lymphatique et déversés dans la circulation sanguine. Ils sont ensuite transformés en CM rémanents, ou CM résiduels, par la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme attachée à la surface de l'endothélium capillaire des tissus extra-hépatiques, ceci permet l'incorporation par les tissus sous-jacents de l' α -tocophérol transportés dans ces lipoprotéines. Une partie des tocophérols est transférée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) pendant le catabolisme des CM. Ces tocophérols sont ensuite directement incorporés aux lipoprotéines de densité faible (LDL) et aux lipoprotéines de densité très faible (VLDL) (**Yoshida et al., 1992**).

Aucun organe ne peut être considéré comme un lieu de stockage de la vitamine E, avec une libération sur demande de celle-ci. La vitamine E est excrétée soit dans les fèces (30-70%) via la bile après conjugaison avec l'acide glucuronique, soit, après biotransformation en acide tocophéronique et ses métabolites dans les urines (**Flatland, 2003**).

3.2.3 Rôles biologiques

La vitamine E possède des propriétés anti-inflammatoires. Elle stimule le système immunitaire et aide les cellules à combattre l'infection. Mais c'est surtout pour son activité antioxydante que la vitamine E est utile à notre organisme. En raison de son caractère liposoluble, elle est capable de réduire rapidement les radicaux lipidiques avant que ceux-ci n'attaquent les acides gras (**Bourgeois, 2003**).

3.3 Vitamine C

3.3.1 Définition et caractéristiques

La vitamine C, encore appelée acide ascorbique (AA) est une vitamine hydrosoluble. Chez l'homme il n'existe pas de système de stockage ou de biosynthèse, l'alimentation constitue la seule source d'apport de cette vitamine. Sa formule chimique $C_6H_8O_2$ a été décrite en 1927 par **Albert SzentGyörgyi**, scientifique hongrois, sous le nom d'acide hexuronique (**Khonsari H et al., 2005**). Il s'agit d'un réducteur naturel. Par définition, il a un pouvoir antioxydant lorsqu'il est sous sa forme réduite : l'acide ascorbique. Son nom chimique est 2,3-dihydro-L-threohexano-1,4-lactone. Sa forme oxydée est l'acide déhydroascorbique, de formule chimique $C_6H_6O_6$ (**Henri, 1992**).

3.3.2 Métabolisme

L'acide ascorbique est absorbé principalement au niveau de l'iléon grâce à un mécanisme de transport actif Na^+ -dépendant. Ensuite, l'acide ascorbique passe rapidement dans le sang et pénètre dans tous les tissus. Dans le sang, la majeure partie de l'acide ascorbique est sous sa

forme réduite (environ 85%). Au pH physiologique, la forme majoritaire est l'anion ascorbate (85%). La forme oxydée (déhydroascorbique) ne représente que 15 %.

3.3.3 Rôle biologique

La fonction biologique de la vitamine C est reliée à son efficacité comme un agent réducteur ou un donneur d'électron ; elle intervient en particulier comme un cofacteur d'enzymes dans différentes synthèses (du collagène, de la carnitine, et hormonales), un stimulateur du système immunitaire, et présente un rôle dans la *détoxification des xénobiotiques* (Padayatty et al., 2003).

L'acide ascorbique neutralise les radicaux en cédant un électron suivi d'un proton afin de conduire à une réduction chimique, aboutissant à la formation d'un produit non radicalaire et le radical ascorbyle, ce dernier est relativement stable. A des concentrations physiologiques, la vitamine C est un puissant antioxydant, et un capteur des radicaux libres dans le plasma d'où, une protection de la cellule contre les dommages oxydatifs (Buettner, 1993).

3.3.4 Synergie entre la vitamine E et la vitamine 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. En effet, il existe des interrelations métaboliques entre les différents nutriments antioxydants, avec des effets complémentaires et synergiques pour certains d'entre eux. Ainsi l' α -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 (Paolisso et al., 1993 ; Paolisso et al., 1995).

De plus, l'acide ascorbique est indispensable à la régénération de l' α -tocophérol, en transférant un électron et un proton sur le radical tocophérol mentionné en régénérant le tocophérol et en s'oxydant mono électroniquement en acide radical monohydroascorbique (Figure 3) (Buettner, 1993). Les voies d'élimination de la vitamine C sont principalement les urines, la sueur. Pour des apports en vitamine C de 100 mg/jour, 25 % sont excrétés.

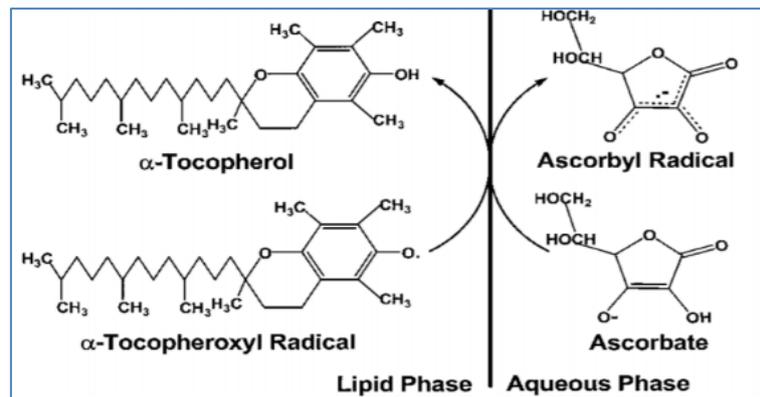


Figure 3: Régénération d' α -tocophérol par l'acide ascorbique (Derai, 2016).

4 INTESTIN GRELE

Le lapin est un herbivore monogastrique, son tube digestif est adapté à la digestion d'une grande quantité de fourrage. Il est composé d'une succession de compartiments, présentant deux réservoirs digestifs : l'estomac et le caecum, relié par l'intestin grêle. Leur contenu représente 70 à 80 % du contenu total du tube digestif et 10% du poids de l'animal (Gidenne et Lebas, 2005).

L'intestin grêle s'étend du pylore au colon et comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon, il exerce deux fonctions : il achève d'une part la digestion du chyme provenant de l'estomac et absorbe d'autre part les produits de cette digestion au niveau de ses replis (Michel, 1999).

4.1.1 Duodénum

Mesure environ 40 cm de long. Sa muqueuse renferme de nombreuses glandes de Brünner qui secrètent du mucus. Celui-ci permet de protéger l'épithélium duodéal de l'acidité du chyme provenant de l'estomac.

4.1.2 Jéjunum

Segment intermédiaire de l'intestin grêle, mesurant un peu plus de deux mètres de long. Le jéjunum transporte rapidement les aliments digérés à travers l'intestin grêle, par conséquent, il ne contient que rarement des matières alimentaires. Il est relié à la paroi abdominale par le mésentère.

4.1.3 Iléon

Court (15 à 20 cm). Sa partie terminale s'élargit avant son abouchement au caecum pour former une ampoule plus ou moins sphérique : le « saccus rotundus ». Celui-ci est situé dans le quadrant abdominal caudal gauche. Il est tapissé intérieurement par de nombreux follicules lymphoïdes = plaques de peyer. Il communique avec le gros intestin par la valvule iléo-caecale qui permet au chyme de passer dans le caecum (Sherwood, 2015).

4.2 Structure histologique de l'intestin grêle

Comprend 4 couches observées à tous les étages du tube digestif :

✚ **La muqueuse** qui repose sur la *muscularis mucosae* et comprend l'épithélium et la *lamina propria*

✚ **La sous muqueuse, conjonctivo-vasculaire.** : Cette couche est occupée par les glandes de Brunner dans les premiers segments duodénaux.

✚ **La musculuse**, couche épaisse, comporte comme la *muscularis mucosae*, un plan interne circulaire et un plan externe longitudinal de fibres musculaires lisses (**Balas et Philip, 2003**).

✚ **La séreuse**, est une mince couche conjonctive dans laquelle circulent les vaisseaux et les nerfs qui vont pénétrer dans des couches plus internes de la paroi (**Vacher , 1999**) (**Figure 4**).

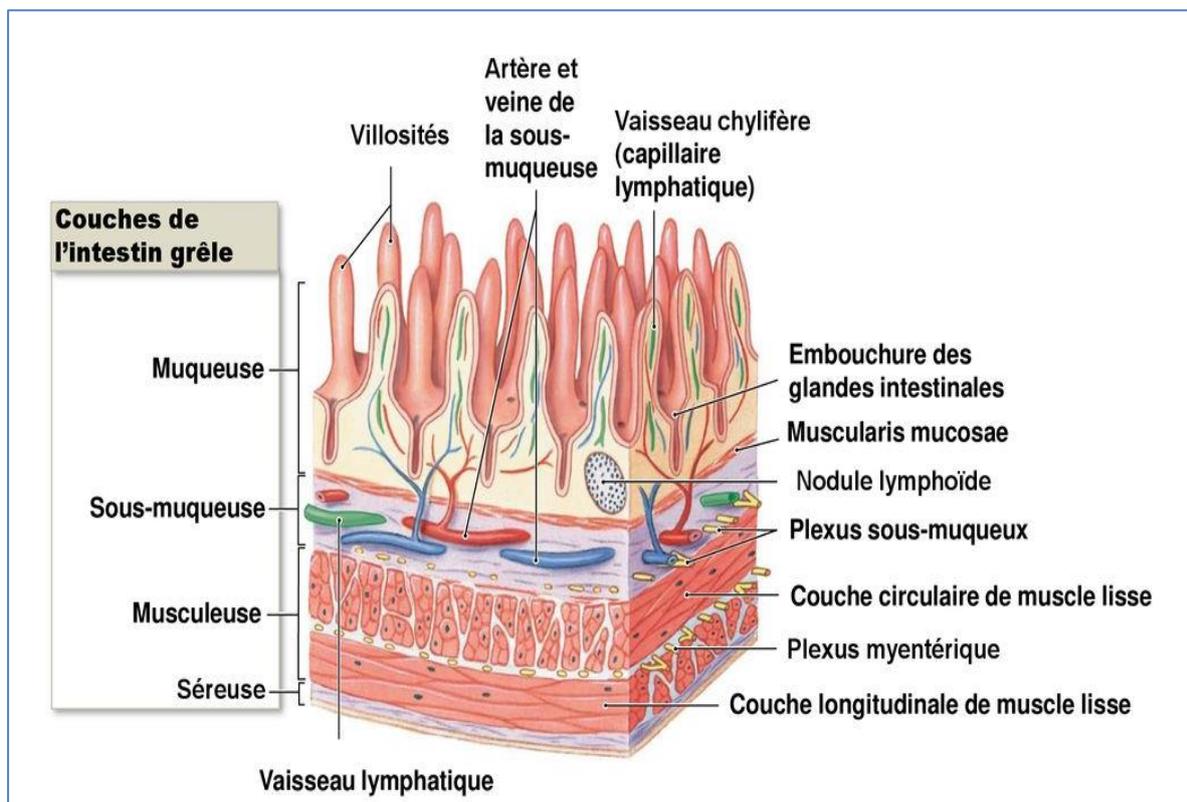


Figure 4 : schéma représentant les couches de l'intestin grêle du lapin (**Tortora et Derrickson, 2018**).

4.3 Renouvellement de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal des mammifères est renouvelé tous les 4 à 5 jours. Il est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées présentant une bordure en brosse à leur extrémité apicale et qui reposent sur la *lamina propria*.

L'ensemble des **CEI** (cellules épithéliales intestinales) provient de cellules souches pluripotentes résidentes au fond des cryptes (**Wong et al., 2010**). Les cellules souches, lors de leur division, donnent naissance à une nouvelle cellule souche, permettant le maintien du pool

de cellules souches, et à une cellule fille possédant une grande capacité de prolifération, donnant ainsi naissance à un pool de cellules “transitoires” prolifératives.

Après expression de différents facteurs de transcription et de régulation, les cellules transitoires prolifératives migrent progressivement vers le haut des **cryptes** et se différencient soit en

- **Cellules absorptives**: Les cellules absorbantes sont également appelées entérocytes au niveau de l'intestin grêle. Ils sont responsables de l'acquisition de marqueurs structuraux avec des molécules de jonction et le cytosquelette et fonctionnels par l'expression d'enzymes et transporteurs spécifiques. La mise en place de jonctions intercellulaires fortement cohésives (jonctions adhérentes, serrées et desmosomes) leur donne une forme cylindrique polarisée, avec le noyau au pôle basal, de nombreux organites et une membrane plasmique hautement spécialisée au pôle apicale (**Figure 5**). Ce scellement des contacts intercellulaires permet d'établir une compartimentation de la membrane plasmique dont la composition des lipides et des protéines est différente au pôle baso-latéral et au pôle apical (**Brazier et al., 2002**).
- **Cellules sécrétoires** : les cellules caliciformes, **cellules sécrétrices de mucus (goblet)** : Ces cellules sont des glandes exocrines unicellulaires qui produisent et sécrètent un mucus tapissant la face luminale de l'épithélium intestinal (**Figure 5**).
- **Cellules entéroendocrines** : Elles sont plus petites que les autres cellules épithéliales, de forme allongée, enchâssées entre les entérocytes et réparties sur l'axe cryptovillositaire (**Figure 5**).
- **Cellules de Paneth** qui sont retrouvées au fond des cryptes intercalées avec les cellules souches. Ces cellules se différencient en redescendant à la base des cryptes dans l'intestin grêle et ne sont pas retrouvées au niveau du côlon (**Garabedian et al., 1997**) (**Figure 5**). Comme les neutrophiles, elles assurent un rôle anti-bactérien et participent à la réponse immunitaire innée. Ces cellules ont une durée de vie de 30 jours environ et sont régulièrement éliminées par les macrophages de la lamina propria.

Enfin, les cellules caliciformes, entéroendocrines et les entérocytes atteignent le haut des **villosités** en quelques jours et sont exfoliés après apoptose dans la lumière intestinale (**Van der Flier et al., 2009**).

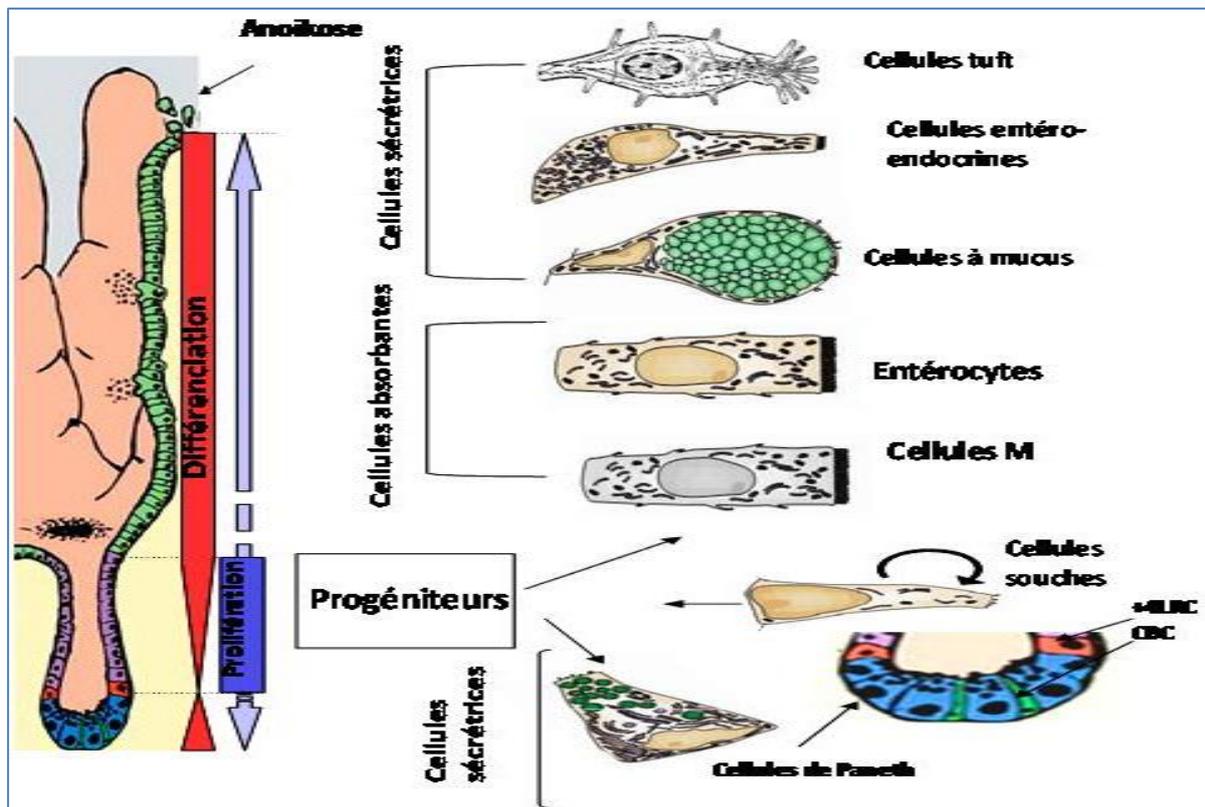


Figure 5 : Vue de détail d'une villosité illustrant les différents types de cellules (Crosnier et al., 2006).

4.4 Homéostasie de l'épithélium intestinale

L'homéostasie assure le renouvellement de l'épithélium, L'homéostasie de l'épithélium intestinal est maintenue par l'équilibre entre prolifération, **apoptose** et **différenciation**. L'épithélium est en continuel renouvellement. Le fort taux de renouvellement est dû au contact direct qu'il exerce avec le milieu extérieur, la lumière intestinale. La forte prolifération est donc contrebalancée par un phénomène d'apoptose afin de maintenir la structure et la fonction de l'épithélium.

En condition physiologique, au niveau de la muqueuse intestinale, l'apoptose est majoritairement représentée à l'apex des villosités par l'**anoïkis** (Moss et Holt, 1996). Lors de ce processus de prolifération et de migration, les quatre lignées de cellules épithéliales doivent se différencier tout en maintenant l'intégrité de la barrière et l'homéostasie intestinale.

4.5 L'anoïkis

L'anoïkis, du grec ancien « sans domicile fixe », représente un mode d'élimination physiologique des cellules par un mécanisme d'apoptose consécutif à une rupture des communications entre une cellule épithéliale et son environnement (Frisch et Francis,

1994). Elle constitue un moyen pour l'organisme d'éviter que les cellules qui seraient détachées accidentellement de la MEC puissent migrer vers un site tissulaire ectopique (Gilmore, 2005) (Figure 7).

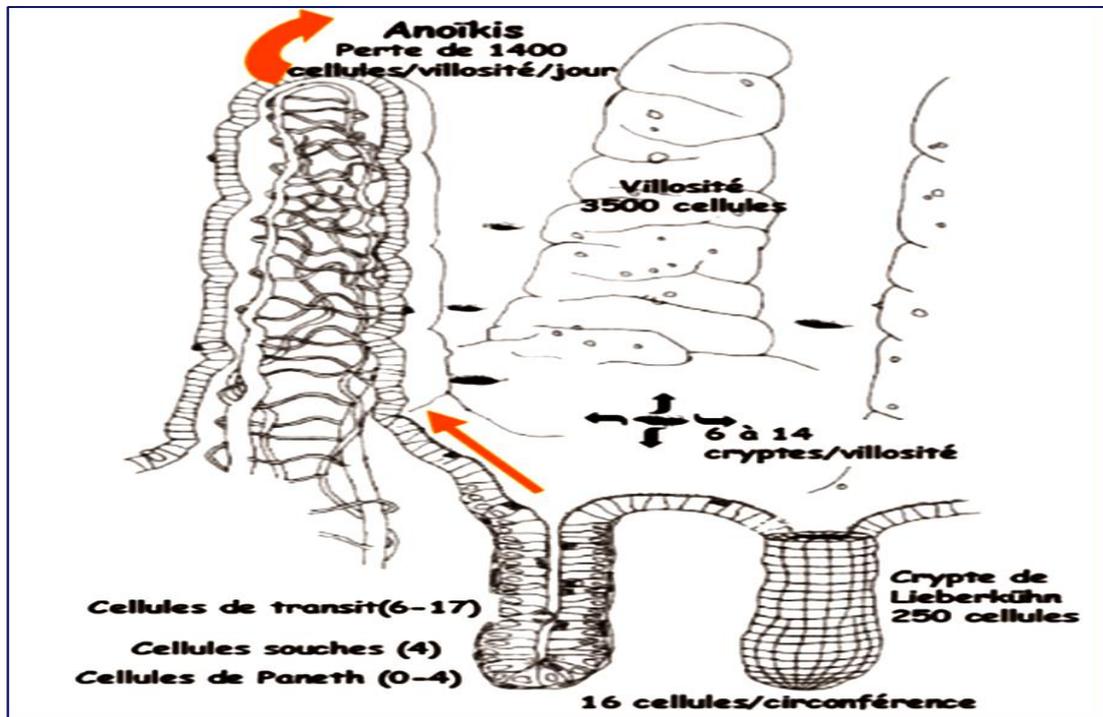


Figure 6 : Polyclonalité des villosités intestinales (Mills et Gordon, 2001).

Ainsi, la résistance à l'anoïkis ou des altérations perturbant son contrôle contribuent grandement au développement et à la dissémination dans l'organisme de cellules tumorales métastatiques (Shanmugathasan and Jothy, 2000).

En revanche, les cellules épithéliales sont protégées de l'anoïkis dans plusieurs situations, (lors de la mobilité ou de la division cellulaire) (Thompson et al., 2005; Zanotti et al., 2011).

4.5.1 Spécialisation de la muqueuse intestinale

- **Les cellules M (*microfold cells*) de l'iléon** : situées dans l'épithélium intestinal au niveau des plaques de Peyer, incorporent par endocytose les antigènes endoluminaux puis les transfèrent aux cellules dendritiques qui les présentent aux lymphocytes B, Ces cellules M délimitent des poches formées d'invaginations de leurs espaces basolatéraux contenant des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques et des macrophages (Molokhou, 2002).
- **Les glandes de Brunner** : sont des glandes muqueuses tubulo-acineuses produisant une sécrétion alcaline qui neutralise le chyme acide provenant de l'estomac (Kierszenbaum, 2006).

- **Iléon et plaques de Peyer** La muqueuse digestive contient d'autre part un tissu lymphoïde associé à l'intestin, le **GALT** (Gut Associated Lymphoid Tissue) qui est à l'origine des défenses immunitaires spécifiques (**Fortun-Lamothe et Boullier, 2007**). Le lapin est cependant caractérisé par deux structures originales ayant un rôle important dans le système immunitaire digestif : le *sacculus rotundus* situé à la jonction iléo-caecale et l'appendice vermiforme localisé à l'extrémité du caecum (**Figure 12**). Ces deux formations contiennent chacune plusieurs centaines de follicules lymphoïdes (**Kierszenbaum, 2006**). Par un canal excréteur, le mucus s'évacue au fond des cryptes de Lieberkühn après traversée de la musculaire-muqueuse .

4.5.2 Fonctions majeurs de l'épithélium intestinal

a- Barrière intestinale : Cette barrière est composée d'une monocouche de cellules épithéliales dont la cohésion est maintenue par des **jonctions serrées** et **adhérentes** entre les cellules .

b- Absorption des nutriments, de l'eau : L'intestin permet la dégradation des aliments en nutriments et l'absorption de ces nutriments de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin (**MacDonald et al., 2011**).

4.5.3 Rôle immunitaire de l'intestin grêle

Le tube digestif constitue une porte d'entrée pour les micro-organismes extérieurs. Le GALT, tissu lymphoïde associé au tube digestif, est une localisation particulière du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). Il constitue le principal support du système immunitaire au niveau du tube digestif et sa fonction première est de protéger l'organisme contre l'invasion par des microbes ou des parasites ingérés. Plusieurs structures composent le GALT, des structures organisées, telles que les plaques de Payer ou les ganglions mésentériques, mais également des structures diffuses, comme les follicules lymphoïdes isolés.

Les cellules de Paneth et les macrophages sont les cellules les plus nombreuses dans la *lamina propria* en situation physiologique. En plus d'être des cellules présentatrices de l'antigène, ce sont des cellules capables de phagocytose et de productions d'une cytokine pro-inflammatoire l'IL10 (clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale). Alors que les macrophages ont la capacité d'éliminer directement les bactéries qui franchissent l'épithélium intestinal sans déclencher de réponse inflammatoire délétère (**Muniz et al., 2012**) (**Figure 8**).

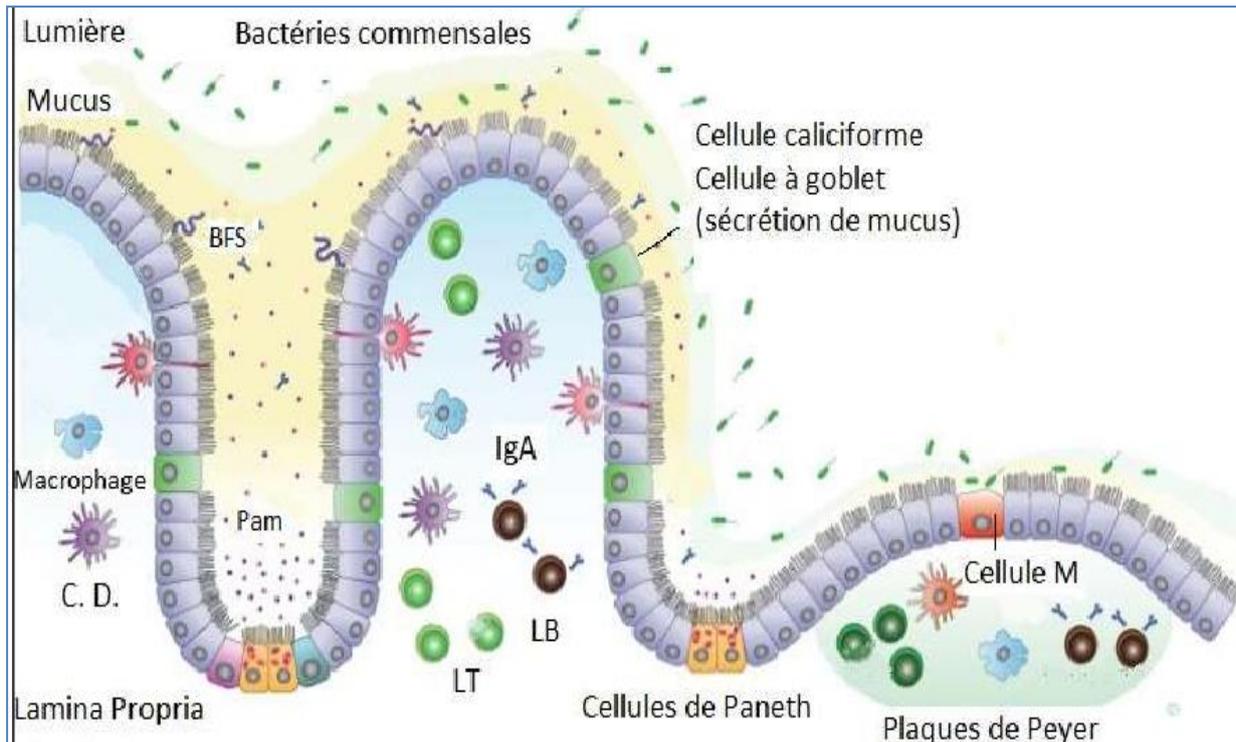


Figure 7 : Les cellules immunitaires intestinales (Muniz et al., 2012).

Les antigènes de la lumière intestinale peuvent être capturés de trois manières différentes (CDU-HGE, 2014).

- Par les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés.
- Par les cellules dendritiques émettant des prolongements dans la lumière intestinale.
- Directement par les cellules épithéliales.

Les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés constituent les sites inducteurs majeurs de l'immunité adaptative intestinale. Leur épithélium comporte des cellules épithéliales différenciées appelées cellules M présentant de nombreuses microvésicules et une forme particulière leur permettant un contact étroit avec des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes au niveau de leur membrane basale. Ces cellules captent de façon sélective les microparticules, souvent antigéniques, qui parviennent à leur contact. Elles leur font traverser leur cytoplasme sous forme de vésicules (d'où l'aspect vacuolé de ces cellules) et les libèrent dans le microenvironnement immunocompétent sur lequel elles reposent. Les cellules lymphoïdes naïves T et B sont ainsi informés et sélectionnés.

Les cellules B prolifèrent et constituent le centre germinatif des nodules solitaires ou les plus nombreux centres germinatifs des plaques de Peyer. Les **lymphocytes B** produits dans un nodule lymphoïde isolé, une plaque de Peyer ou un ganglion mésentérique quittent ces structures via la circulation lymphatique se déversent par le canal thoracique

dans la circulation systémique, et colonisent ainsi tous les territoires muqueux par voie sanguine (CDU-HGE, 2014).

Ils se différencient alors en **plasmocytes** et produisent des IgA spécifiques de l'antigène. Au niveau de la muqueuse intestinale, les entérocytes vont capter ces IgA et les faire traverser leur cytoplasme puis les libérer sous forme d'IgA sécrétées dans la lumière intestinale où elles peuvent se fixer aux antigènes qui leur sont spécifiques (Molkhou, 2002).

5 LES JONCTIONS INTERCELLULAIRES

5.1 Interactions cellule-cellule

Les interactions cellule-cellule jouent un rôle important dans l'anoïkis (Hofmann *et al.*, 2007). La perte du contact cellule-cellule est gouvernée par les **E-cadhérines** (Fouquet *et al.*, 2004). Les E-cadhérines pourraient, par l'activation du récepteur de l'epidermal growth factor (EGF), augmenter l'expression de Bcl-2 (Shen *et Kramer*, 2004). La perte de telles interactions participerait au déclenchement du phénomène d'anoïkis.

Il existe quatre types de jonctions intercellulaires: les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes (**Figure9**). Ces jonctions sont particulièrement bien organisées dans les **structures tissulaires épithéliales**, mais sont aussi présentes dans d'autres tissus (muscle cardiaque, tissus nerveux...).

Nous décrivons ces 4 types de jonctions, en nous intéressant plus particulièrement aux **jonctions adhérentes** et aux **desmosomes**, les **cadhérines** étant les récepteurs adhésifs de ces plaques adhésives.

Les jonctions adhérentes et les desmosomes sont structurés au niveau transmembranaire par les membres de la superfamille des cadhérines. La **E-cadhérine**, constituant principal des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales, semble intervenir dans les premières étapes de l'assemblage du complexe jonctionnel apical et ainsi être un élément essentiel dans leur organisation. C'est la raison pour laquelle notre intérêt s'est particulièrement porté sur les **cadhérine**.

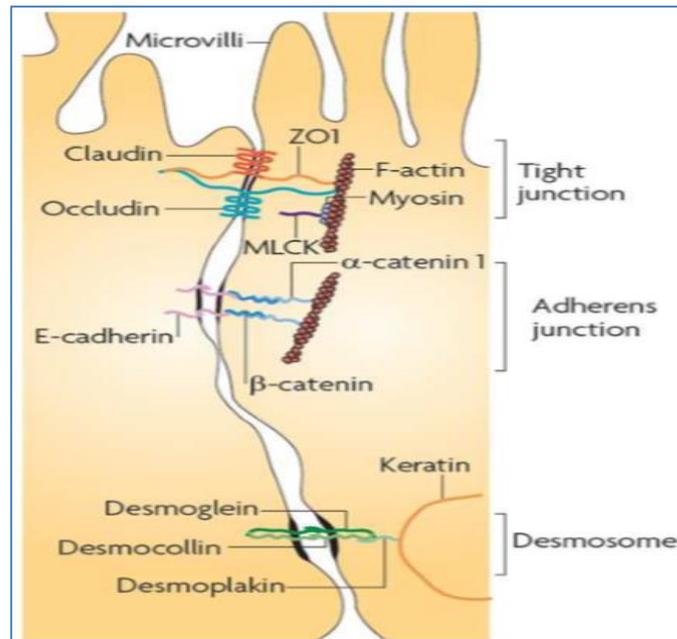


Figure 8 : Schéma des différents complexes de jonctions intercellulaires dans l'épithélium intestinal (Turner *et al.*, 2009).

5.2 Molécules d'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaire (CAM) sont des glycoprotéines transmembranaires jouant un rôle très important au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte. Elles permettent l'établissement et le maintien de l'intégrité tissulaire mais sont également impliquées dans des processus migratoires. Les CAM interviennent dans les contacts cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire. Elles sont composées de quatre grandes familles regroupées selon leur structure : les immunoglobulines, les sélectines, les intégrines et les cadhérines.

5.3 Superfamille des cadhérines

5.3.1 Description

Les cadhérines constituent une superfamille de glycoprotéines transmembranaires qui lient le calcium (Sivasankar *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Dont la plupart ont des propriétés adhésives. Dans cette superfamille, c'est la **E-cadhérine** qui a d'abord été décrite, isolée à partir d'embryon de souris au stade morula et appelée uvomoruline (Hyafil *et al.*, 1981). Peu après la découverte de la E-cadhérine, la P- puis la N-cadhérine ont été décrites (Hulpiau & van Roy, 2009). Tous les membres de la superfamille des cadhérines ont un domaine extracellulaire multimodulaire avec la présence de « motifs cadhérines » d'environ 110 acides aminés de long.

Ces motifs cadhérines ont des sites très conservés qui permettent de les identifier, comme les séquences: **LDRE (Leu-Asp-Arg-Glu)**, **DxNDN (Asp-x-Asn-Asp-Asn)** et **DxD (Asp-x-Asp)**. Ces acides aminés constituent les éléments structuraux des poches de fixation du calcium qui

sont situés entre 2 modules extracellulaires consécutifs. **Nollet et al** ont proposé une classification basée sur les similarités de séquences de l'ensemble des cadhérines en 5 familles (**Nollet et al, 2000**) (**Figure 10**).

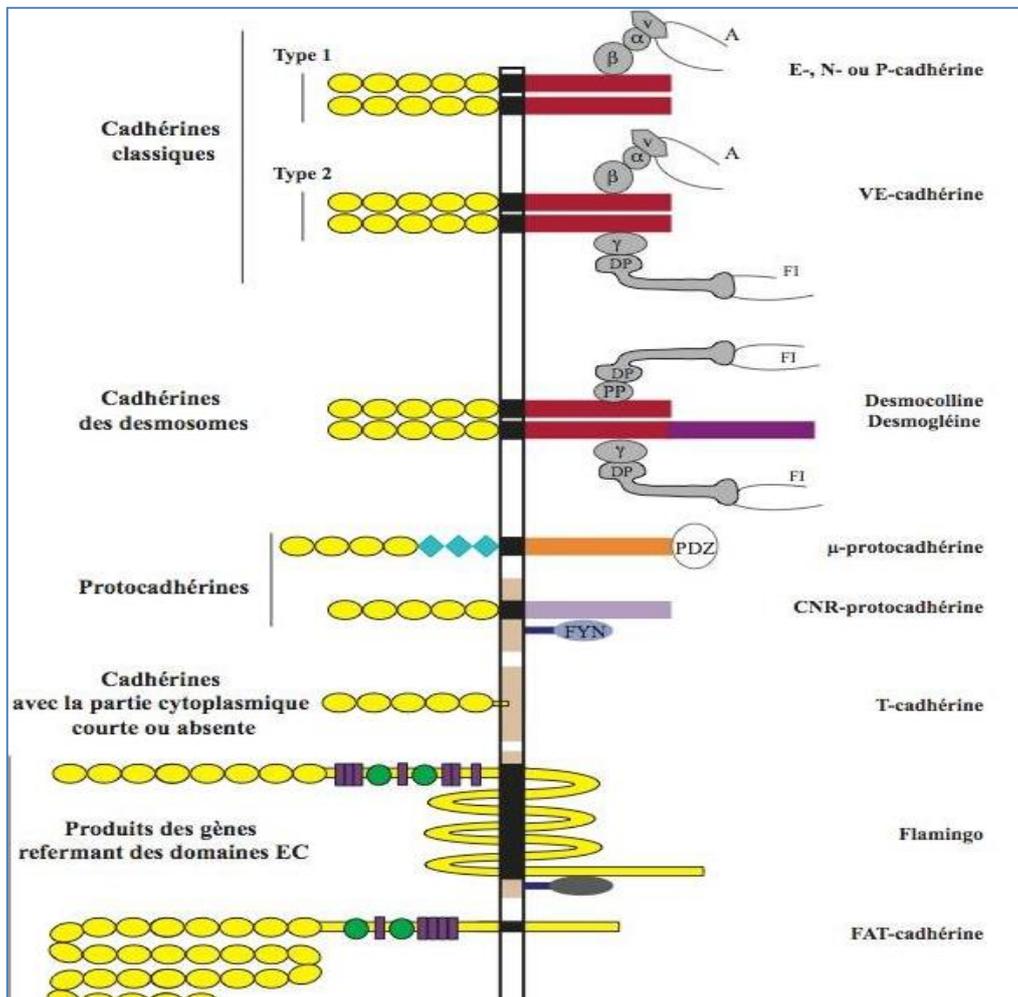


Figure 9 : Représentation schématique des différentes familles de cadhérines (**Nollet et al., 2000**).

5.3.2 Les cadhérines classiques de type I

Les cadhérines possèdent un large domaine extracellulaire, qui, en présence d'ions calcium, se lie directement au domaine extracellulaire d'une autre molécule de cadhérine de la cellule adjacente (**Figure 11**). La partie intracytoplasmique des cadhérines classiques est très conservée et contient un site de liaison à la β -caténine. La β -caténine, en se liant à l' α -caténine, relie les cadhérines directement au cytosquelette d'actine (**Drees et al., 2005**). Les cadhérines d'une même sous-famille se lient préférentiellement ensemble, et forment ensuite des structures « zippées » le long de la jonction adhérente (**Patel et al., 2006**). E-cadhérine

5.4 E-cadhérine

La **E-cadhérine** est une molécule d'adhésion cellulaire homophile dépendant du calcium hautement conservée, exprimée principalement dans les tissus épithéliaux (**Takeichi, 1991**). Les molécules de E-cadhérine sont généralement localisées à la **surface baso-latérale** de la cellule, dans une région de **contact cellule-cellule** connue comme la jonction adhérente dans la **zonula adhérente** (**Nagar, 1996**). Elle appartient à la famille des cadhérines classiques et, d'une manière similaire aux intégrines, son rôle dans l'adhérence est étroitement associé à sa capacité à recruter sur son domaine cytoplasmique des complexes multi-moléculaires liés au cytosquelette (**Jamora & Fuchs, 2002**) (**Figure 11**).

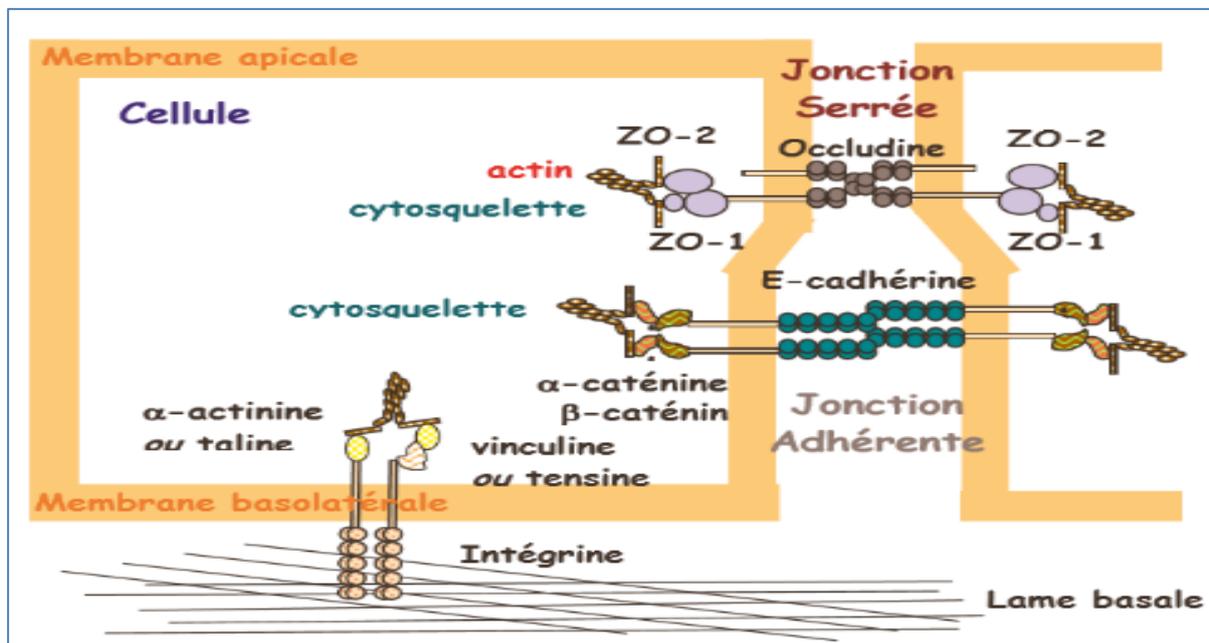


Figure 10 : Représentation schématique des différentes familles de cadhérines.

5.4.1 Structure de base de la protéine E-cadhérine et son gène codant et transcrit

L'expression de la E-cadhérine est régulée par le gène **CDH1** localisé sur le chromosome 16q22.1, une région montrant des pertes hétérozygotes fréquentes dans différents types de carcinomes humains (**Wijnhoven et al., 2000**).

Le gène CDH1 comprend 16 exons de 100 Kb qui sont transcrit en un ARNm de 4.5 Kb (**Berx G et al., 1995**). Le clivage du polypeptide précurseur de 135 kDa aboutit à une glycoprotéine transmembranaire mature de 120 kDa (**Shore et Nelson, 1991**), constituée d'un grand domaine extracellulaire et de domaines transmembranaires et cytoplasmiques plus petits (**Figure 12**).

Le domaine extracellulaire de la E-cadhérine est principalement composé de 5 domaines répétés, connus sous le nom de domaines E-CAD, comprenant chacun 2 motifs de liaison au calcium hautement conservés (**Kemler, 1993**). Ces motifs jouent un rôle clé dans le pliage et

la dimérisation corrects de ces protéines, ainsi que dans le mécanisme d'adhésion lui-même (Shapiro *et al.*, 1995). Le domaine N-terminal est responsable de l'adhésion homotypique et le domaine cytoplasmique est lié au cytosquelette d'actine par le biais des caténines (α , β , γ , p120) (Polakis, 2000).

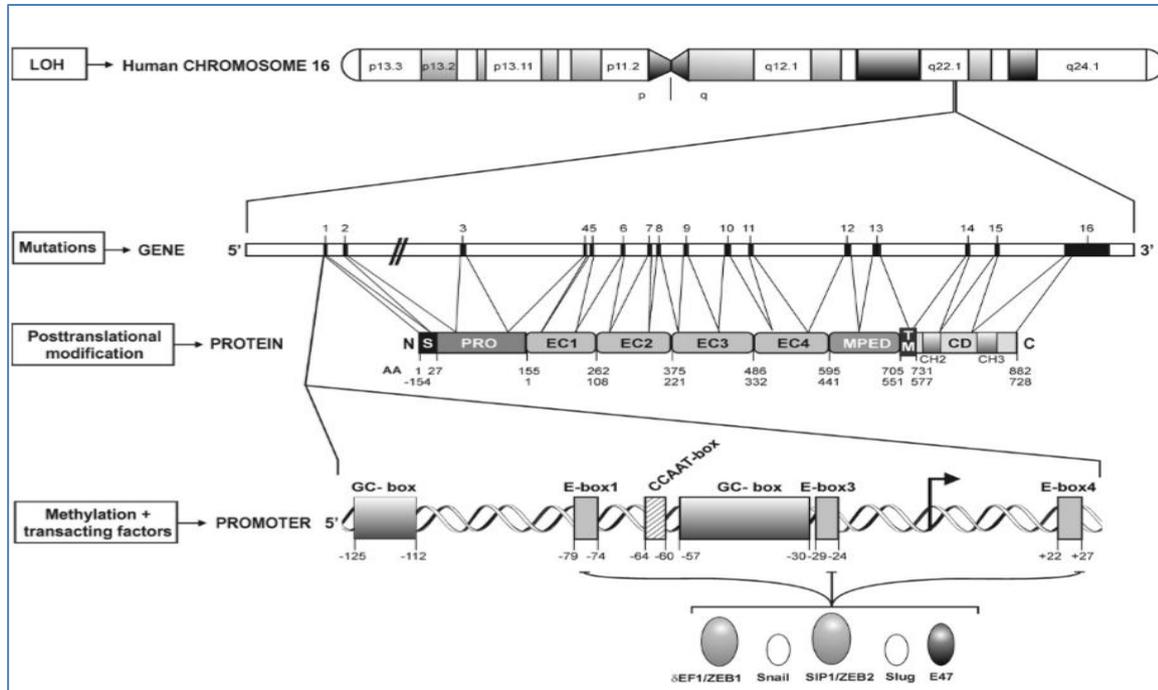


Figure 11: Structure du gène CDH1 humain et de la région promotrice, et de la protéine E-cadhérine codée (Ringwald *et al.*, 1987). (AA :position des acides aminés; C : C-terminal; CD, domaine cytoplasmique; CH, cadherin homology domain; EC :extra cellular cadherin repeat; EC MPED :domaine extracellulaire membrane-proximal; N : N-terminal; PRO :propeptide; S : peptide signal; TM : région transmembranaire. La flèche indique le début de l'initiation de la transcription).

De plus, les modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, la glycosylation et d'autres modifications peuvent affecter la fonctionnalité de la protéine E-cadhérine. Le silencing épigénétique a été associé à la méthylation de CpG dans la région promotrice et à la liaison directe de répresseurs de transcription spécifiques aux séquences E-box dans le promoteur.

5.5 Rôle de la E-cadhérine dans l'anoikis des entérocytes

Un rôle important de la protéine **E-cadhérine** dans le contrôle du turn-over de l'épithélium intestinal a été initialement suggéré par l'observation d'une importante augmentation du nombre de **cellules apoptotiques** dans les **villosités intestinales** de souris transgéniques exprimant le fragment intra cytoplasmique de la N-cadhérine dépourvu du domaine

extracellulaire, qui exerce un effet dominant-négatif sur la E-cadhérine endogène (**Hermiston & Gordon, 1995**).

L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire et l'adhérence cellule-cellule exercent l'une sur l'autre un contrôle réciproque, selon des mécanismes complexes qui diffèrent en fonction des types cellulaires. La perturbation des complexes E-cadhérine-cytosquelette, sous l'effet de la perte d'adhérence cellule-matrice, pourrait participer à l'induction de l'**anoïkis** des **entérocytes**, sous l'effet de la rupture des interactions avec la lame basale, les cellules intestinales sont capables d'enclencher et d'exécuter un programme d'apoptose (**Fouquet et al., 2004**).

La E-cadhérine disparaît des contacts cellule-cellule précocement, avant l'apparition de la morphologie apoptotique des noyaux, il semble donc la disparition de la E-cadhérine soit un événement situé relativement en amont dans la cascade apoptotique induite par le détachement des entérocytes. La modification du complexe E-cadhérine à la suite du détachement participe à l'induction de l'anoïkis, puisque l'apoptose est augmentée en présence d'un anticorps bloquant anti-E-cadhérine, et diminuée en présence d'une protéine chimère agoniste de la E-cadhérine (**Fouquet et al., 2004**). Dans les entérocytes normaux, la perte d'ancrage à la lame basale entraîne une modification du complexe E-cadhérine qui a pour conséquence :

- 1) une perte de signaux de survie ou une induction de signaux pro-apoptotiques.
- 2) la disparition de la membrane et la dégradation de la E-cadhérine.

6 ETUDE BIOINFORMATIQUE

6.1 Définition

La bioinformatique est une « interdiscipline » à la frontière de la biologie, de l'informatique et des mathématiques. Les systèmes biologiques sont très complexes et les techniques modernes d'investigation du monde biologique fournissent une vaste quantité de données expérimentales.

Le but ultime de la bioinformatique est d'intégrer ces données d'origines très diverses pour modéliser les systèmes vivants afin de comprendre et prédire leurs comportements (biologie systémique ou biologie des systèmes) dans des conditions de fonctionnement normales ou pathologiques. 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) (Figure 13).

6.2 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 (ajout, mise à jour, recherche et éventuellement analyse dans les systèmes les plus évolués). 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.

Les banques de données utiles dans le domaine de la génétique

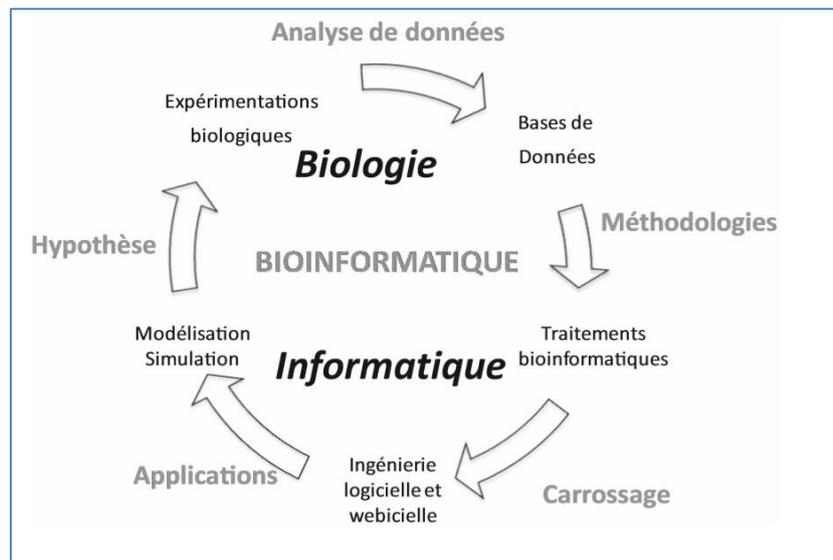


Figure 12 : les différentes étapes de l'étude bioinformatique.

6.3 Les "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**).

6.4 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) (**Déleage et Gouy, 2013**).

6.5 Utilité de la bioinformatique dans le domaine génétique

- Prédiction des changements de stabilité des protéines
- Prédiction de l'agrégation des protéines
- Prédiction des régions désordonnées
- Prédiction du caractère pathogène de mutation faux-sens
- Prédiction du caractère pathogène de mutation intronique (**Déleage 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'un 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 l'iléon) 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 Koléa ou nous avons recherché les effets génotoxiques de l'abamectine par :

- ❖ Une étude histologique de l'intestin (coloration H&E)
- ❖ Une étude immunohistochimique (IHC) : Marqueur de jonctions intercellulaires E-cadhérine au niveau de l'iléon de quatre lots de lapins.
- ❖ Ce travail a été complété par une étude bioinformatique sur la protéine E-cadhérine.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique : Notre travail complète une étude de toxicité subaiguë par l'abamectine et l'effet amélioratif des vitamines E et C coadministrés, dont le protocole est détaillé par **Kara et Rahmani (2016)**. Notre expérimentation débute à partir des organes inclus dans de la paraffine (blocs de paraffine).

1.2. Matériel non biologique : Le matériel non biologique utilisés dans l'étude : l'insecticide abamectine, les vitamines C et E, verrerie classique, appareillages et réactifs chimiques du laboratoire d'anatomopathologie (Annexe1).

2. Méthodes

2.1. Taxonomie du lapin

L'étude a portée sur 20 lapins mâles de souche locale Algérienne (**Figure 14**). La position Taxonomique du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est la suivante (**Lebas et al., 1984**).

Règne : **Animal**

Embranchement : **Vertébrés**

Classe : **Mammifère**

Super ordre : **Glires**

Ordre : **Lagomorphe**

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

Sous-famille : **Leporinae**

Genre : *Oryctolagus*

Espèce : *Oryctolagus cuniculus*



Figure 13 : lapin male (*Oryctolagus cuniculus*)

2.2. Répartition des lots : Vingt lapins males ont été répartis en quatre lots comme suite :

-1^{er} lot control négatif : lot témoin recevant de l'eau distillée.

-2^{eme} lot control positif : lapin traité par les deux vitamines C et E.

-3^{eme} lot ABM : lapin traité par l'abamectine.

-4^{eme} lot ABM+VitC+VitE : lapin traité par la Vitamine C E et l'abamectine.

A la fin de l'expérience (21 jours), les lapins ont été euthanasiés et sacrifiés par décapitation cervicale et leurs organes ont été prélevés, l'intestin rapidement prélevé et lavé à l'eau puis fixé pour l'étude histologique et immunohistochimique.

2.3. Etude histologique

L'intestin a été coupé en petit fragment et déposé dans des cassettes en plastique, puis soumis aux étapes de l'étude histologique. La confection des blocs et les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du service d'anatomie pathologique (**CHU Koléa**). 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. Elle permet de préserver les structures tissulaires dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. La rapidité de l'opération ne suffit pas à assurer la qualité de la fixation : il faut que le fixateur pénètre le plus vite possible à l'intérieur des tissus.

Le but de la fixation est 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 le sacrifice des animaux et prélèvement des organes. Des fragments de l'intestin ont été mis dans le formol à 10% fixateur classique le plus utilisé, il permet de durcir l'échantillon sans pour autant l'abimer, les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées à fin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent.

2.3.2. Circulation

Etape consistant à faire pénétrer la paraffine au sein du tissu, comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, d'où la substitution par le xylène.

- **Déshydratation** : Elle se fait par immersion des cassettes (contenant les fragments de l'intestin) dans des bains d'alcool de degré croissant (70°, 90°, 100°) pendant 1/2 heure par bain pour éliminer l'eau des tissus.

- **Eclaircissement** : Les cassettes sont immergées dans du xylène, quatre bains de xylène (30 minutes par bain) ont été effectués, ils servent à remplacer l'alcool dans les tissus à fin que celui-ci soit miscible dans la paraffine.

- **Imprégnation de la paraffine** : Dernière étape de la circulation, la paraffine doit être chauffée pour se liquéfier, dans deux bains successifs de paraffine pure fondue à 60°C, à fin d'éliminer le xylène. L'ensemble des opérations sont effectuées dans un automate de type Leica pendant une durée de 12 heures.

- **Enrobage (Inclusion)** :

Permet la réalisation de coupes fines, régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine, l'inclusion a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement 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 une certaine position à fin de voir toutes les structures désirées lors de l'observation microscopique).
- Placer les cassettes au-dessus des moules. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine dur, incluant le fragment prélevé.
- Démoulage des blocs : Cette étape se fait grâce à l'automate d'inclusion. La partie froide de l'automate à inclusion permet de refroidir les blocs rapidement.

2.3.3. Réalisation des coupes

Les cassettes de paraffine contenant les prélèvements sont fixées sur un microtome de type Leica pour réaliser des rubans de coupes d'organes à épaisseur de 2 à 4 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont plongés dans un bain-marie à fin d'éviter qu'ils se replient sur eux-mêmes puis étalés sur des lames porte-objets. Les lames portant les coupes de l'organe sont séchées dans une étuve à 100°C afin de permettre un déparaffinage.

2.3.4. Coloration histologique H&E

Selon les étapes suivantes :

- **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 (5 minutes par bain).

- **Hydratation** : Sert à retirer le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau. L'agent utilisé est l'alcool (3 bains de 2 minutes chacun à concentration décroissante 100°, 90°, 70°), suivi d'un rinçage de 3 à 5 min à l'eau courant.
- **Coloration Hématoxylène-Eosine (HE)**

C'est une coloration usuelle adoptée en anatomie pathologique. Elle passe par les étapes suivantes :

- Un bain d'hématoxylène de Harris (un colorant basique nucléaire) pendant 6 min à fin de colorer les noyaux en bleu.
- Rinçage des lames à l'eau courant.
- La coloration avec l'éosine (un colorant acide cytoplasmique) pour colorer le cytoplasme pendant une minute.
- Rinçage des lames à l'eau courant.
- Séchage dans l'étuve.

- **Montage des lames**

Le montage est la dernière étape de la préparation des lames pour la lecture sous microscope. Les coupes colorées sont protégées par des lamelles en utilisant l'Eukitt qui favorise le collage lamelle sur lame. Il a pour but de protéger les coupes contre la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent facilement à l'air. Après montage, les lames sont séchées à l'aide d'une compresse stérile et nettoyées au xylène. Elles sont alors prêtes pour l'observation microscopique.

- **Etude microscopique**

L'observation des lames a été faite à l'aide d'un microscope photonique de type Leica. Le grossissement 4 nous a permis de voir la forme globale de l'organe, et le grossissement 10, 40 et 100 nous ont permis d'observer la structure et l'agencement des tissus dans l'organe.

2.4. Etude immunohistochimique (IHC) :

2.4.1. Principe :

C'est une méthode qui permet de détecter des protéines dans des sections de tissu. A cet effet, les sections sont exposées à des anticorps marqués dirigés contre des épitopes de la protéine cible. Le complexe antigène anticorps est révélé par une réaction chimique (enzymatique colorimétrique) grâce à une enzyme et son substrat.

En anatomie pathologie l'IHC a un but : thérapeutique, pronostique, diagnostic permettant de classer une tumeur et définir son stade et son origine.

2.4.2. Mode opératoire :

Dans notre étude nous avons utilisé la technique peroxydase anti-peroxydase (PAP) du kit DAKO il s'agit d'un système d'amplification utilisant un second anticorps servant de liaison entre l'anticorps primaire et le complexe PAP. Le protocole DAKO se fait en 2 phases :

- La préparation des lames.
- La sélection et marquage des anticorps sur les lames.

2.4.3. Etapes de l'IHC

- **Réalisation des coupes**

- Pour une bonne méthode d'IHC les coupes doivent être épaisses de 5 μm afin de bien visualiser le marquage.
- L'étalement des coupes se fait sur des lames Silanisées électro-statiquement équilibrées pour éviter le décollement des coupes en température élevée, sans donner de bruits de fond.
- Le séchage : Les lames sont séchées dans une étuve à 56°C pendant toute une nuit.

- **Déparaffinage**

Durant cette étape :

- Les lames sont mises dans 3 bacs de xylène (xylène 1 , xylène 2 , xylène 3) 5 minutes chacun , puis dans 3 bacs d'alcool absolu (alcool 1 , alcool 2 , alcool 3) 5 minutes chacun .
- Entre temps on allume le bain marie à 97°C et on prépare la solution de démasquage TRS elle est préchauffée au micro-onde pendant 3.30 minutes afin qu'elle ait la même température que le bain marie.

La solution de démasquage est une solution peptonée, citratée, riche en Ca^{+2} . Ce dernier permet la libération des épitopes.

- Rincer les lames 3 fois dans l'eau distillée pendant 5 minutes.
- Mettre les bacs remplis de TRS + les lames au bain marie pendant 45 minutes à 97°C.
- Après 45 minutes, sortir les bacs du bain marie, laisser refroidir pendant 20 minutes à température ambiante.
- Rincer à l'eau de robinet 1 fois, puis à l'eau distillée.
- Préparer d'une chambre humide.
- Incuber les lames dans la chambre humide, obscure (parce que la lumière absorbe la positivité et la chaleur inhibe l'action des enzymes).
- A l'aide d'un DAKO-PEN, entourer les fragments pour éviter le déversement des marqueurs.

- **Blocage de la peroxydase endogène**

Durant cette étape il faut :

- Ajouter la peroxydase pendant 5 minutes pour bloquer la peroxydase endogène.
- Le rinçage des lames se fait dans 2 bacs 5 minutes chacun dans une solution de rinçage PBS (il s'agit d'une solution saline, tamponnée, concentré en tween à ph =7) afin d'éliminer les liaisons non spécifiques.

- **Application de l'anticorps primaire**

Durant cette étape il faut :

- Remplir les fragments entourés par l'anticorps (anti- E-cadhérine) (PA0387).
- Mettre les lames à l'abri de la lumière pendant 45 minutes.
- Rincer les lames dans 2 bacs remplis de PBS (5 minutes chacun).

- **Application de l'anticorps secondaire**

Il s'agit d'un amplificateur HRP (IgG anti-lapin) couplé à la peroxydase de raifort, durant cette étape il faut :

- Mettre les lames à l'abri de la lumière pendant 30 minutes.
- Rincer les lames 2 fois au PBS (5 min chacun).

- **Coloration DAB**

- Dilution d'1cc (1000 µl) de substrat buffer dans 1 goutte de DAB (chromogène).
- Application sur chaque lame 5 à 8 minutes.
- Apparition d'une coloration brunâtre permettant de visualiser le complexe (antigène-anticorps).
- Rinçage des lames dans 2 jusqu'à 3 bacs d'eau distillée.

- **Contre coloration**

Durant cette étape il faut :

- Déposer l'hématoxyline de mayer sur chaque lame pendant 5 minutes, cela permet de mettre en évidence le noyau coloré en bleu violet.
- Rincer les lames à l'eau de robinet jusqu'à l'obtention d'une eau claire, puis rincer à l'eau distillée.

- **Montage les lames**

Durant cette étape il faut :

- Déposer 2 gouttes de faramount aqueous (il s'agit d'une colle) par lame.
- Diluer les lamelles dans l'eau distillée.
- Déposer les lamelles sur les lames, bien appuyer afin de chasser les bulles d'air.

- Rincer à l'eau distillée.
- Sécher à l'aide d'une compresse stérilisée.
- Observation microscopique.

Etude bioinformatique de la E-cadhérine

Le but de cette étude est d'établir un arbre phylogénétique de la E-cadhérine humaine et les différentes espèces et aussi d'aligner la séquence E-cadhérine avec les différents isoformes chez le lapin.

NCBI

Le NCBI réalise des recherches dans la biologie informatique, développe des logiciels pour analyser des données de génome et notamment il fournit des informations biomédicales. 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 E-cadhérine 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.

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 E-cadhérine, 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 E-cadhérine, pour trouver les régions les plus touchées par les mutations sur la protéine, et pour aligner les isoformes de la E-cadhérine chez le lapin avec la E-cadhérine humaine . <https://www.uniprot.org/align/>

CHAPITRE III
RESULTATS
ET
DISCUSSION

RESULATATS ET DISCUSSION

Notre travail s'intéresse aux variations histologiques de l'iléon et immuno-histochimiques de l'expression de la protéine inter-jonctionnelle E-cadhérine au niveau de l'iléon chez le lapin traité par un insecticide de la famille des avermectines 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 de l'iléon chez le lapin témoin en comparaison avec le traité par l'ivermectine et celui traité par ivermectine et co-administré à la vitamine C et E.
- Etude immunohistochimique (IHC) de l'expression de la protéine E-cadhérine chez les quatre lots.
- Etude bioinformatique du gène CDH1.

RESULTATS

1. ETUDE HISTOLOGIQUE

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 Histologie de l'iléon des lapins témoins

L'observation d'une coupe histologique au fort grossissement montre la présence d'une muqueuse normale avec des villosités (V) et des cryptes (C) peu profondes, elle est constituée d'un épithélium à cellules caliciformes suivi d'une sous muqueuse (SM) caractérisée par la présence de plaque de peyer (PP), suivie d'une musculature constituée d'une couche circulaire interne (CMC) et une couche longitudinale externe (CML) l'ensemble est recouvert d'un tissu conjonctif l'adventice (A) (**Planche 1**).

1.2 Histologie de l'iléon 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 à celle des témoins composée d'une muqueuse, une sous muqueuse, une musculature constituée d'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 à cellules caliciformes suivi d'une sous muqueuse (SM) caractérisée par la présence de plaque de peyer (PP) (**Planche 2**).

1.3 Histologie de l'iléon 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 plaques de peyer (HPP) 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**).

1.4 Histologie de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.

L'observation d'une coupe histologique au fort grossissement montre une structure moins altérée au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse intestinale (SM) avec absence d'hyperplasie des plaques de peyer (HPP). 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 de l'iléon des lapins témoins

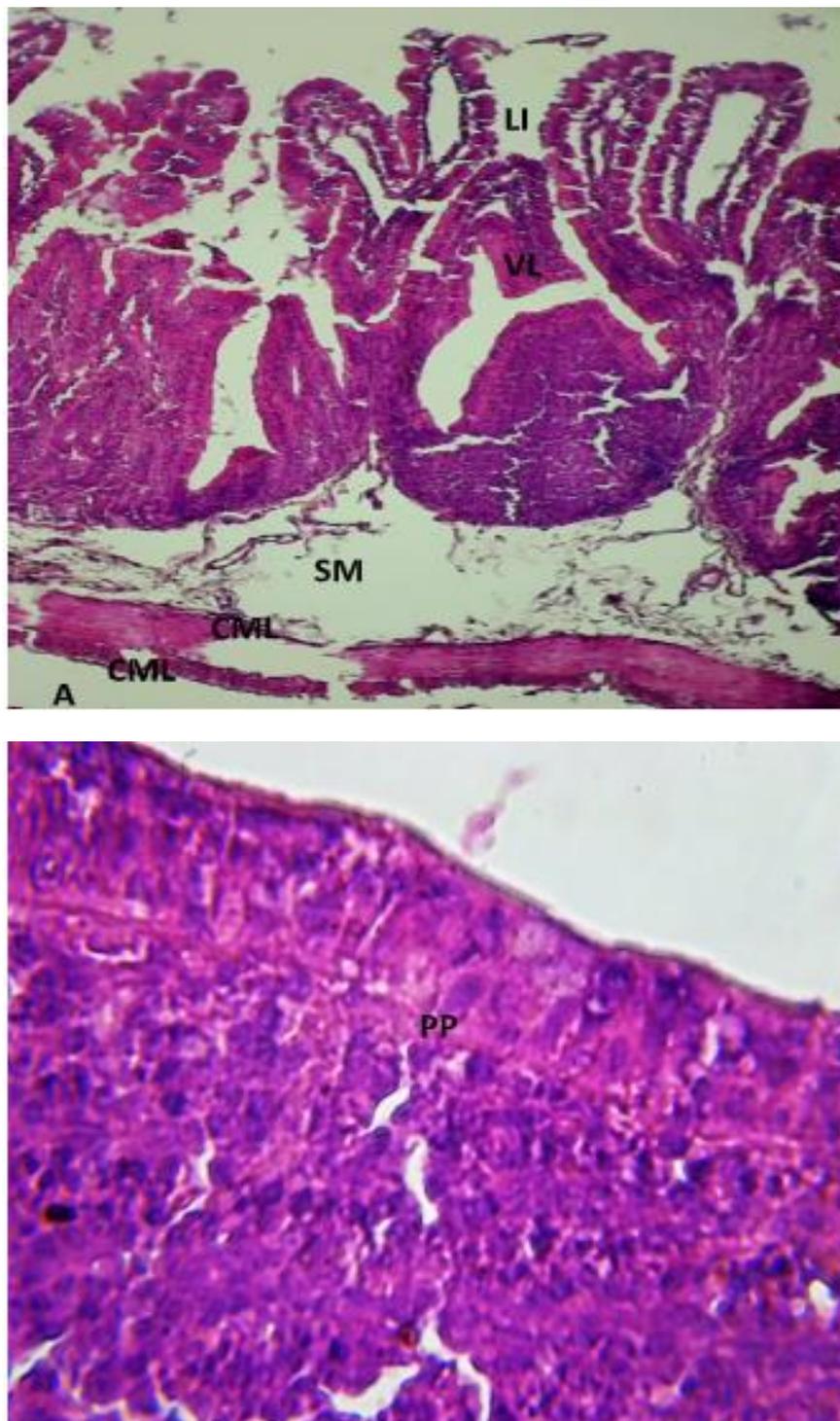


Planche 1 : Histologie de l'iléon des lapins témoins coloration H&E.

Grossissement : **A** : Gr×10 ; **B** : Gr×40

VI : villosités intestinales, **PP** : plaques de Peyer, **LI** : lumière intestinale, **A** : adventice, **CMC** : couche circulaire interne, **SM** : sous muqueuse, **CML** : couche longitudinale externe

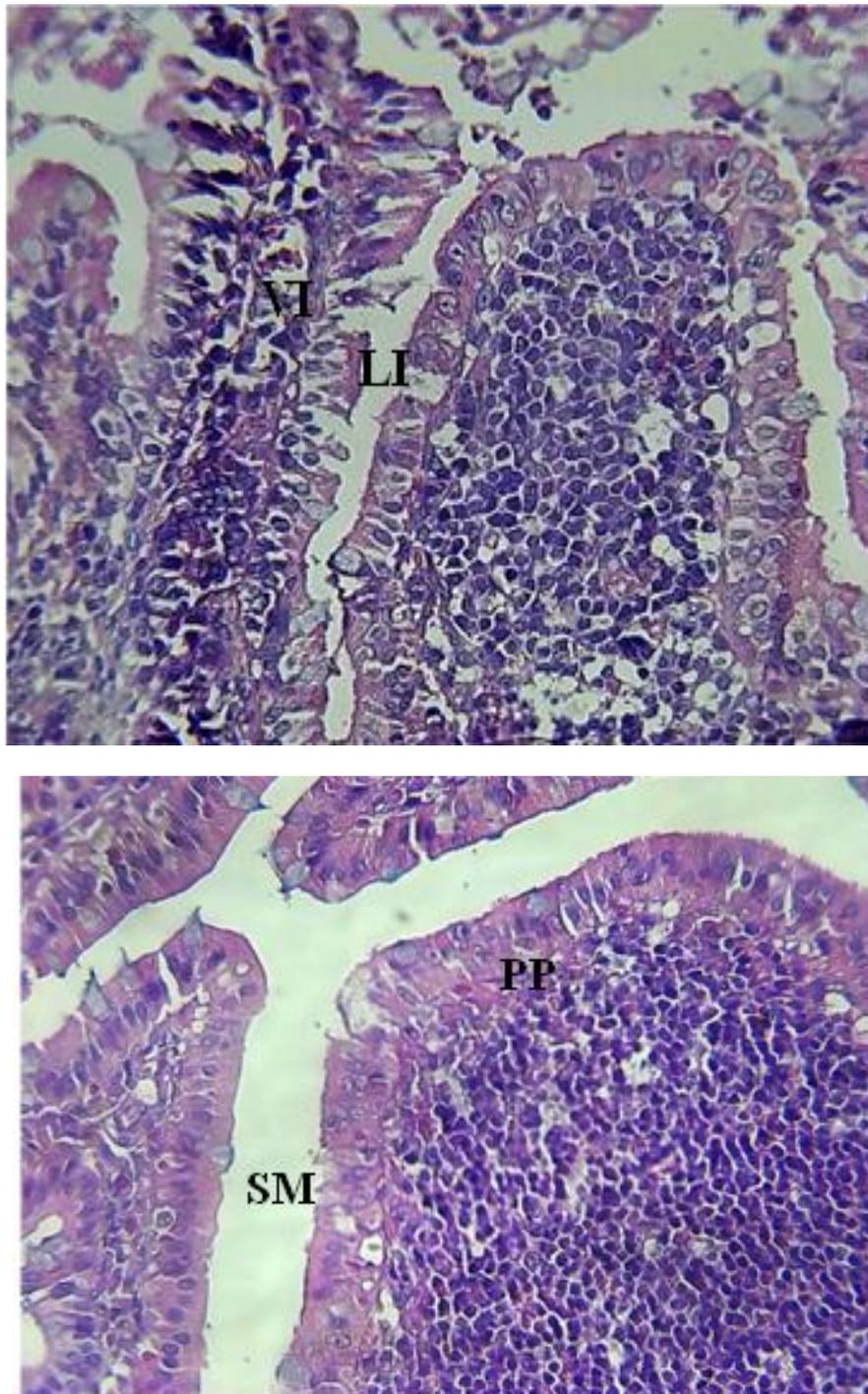
Histologie de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E.

Planche 2 : Histologie de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E coloration H&E, Grossissement : A : Gr×10 ; B : Gr×40

VI : villosités intestinales, **PP** : plaques de Peyer, **LI** : lumière intestinale, **A** : adventice, **CMC** : couche circulaire interne, **SM** : sous muqueuse, **CML** : couche longitudinale externe

Histologie de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine.

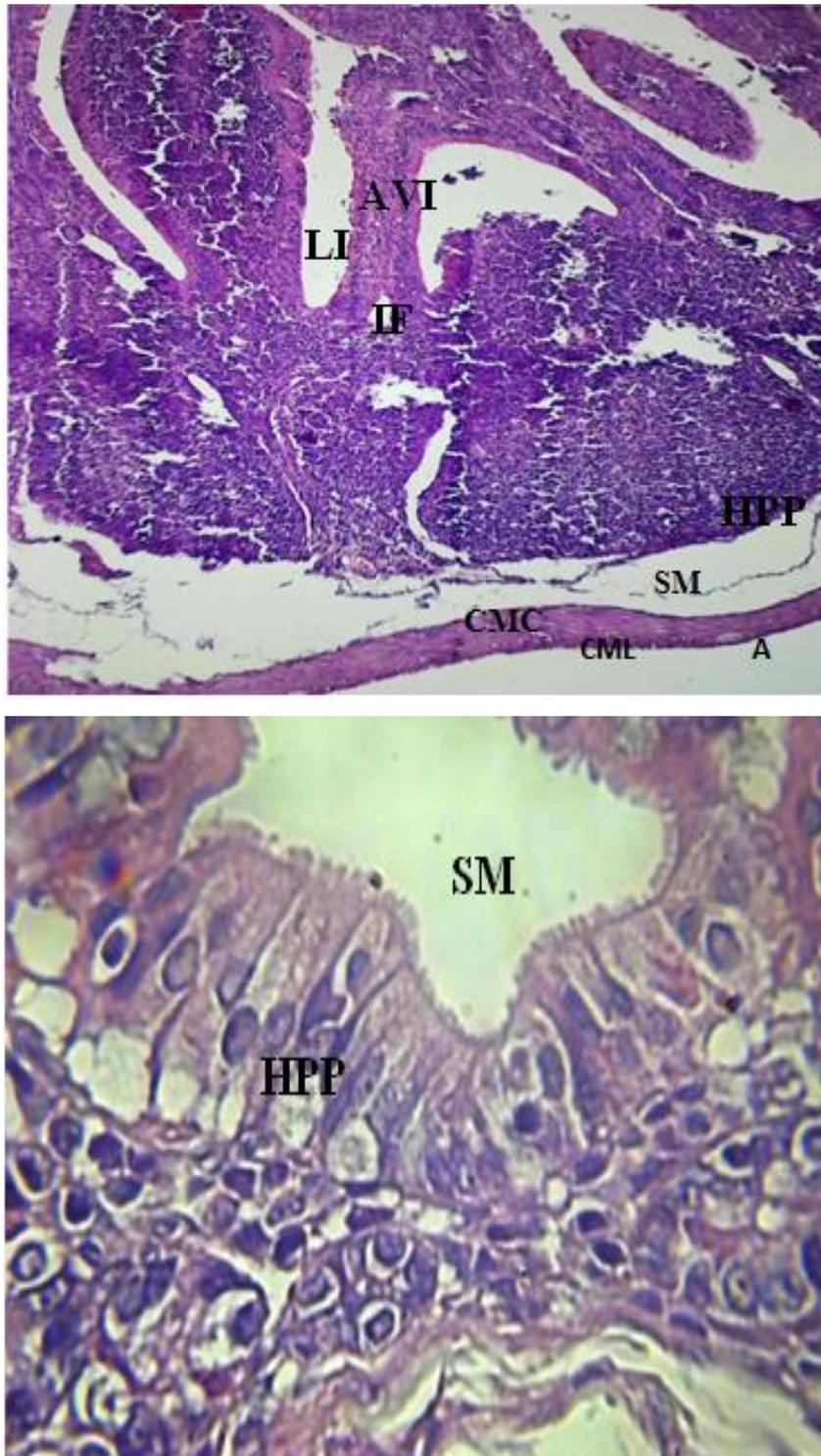


Planche 3: Histologie de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine coloration H&E,

Grossissement : A : Gr×10 ; B : Gr×40

VI : villosités intestinales, PP : plaques de Peyer, LI : lumière intestinale, A : adventice, CMC : couche circulaire interne, SM : sous muqueuse, CML : couche longitudinale externe

Histologie de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E.

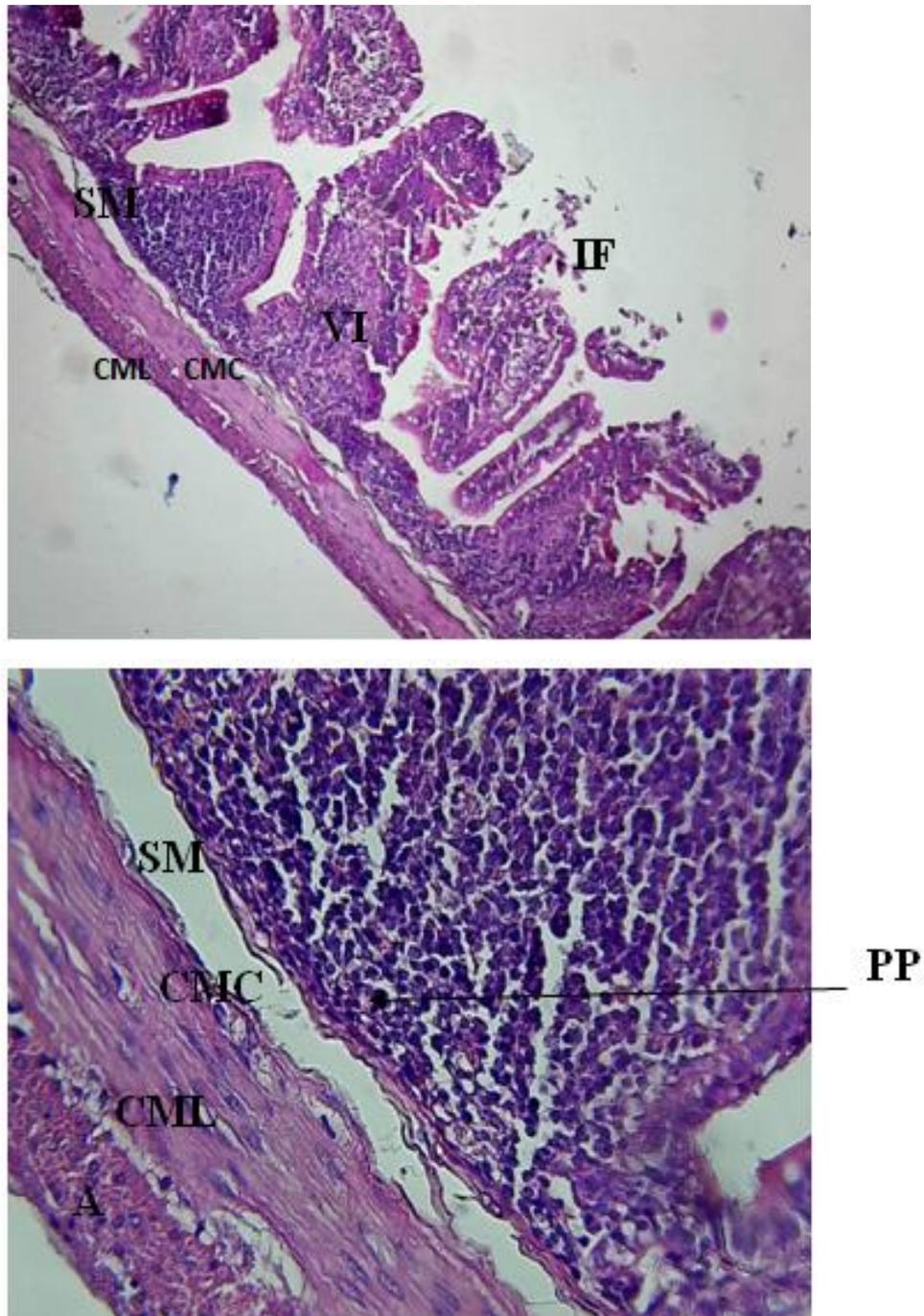


Planche 4: Histologie de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E coloration H&E. Grossissement : **A : Gr×10 ; B : Gr×40**

VI : villosités intestinales, **PP :** plaques de Peyer, **LI :** lumière intestinale, **A :** adventice, **CMC :** couche circulaire interne, **SM :** sous muqueuse, **CML :** couche longitudinale externe, **IF :** infiltrat inflammatoire.

2. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE (IHC)

L'IHC de la E-cadhérine : les planches 5, 6, 7 et 8 montrent l'expression de la protéine E-cadhérine 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 IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins témoins

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif membranaire complet intense. Au fort grossissement, on observe un marquage cytoplasmique très faible incomplet et on remarque une absence des lésions (pas de nécrose/apoptose ; pas d'hyperplasie des plaques de Peyer ; pas d'inflammation) (**planche 5**).

2.2 IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif membranaire hétérogène. Au fort grossissement, on observe un marquage cytoplasmique complet intense et focal, une hyperplasie villositaire, une hyperplasie des plaques de Peyer et des modifications nucléaires (pseudo-stratification des noyaux hyperchromes) (**Planche 6**)

2.3 IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif membranaire intense et complet. Au fort grossissement, on observe une positivité cytoplasmique focale modérée, on remarque la présence de réactions inflammatoires et d'infiltrat polymorphe (**planche 7**).

2.4 IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par les vitamines C et E

L'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif membranaire complet. Au fort grossissement, on observe une positivité cytoplasmique faible en surface, un relief villositaire normal et de faibles lésions nucléaires (**Planche 8**).

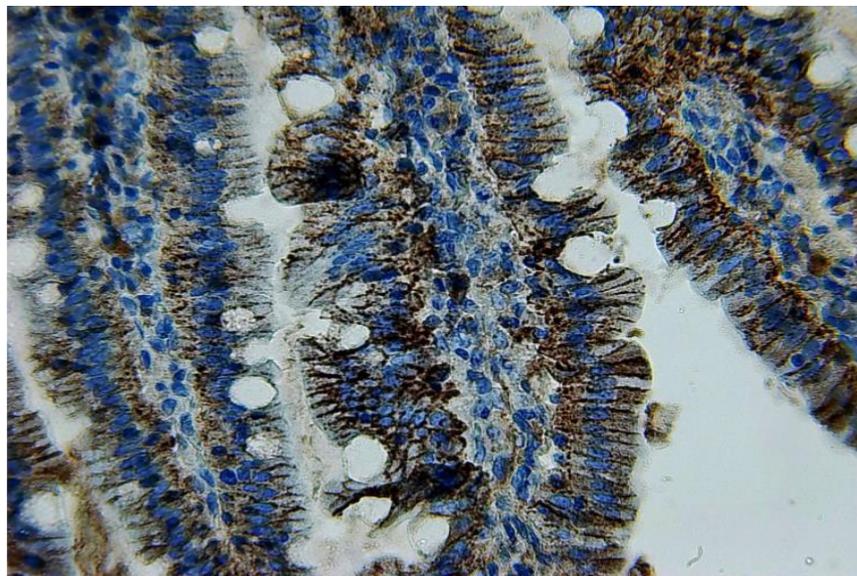
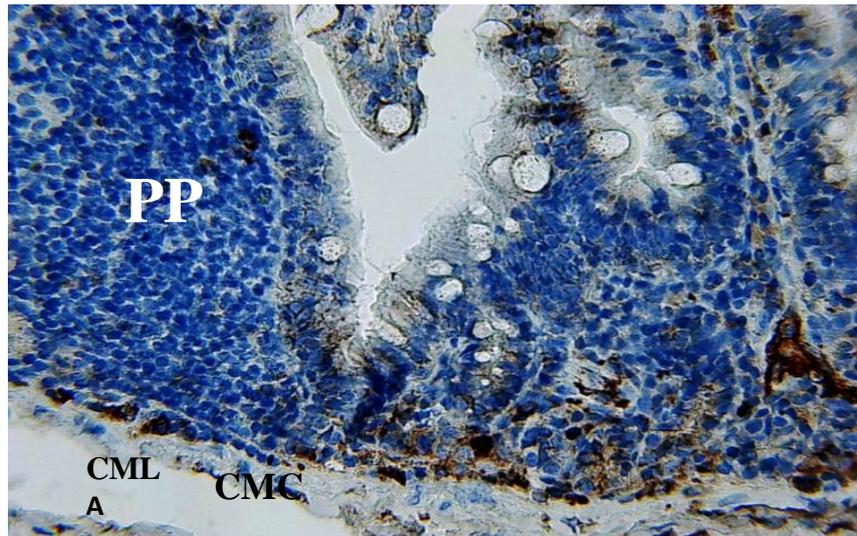
IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins témoin

Planche 5 : IHC de la protéine E-cadhérine au niveau de l'iléon des lapins témoins

Grossissement : **A : Gr×10 ; B : Gr×40**

VI : villosités intestinales, **PP :** plaques de peyer , **LI :** lumière intestinale , **A :** adventice, **CMC :** couche circulaire interne , **SM :** sous muqueuse, **CML :** couche longitudinale externe, **IF :** infiltrat inflammatoire.

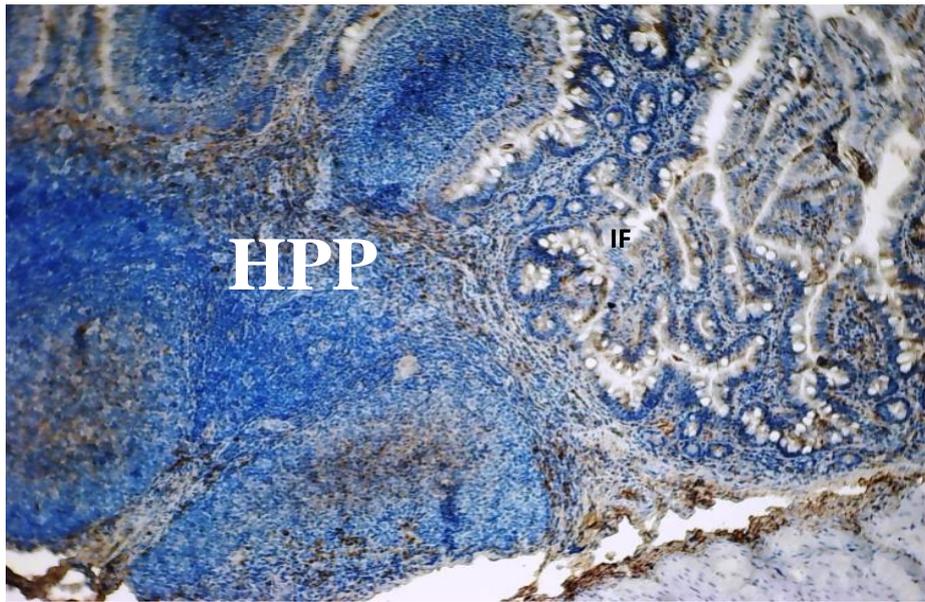
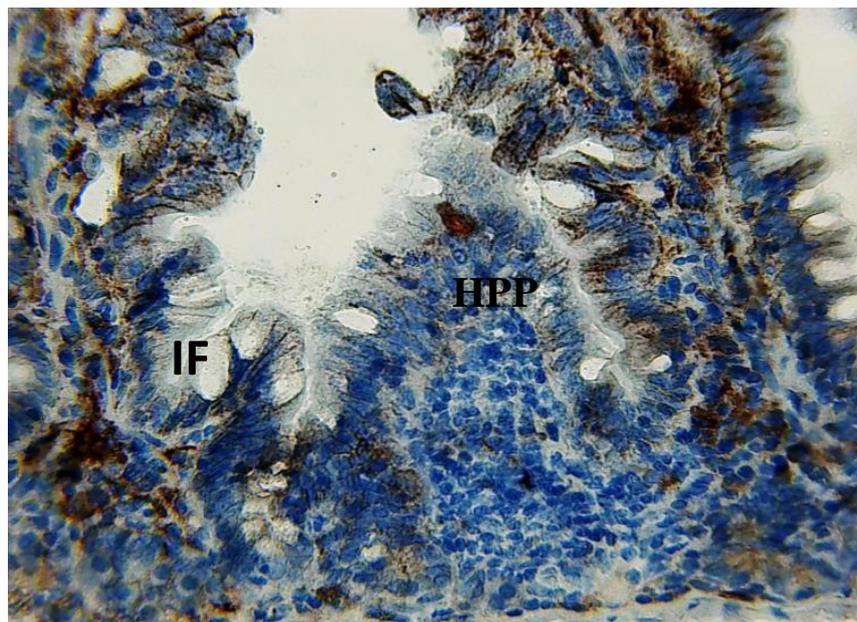
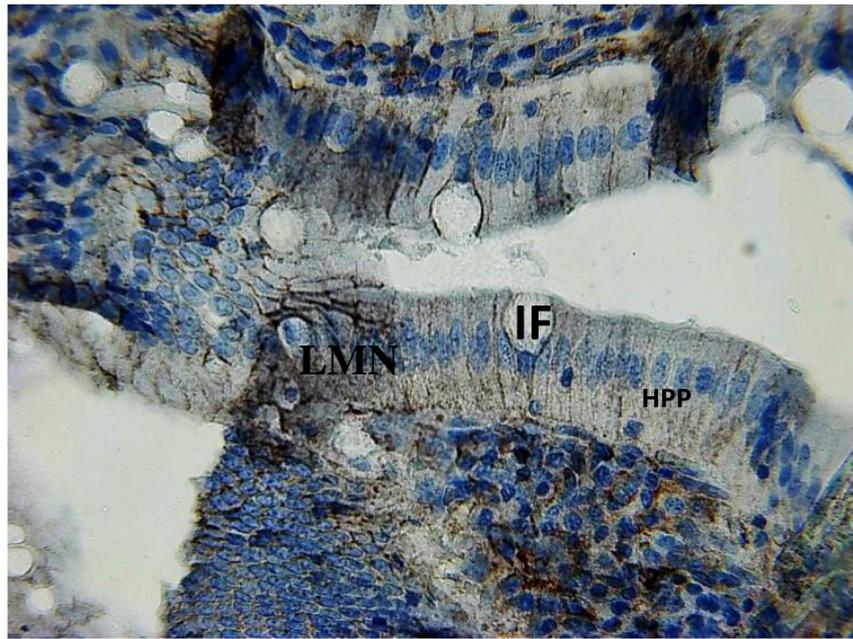
IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine

Planche 6 : IHC de la protéine E-cadhérine au niveau de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine. Grossissement : **A : Gr×10 ; B : Gr×40**

IF : infiltrat inflammatoire, **HPP :** hyperplasie de plaques de payers.

IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E**Planche 7** IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins supplémentés par les vitamines C et E.Grossissement : **A : Gr×10 ; B : Gr×40****IF** : infiltrat inflammatoire, **HPP** : hyperplasie des plaque de peyer,

IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'avarmectine et supplémentés par les vitamines C et E

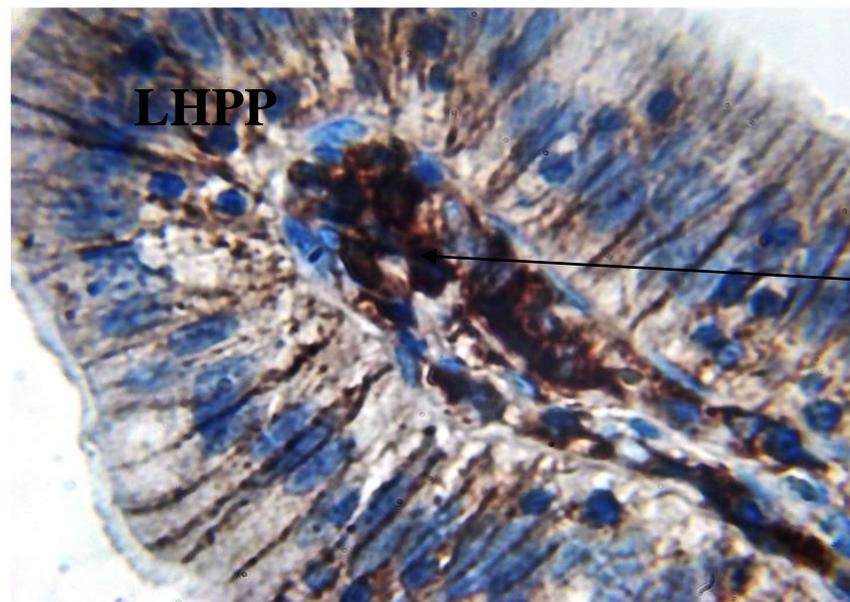
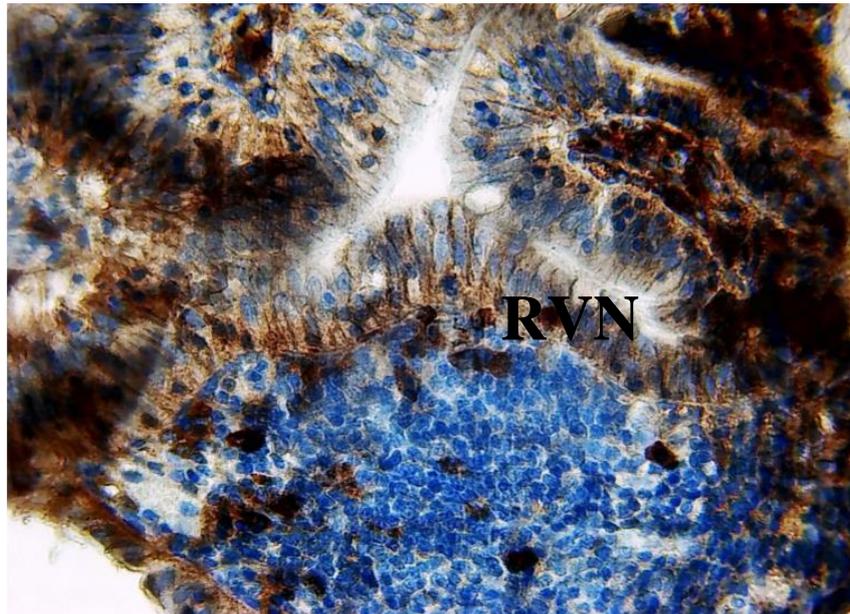


Planche 8 : IHC E-cadhérine de l'iléon des lapins traités par l'avarmectine et supplémentés par les vitamines C et E. A :Gr X 10 et B : Gr X 40. **ACVN** : axe conjonctif de villosité normal, **RVN** : reliefs villositaire normales, **LHPP** : légère hyperplasie de plaques de peyer.

3. RESULTATS BIOINFORMATIQUE

3.1. Analyse Bioinformatique de la E-cadhérine chez le lapin

Très peu de données concernant la E-cadhérine sont déposés sur les différentes bases données bioinformatiques encore moins les données relatives aux différents organismes modèles à savoir le lapin.

Chez l'humain

CDH1 cadherin 1 [*Homo sapiens* (human)]
Gene ID: 999, updated on 30-Aug-2020

Summary  

Genomic context  

Location: 16q22.1 [See CDH1 in Genome Data Viewer](#)

Exon count: 16

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
109.20200815	current	GRCh38.p13 (GCF_000001405.39)	16	NC_000016.10 (68737292..68835537)
105	previous assembly	GRCh37.p13 (GCF_000001405.25)	16	NC_000016.9 (68771128..68869445)

Chromosome 16 - NC_000016.10

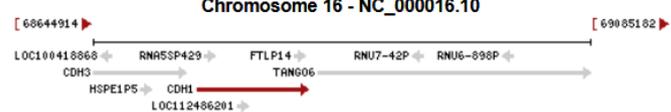


Figure 14: Localisation de la E-cadhérine chez l' humain.

 **Chez le lapin**

CDH1 cadherin 1 [*Oryctolagus cuniculus* (rabbit)]
 Gene ID: 100356548, updated on 24-Jun-2020

Summary

Genomic context

Location: chromosome: 5 See CDH1 in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 16

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
102	current	OryCun2.0 (GCF_000003625.3)	5	NC_013673.1 (24238733..24306348)

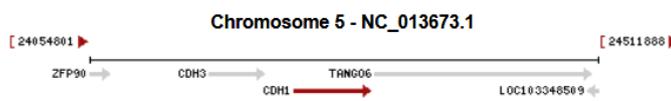


Figure 15 : Localisation de la E-cadhérine chez le lapin.

 **Chez le poisson zèbre**

cdh1 cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) [*Danio rerio* (zebrafish)]
 Gene ID: 114424, updated on 25-Aug-2020

Summary

Genomic context

Location: chromosome: 7 See cdh1 in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 16

Annotation release	Status	Assembly	Chr	Location
106	current	GRCz11 (GCF_000002035.6)	7	NC_007118.7 (53096255..53117237, complement)
105	previous assembly	GRCz10 (GCF_000002035.5)	7	NC_007118.6 (52826603..52847585, complement)
103	previous assembly	Zv9 (GCF_000002035.4)	7	NC_007118.5 (56206925..56228079)

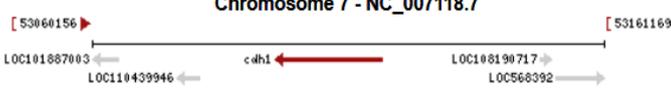


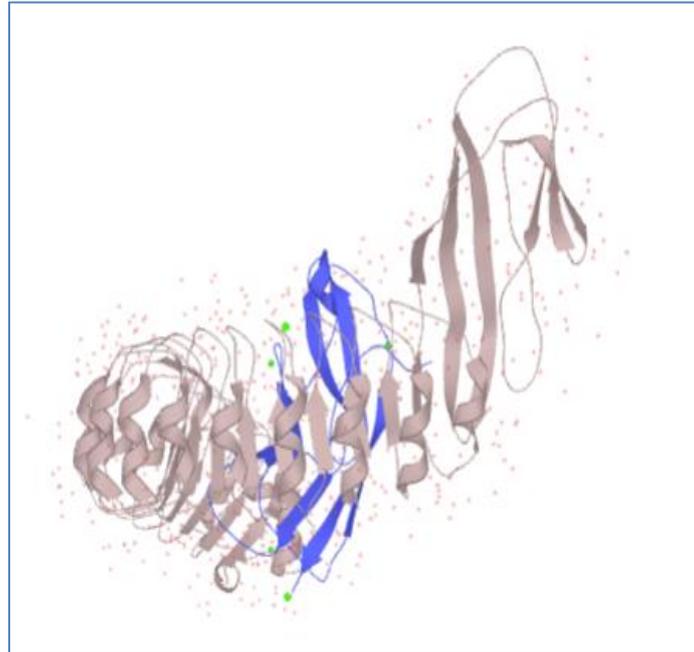
Figure 16 : Localisation de la E-cadhérine chez le poisson zebre.

3.2. Analyse de la structure 3D de l'E-cadhérine

Chez l'humain

Length:882

Mass (Da):97,456



Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
244	D → G in HDGC.  1 Publication  Corresponds to variant dbSNP:rs1064794231	Ensembl, ClinVar.		1
487	V → A in HDGC.  1 Publication 			1
832	V → M in HDGC.  2 Publications  Corresponds to variant dbSNP:rs35572355	Ensembl, ClinVar.		1

Figure 17 : Quelques mutations répertoriées chez l'homme.

 **Chez la souris**

Length:884

Mass (Da):98,256



Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
172	E → P: Adheres to and takes up L.monocytogenes InIA coated beads.  1 Publication ▾			1
220	Q → E: Increased affinity for L.monocytogenes InIA. Greatly increased affinity; when associated with P-172.  1 Publication ▾			1

Figure 18 : Quelques mutations répertoriées chez la souris.

3.3. Analyse phylogénétique



Figure 19 : Alignement de la séquence E-cadhérine (humain, souris, rat et chien).

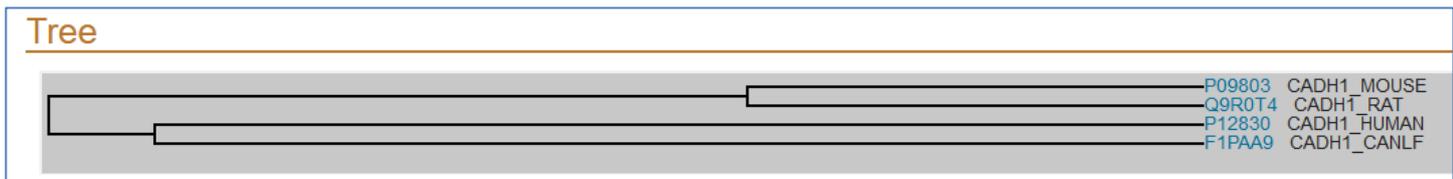


Figure 20 : Arbre phylogénétique de la E-cadhérine (humain, souris, rat et chien).

4. Discussion

Dans la présente étude nous nous sommes intéressés à la recherche des altérations histologiques et immunohistochimiques de la muqueuse intestinale (iléon), après un traitement par un insecticide avermectine et à l'effet amélioratif possible d'une supplémentation vitaminique C et E suite à une toxicité subaigüe chez le lapin male de souche locale « *Oryctolagus cuniculus* ».

Par une étude immunohistochimique de l'expression d'une molécule d'adhérence cellulaire « la protéine E-cadhérine » nous avons prospecté l'effet de l'insecticide et la supplémentation en vitamines C et E, deux puissants antioxydant, sur l'expression du gène CDH1 dans le stress causé par l'insecticide. Nos résultats ont été soutenus par une étude bioinformatique de l'expression de la protéine E-cadhérine.

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. 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 de l'iléon. Les observations réalisées sous microscope des coupes de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine, mettent en évidence une désorganisation de l'épithélium intestinale qui se traduit par la présence d'un infiltrat inflammatoire au niveau de l'axe conjonctif des villosités intestinales, une hyperplasie des plaques de Peyer, une hyperplasie villositaire et des modifications nucléaires.

Ainsi des résultats similaires ont été également constatés après l'administration d'un régulateur de croissance le Neem dérivative chez un diptère *Culex quinquefasciatus* où ils

cause une désorganisation de l'épithélium intestinale avec des importants effets au niveau de la bordure en brosse (**Ndione et al., 2006**).

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 (ERO) (**Gangemi et al., 2016**). Nos résultats sont en accord avec ceux de **Vismaya et Rajini, (2014)** qui ont montrés un dysfonctionnement de l'intestin grêle avec une hyperplasie des cellules caliciformes chez le rat traité par un insecticide organochloré le Monocrotophos.

De plus il est fort probable que les pesticides diminuent l'immunité non spécifique (**Koprucu et al., 2006**). Donc Les pesticides provoquent l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui à son tour génère le stress oxydatif dans différents tissus (**Filiz et al., 2011**).

Les vitamines E et C semblent être les plus puissant et importants antioxydants dans la lutte contre le stress oxydant (**Lobo et al., 2010**). . La vitamine E est une vitamine liposoluble, elle se fixe aux membranes et séquestre les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique, assurant ainsi la protection des membranes cellulaires, prévient le vieillissement des cellules et aide à maintenir la santé du système immunitaire (**Bourgeois, 2003**) .

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble, c'est un stimulateur majeur du système immunitaire, elle joue le rôle dans la détoxification des xénobiotiques (**Padayatty et al., 2003**), et permet ainsi une meilleure efficacité de la vitamine E.

Dans notre étude nous avons constaté que la supplémentation de la vitamine C et E diminuer l'effet toxique de l'insecticide. Ce qui permet d'expliquer nos résultats histologiques chez les lapins traités par l'insecticide et cosupplémenté par les vitamines C et E ou l'inflammation n'a pas touchée l'ensemble des animaux.

Nous avons constaté que l'architecture tissulaire de la paroi de l'iléon des lapins traités par l'ivermectine et supplémentés par la vitamine C et E se rapprochent de ceux de celle des lapins témoins. Ces résultats sont similaires aux résultats trouvés par **Aissani, (2013)** sur l'effet protecteur de la vitamine C et E suite à une toxicité par le bio pesticide PROCLAIM de la famille des avermectines chez le rat Wistar.

La protéine E-cadhérine est un composant central des jonctions épithéliales adhérentes,

essentielle pour le développement, différenciation et maintenance des tissus. Elle est également fondamentale pour la formation de la barrière tissulaire des tissus épithéliaux. L'intestin grêle est bordé d'une monocouche épithéliale qui englobe une barrière dépendante de la E-cadhérine, critique pour l'homéostasie intestinale (**Daulagala et al., 2019**).

L'observation immunohistochimique a révélée un immunomarquage membranaire et/ou cytoplasmique positive de l'expression de la protéine E-cadhérine chez les animaux traités. Ce résultat peut-être expliqué par le fait que La E-cadhérine possède une partie membranaire responsable de l'ancrage à la membrane plasmique (**Hartsock and Nelson, 2008**).

L'expression cytoplasmique peut être expliquer par le relargage de E-cadhérine, dans le cytoplasme au cours d'un stress oxydatif, donc une phosphorylation par la kinase SRC de la protéine E-cadhérine induit la dissociation et la rupture des jonctions adhérentes (**Owens et al., 2000**). Ce qui provoque la perte des contacts cellulaires et active la motilité cellulaire (**Fujita et al., 2002**).

L'Anoikis est connu comme un type spécial de mort cellulaire programmée qui se produit en réponse à la perte de connexions correctes cellule-matrice extracellulaire (MEC). Ce processus est un événement pivot dans le développement normal et l'homéostasie tissulaire (**Ehsan Kakavandi et al., 2018**). La perturbation des complexes E-cadhérine-cytosquelette, sous l'effet de la perte d'adhérence cellule-matrice, pourrait participer à l'induction de l'anoïkis des entérocytes, suite à la rupture des interactions avec la lame basale, les cellules intestinales enclenchent un programme d'apoptose.

La E-cadhérine disparaît des contacts cellule-cellule précocement, avant l'apparition de la morphologie apoptotique des noyaux, il semble donc que la disparition de la E-cadhérine soit un événement situé relativement en amont dans la cascade apoptotique induite par le détachement des entérocytes (**Fouquet et al., 2004**). ceci peut-être expliqué par l'expression cytoplasmique légère de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle chez les lapins cosupplémenté avec les vitamines C et E.

L'homéostasie de l'épithélium intestinal est maintenue par l'équilibre entre prolifération, apoptose et différenciation. Le renouvellement de l'épithélium est dû au contact direct qu'il exerce avec le milieu extérieur, la lumière intestinale. 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 de la protéine E-cadhérine au niveau apical des villosités

intestinales qui témoigne la régénération des entérocytes par anoikis.

Le tractus gastro-intestinal contient un nombre et une variété considérables de cellules immunes d'origine hématopoïétique, disséminées dans la zone sub-épithéliale (la *lamina propria* ou chorion), qui coopèrent avec l'épithélium pour renforcer la barrière intestinale. Les plaques de Peyer sont des acteurs majeurs du tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT, *mucosa associated lymphoid tissue*).

Il s'agit d'agrégats de follicules lymphoïdes principalement retrouvés dans l'iléon et le côlon. Les plaques de Peyer sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes présents dans la lumière intestinale et dans leur présentation au système immunitaire sous-jacent (**Kiyono et Fukuyamas, 2004**).

Cette fonction est rendue possible par la présence, au niveau de l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer, de cellules spécialisées appelées cellules M. Les cellules M ont un fort pouvoir de transcytose, ce qui permet aux antigènes présents dans la lumière intestinale de traverser la barrière épithéliale. La présentation antigénique aboutit à l'activation de lymphocytes T et B et à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative.

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 E-cadhérine 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 E-cadhérine des plaques de peyers.

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

Dans notre étude nous avons remarqué que l'administration de l'ivermectine a provoqué une surexpression cytoplasmique de la E-cadhérine 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 diminuée l'expression cytoplasmique de la E-cadhérine probablement suite à une réduction de l'accumulation des radicaux libres.

L'étude bioinformatique consiste à construire un arbre phylogénétique du gène E-cadhérine entre les différentes espèces et d'aligner la séquence de la E-cadhérine de ces espèces afin de déduire les mutations qui peuvent survenir .

Selon l'étude bioinformatique on a remarqué que le gène CDH1 possède différentes localisations chromosomiques dans les espèces étudiées, chez l'être humain le gène CDH1 est localisé sur le chromosome 16 , chez le lapin CDH1 est localisé sur le chromosome 5 , chez le poisson zèbre CDH1 est sur le chromosome 7. Cependant il possède le même nombre d'exons qui est de 16 chez les 3 espèces cités.

L'étude du gène CDH1 a montrée que les différentes mutations de la protéine E-cadhérine recensées sur les différentes bases de données prouvent leurs implications dans l'apparition des différents cancers. Chez l'homme les mutations répertoriées concernent plusieurs codons qui ont subits des changements d'acides aminés à savoir 244,487 ; 832.

La protéine E-cadhérine est un suppresseur de tumeurs (**Zhang et al., 2018**), des mutations germinales dans le gène de la E-cadhérine (CDH1) sont associés à un cancer héréditaire à dominance autosomique syndrome caractérisé par un cancer gastrique diffus héréditaire (HDGC), cancer du sein lobulaire (CB) (**Hansford et al., 2015**).

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Le travail réalisé nous a permis d'évaluer chez *Oryctolagus cuniculus* l'effet d'un insecticide l'ivermectine, ainsi que l'effet protecteur de la co- administration de la vitamine C et E sur l'histologie de l'iléon.

D'après les résultats obtenus, l'administration de l'ivermectine entraîne une désorganisation de l'épithélium intestinale qui se traduit par des symptômes microscopiques comme la présence d'infiltrat inflammatoire au niveau de l'axe conjonctif des villosités intestinales; une hyperplasie des plaques de Peyer, et une hyperplasie villositaire, et une modification nucléaire.

Les données histopathologique et immunohistochimique confirment la toxicité de l'ivermectine, Alors que la co- administration de la vitamine C et E restructure le parenchyme iléonale avec réduction de l'inflammation et absence de l'hyperplasie. En effet, à travers cette étude il apparaît que les vitamines C et E sont des produits intéressants dans le domaine de la thérapeutique et de la santé.

Nous avons identifiés à travers notre étude bioinformatique que le gène CDH1 peut être touché par des mutations dans différents codons ayant comme conséquence un changement dans la séquence d'acide aminé entraînant ainsi l'apparition de certaines maladies cancéreuses.

En perspectives il serait intéressant :

- ✚ Etudier la génotoxicité causée par ces xénobiotiques par d'autres méthodes plus performantes de biologie moléculaire méthode (western blot, southern blot) et la méthode de micronoyau pour pouvoir confirmer des cibles thérapeutiques.
- ✚ utiliser la E-cadherine comme un biomarqueur pour le diagnostic et pronostic du cancer.
- ✚ Sur le plan thérapeutique, la E-cadhérine pourrait servir de potentiel cible en thérapie génique ainsi qu'en pharmacogénétique.
- ✚ Une question cruciale reste à développer soit pour traiter le cancer au stade des cellules hébergeant l'expression de la E-cadhérine, soit pour ré-exprimer la E-cadhérine dans les cellules qui ont perdu son expression afin d'apporter un meilleur pronostic.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achour S, Rhalem N., Khattab A. (2011).** Les caractéristiques cliniques et thérapeutiques des intoxications par les organophosphorés : données du Centre Antipoison et de pharmacovigilance du Maroc. Santé publique.p-5.6.
- Aissani, H. (2013).** Effet protecteur de la vitamine C suite à une toxicité par un biopesticide Proclaim® chez le rat Wistar mâle, paramètres biochimiques et histologie du foie. Université Saad Dahleb Blida 1.
- 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.
- Balas D, Philip P. (2013).** Histologie générale (Histologie morphofonctionnelle des épithéliums), appareil digestif, 2003.
- 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.
- Boland J, Koomzn I, Van Lidth J, Jeude DE, Oudejans J. (2004).** les pesticides compositions, utilisation et risques.EditionAgrosdok.
- Bourgeois, C.F (2003).** Les vitamines dans l'industrie agroalimentaire, Lavoisier Paris. p 708.
- Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J. Radicaux libres et antioxydants. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. (2003).** Ed. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires .Paris : Medecine-sciences Flammarion . 59-81.
- Brazier F, Delcenserie R, Dupas JL. (2002).** Digestion et absorption dans l'intestin grêle. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Gastroentérologie*, 9-000-B-10.
- Buettner G. (1993).** The peckingorder of free radicals and antioxidants:lipidperoxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *ArchBiochemBiophys* 300:535–43.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L and Sauvaigo, S. (2002).** Recent aspects of oxidativeDNAdamage: guanine lesions, measurement and substratespecificity of DNA repairglycosylases. *Biol. Chem.* 383(6): 93 - 100.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Calvet R. (2005)**. les pesticides dans le sols. Edition France Agricole.
- Castronovo, V. (2003)**. Alimentation et cancer. Rev Med Liege; 58: 4 : 231-239
- CDU-HGE, (2014)**. « Microbiote et immunité intestinale ». Editions Elsevier-Masson .
- Claude Gagnon, (2005)**. la vitamine E : fertilité et combativité.
- Cristina M. Sabliov C. Fronczek C. E. Astete M. Khachaturyan L. Khachatryan C. Leonard, (2009)**. Effects of Temperature and UV Light on Degradation of α -Tocopherol in Free and Dissolved Form. J Am OilChem Soc 86:895–902. DOI 10.1007/s11746-009-1411-6.
- 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.
- Daulagala, A. C., Bridges, M. C., & Kourtidis, A. (2019)**. E-cadherin Beyond Structure: A Signaling Hub in Colon Homeostasis and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2756.
- Dardel, F., & Képès, F. (2002)**. *Bioinformatique: Génomique et post-génomique*. Editions Ecole Polytechnique.
- **Derai, S. A., & Kaabeche, A. (2016)**. Modélisation et dimensionnement d'un système hybride Eolien/Photovoltaïque autonome. *Revue des Energies Renouvelables*, 19(2), 265-276.
- Deléage, G., & Gouy, M. (2013)**. *Bioinformatique: cours et cas pratique*.
- Douma, S., Van Laar, T., Zevenhoven, J., Meuwissen, R., Van Garderen, E., and Peeper, D.S. (2004)**. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 430, 1034-1039.
- Dourmishev et , A. Dourmishev, L. et shwartz, A. (2005)**. Ivermectine pharmacology and application in dermatology . *International journal of dermatology* , 44(12)981-988.
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, et al., (2005)**. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* ; 123 : 903-15.
- Ehsan Kakavandi, Ramin Shahbahrani, Hossein Goudarzi, Gita Eslami, Ebrahim Faghihloo J. (2018)**. *Cell Biochem* ;119(3):2484-2491.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- El-Bakouri, H. (2006).** développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par l'utilisation des substances organiques naturelles
- Favier, A. (2003).** Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. pp : 108-115.
- Filiz, D., Fatma, G, U., Dilek, D., Yusuf, K. (2011).** Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99 ,77–81.
- Flatland, B. (2003).** Botanicals, vitamins, and minerals and the liver:therapeutic applications and potentialtoxicities. *Compendium* 25(7): 514-524.
- Fortun-Lamothe, L. Boullier, S. A . (2007).** review on the nteractions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science*, 107, 1-18.
- Fouquet S., Lugo-Martinez V. H., Faussat A. M., Renaud F., Car- dot P., Chambaz J., Pincon-Raymond M. & Thenet S. (2004).** Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of anoikis in enterocytes. *J. Biol. Chem.*, 279, 43061-43069.
- Frisch SM, Francis H. (1994).** Disruption of epithelial cellmatrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* ; 124: 619-26.
- Friedman, J. González, CA. Tepley, Q. Zhou, MP. Sulzer, SC.Collins. Grime, B. W. (2000).**Simultaneous atomic and ion layer enhancements observed in the mesopause region overArecibo during the Coqui II sounding rocket campaign, *Geophys. Res. Letters*. 27: 449-452.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., ... & Birchmeier, W. (2002).** Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature cell biology*, 4(3), 222-231.
- 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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Garabedian, E. M., Roberts, L. J., McNevin, M. S., and Gordon, J. I. (1997).** Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 272, 23729-23740.
- Gatignol C et Etienne J.C. (2010).** pesticides et santé . Rapport de l'office partenaire d'évolution des choix scientifiques et techniques.
- Gidenne, T. et Lebas, F. (2005).** Le comportement alimentaire du lapin.
- Gilmore, A. P. (2005).** Anoikis. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1473-7.
- Gibas, C., & Jambeck, P. (2002).** *Introduction à la bioinformatique*. O'Reilly France.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (1999).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd édition. Oxford:ClarendonPress.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008).** Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 660-669.
- 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.
- Hansford, S., Kaurah, P., Li-Chang, H., Woo, M., Senz, J., Pinheiro, H., Huntsman, D. G. (2015).** Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: CDH1 mutations and beyond. *JAMA Oncology*, 1, 23–32. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.168>
- Henri, D and Jean, L.C. (1992).** Alimentation et nutrition humaine. ESF éditeur, p:1533
- Hermiston, M.L. and J.I. Gordon, (1995).** Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science*, 270(5239): p. 1203-7.
- Hofmann, I., Schlechter, T., Kuhn, C., Hergt, M., and Franke, W.W. (2007).** Protein p0071 - an armadillo plaque protein that characterizes a specific subtype of adherens junctions. *Journal of cell science* 122, 21-24.
- Hulpiau P, van Roy F. (2009).** Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 349-369.
- Hyafil F, Babinet C, Jacob F. (1981).** Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26: 447-454.
- Jamora C. & Fuchs E. (2002).** Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat. Cell. Biol.*, 4, E101-E108.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kemler R. (1993).** From cadherins to catenins: Cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9:317–321
- Khalidoun 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.
- Khonsari H, Grandière-Perez L, Caumes E. (2005).** Le scorbut n’a pas disparu : histoire d’une maladie réémergente. *Rev Médecine Interne* ;26(11):885-90.
- Kierszenbaum, L. (2006).** histologie et biologie cellulaire : une introduction à l’anatomie
- Kim, Y. S., and Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12, 319-330.
- Kiyono, H., & Fukuyama, S. (2004).** NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4(9), 699-710.
- Koprucu S.S., Koprucu k., Urai M.S., Ispir U., Pala M. (2006).** Acute toxicity Of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*.86 :99-105.
- Levine, R.L. (2002).** Carbonylmodified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free. Radi.cBiol. Med.* 32: 790–796.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010).** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health /*Pharmacogn*, 4 (8), 118-126.
- MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. (2011).** Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* ; 140 : 1768–1775.
- 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
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E and Draï, J. (2008).** Biomarkers of lipidperoxidation: analytical aspect. *Ann. Biol. Clin.* 66: 605-20

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mills, G. B., Lu, Y., & Kohn, E. C. (2001).** Linking molecular therapeutics to molecular diagnostics: inhibition of the FRAP/RAFT/TOR component of the PI3K pathway preferentially blocks PTEN mutant cells in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10031-10033.
- Molckhou P.(2002).** Allergies alimentaires chez l'enfant . Encyclopédie Med Chir . Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, Paris , AKOS Encyclopédie pratique de médecine, 8-0319 : 1-12.
- Moralesband R. M. E. Escuderos,A A. Sayago,B M. T .Aparicio. (2009).** Evaluation of α tocopherol in virgin olive oil by a luminiscentmethod. GRASAS Y ACEITES, 60 (4), 336-342.ISSN: 0017-3495, DOI: 10.3989/gya.108308.
- Moss SF and Holt PR. (1996).** Apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* , 111(2): 567-568.
- Moussaoui K.M ; Boussahe R ; Tchoulak Y; Haouchine O; Benmami M ; DalachiA N. (2015).** Utilisation, évaluation et impacts des pesticides en Algérie. Ecole Nationale Polytechnique 78 :105-118
- Moussard., (2011).** Biochimie et biologie moléculaire. 2e tirage. Edition De Boeck Université. p366.
- Muniz, Luciana R., Camille Knosp, et Garabet Yeretssian. (2012).** « Intestinal Antimicrobial Peptides during Homeostasis, Infection, and Disease ». *Frontiers in Immunology* 3: 310.
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. (1996).** Structuralbasis of calcium-induced E-cadherin rigidificationand dimerization. *Nature* 380:360–364.
- Noda, T., Iwakiri, R., Fujimoto, K., Yoshida, T., Utsumi, H., Sakata, H., ... & Aw, T. Y. (2001).** Suppression of apoptosis is responsible for increased thickness of intestinal mucosa in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 50(3), 259-264.
- Nollet F, Kools P, van Roy F. (2000).** Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* 299: 551-572.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- OMS. (2016).** Résidus de pesticides dans l'alimentation et risques sanitaires .
- Owens, D. W., McLean, G. W., Wyke, A. W., Paraskeva, C., Parkinson, E. K., Frame, M. C., & Brunton, V. G. (2000).** The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell–cell contacts. *Molecular Biology of the Cell*, 11(1), 51-64.
- Padayatty, S. J., A. Katz, et al. (2003).** "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention." *J Am Coll Nutr* 22(1): 18-35.
- Paolisso,G., Balbi, V and Volpe, C. (1995).** Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin-dependent diabetics. *Am. Col. Nutr.* 14: 387-392.
- Paolisso, G., D'Amore, A., Galzerano, D., Varricchio, M and D'Onofrio, F. (1993).** Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type 1-2 diabetic patients. *Diabetes Care* 16: 1433 - 1437.
- Patel SD, Ciaatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR, Shapiro L. (2006).** Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 124: 1255-1268.
- Polakis, P. (2000).** Wnt signaling and cancer. *Genes & development*, 14(15), 1837-1851.
- Rajaskharan, S.K , Lee, J.H Ravishandran,V , Kim,J-C. Park.J.C , et Lee,J. (2019).** Nematicidal and insecticidal activities of halogenated indols scientific rapports ,9 required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell* 11, 51–64.
- Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M., & Leiter, A. B. (2004).** Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. *Endocrinology*, 145(6), 2639–2644.
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA.(1995).** Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374:327–337
- Sen, N., Simmons, W. J., Thomas, R. M., Erienne, G., Zhang, D. J., Jaeggli, N. S., ... & Thorbecke, G. J. (2001).** META-controlled env-initiated transcripts encoding superantigens of murine Mtv29 and Mtv7 and their possible role in B cell lymphomagenesis. *The Journal of Immunology*, 166(9), 5422-5429.

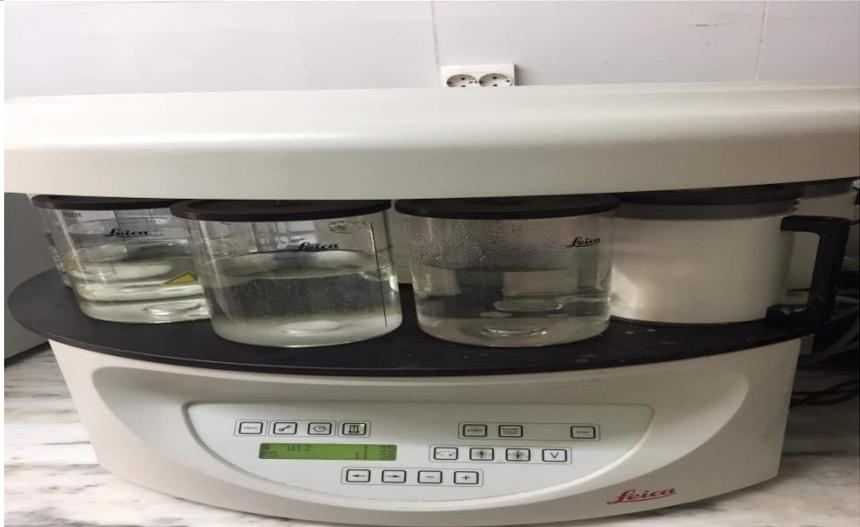
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shen X, Kramer RH. (2004).** survie au carcinome épidermoïde médiée par l'adhésion grâce à l'activation indépendante du ligand du récepteur du facteur de croissance épidermique. *Am J Pathol* 165: 1315–1329
- Sherewood, laurale. (2015).** physiologie humaine edition de boeck
- Shoop, W.L., Ostlind, D.A., Rohrer, S.P., Mickle, G., Haines, H.W., Michael, B.F., Mrozik, H., Fisher, M.H. (1995).** Avermectins and milbemycins against *Fasciola hepatica*: in vivo drug efficacy and in vitro receptor binding. *Int J Parasitol* 25, 923-927.
- Shore EM, Nelson WJ. (1991).** Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 266:19672–19680
- Sivasankar S, Zhang Y, Nelson WJ, Chu S. (2009).** Characterizing the initial encounter complex in cadherin adhesion. *Structure* 17: 1075-1081.
- Sokol, R.J., Heubi, J.E., Butler-simon, N., Mc Clung, H.J., Lilly, J.R and Silverman, A. (1987).** -Treatment of vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis with oral d- α -tocopheryl polyethylene glycol-1000 succinate. *Gastroenterology* 93: 975-985.
- Takeichi M. (1991).** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451–1455.
- Thannickal, V.J and Fanburg B.L. (2000)** .Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 279(6):1005-1028.
- Thompson, E.W., Newgreen, D.F., and Tarin, D. (2005).** Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research* 65, 5991-5995; discussion 5995.
- Tortora, G. J. Derrickson, B. (2018).** Anatomie et physiologie. Paris.
- Tremellen, K. (2008).** Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14:243–258.
- Turner, J.R. (2009).** Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 9(11): p. 799-80
- Vacheret N. (1999).** Histologie fonctionnelle des organes, l'appareil digestif, le tube digestif. Faculté de Médecine Laennec, Université Claude Bernard –Lyon 1 France, 3- 6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- van der Flier, L.G. and H. Clevers (2009).** Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, 71: p. 241-60.
- Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. (2000).** , *E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer* *Br J Surg*,87:992-1005
- Wong, S. Y., Chiam, K. H., Lim, C. T., and Matsudaira, P. (2010).** Computational model of cellpositioning:directed and collective migration in the intestinal cryptepithelium. *J R Soc Interface* 7 Suppl 3, S351-363.
- Zanotti, S., Gibertini, S., Bragato, C., Mantegazza, R., Morandi, L., and Mora, M. (2011).** Fibroblasts from the muscles of Duchenne muscular dystrophy patients are resistant to cell detachment apoptosis. *Experimental cell research* 317, 2536-2547.
- Zhang Y, Sivasankar S, Nelson WJ, Chu S. (2009).** Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 109-114.
- Zhang, H., Feng, M., Feng, Y., Bu, Z., Li, Z., Jia, S., & Ji, J. (2018).** Germline mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*, 30, 122–130. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2018.01.13>.

ANNEXE

<p>MATERIEL</p> <p>-L'histokinette : L'appareil de circulation Leica</p>	 A white Leica histokinette with a black top. It has four glass chambers on top, each containing a slide. The front panel features a control panel with several buttons and a small green display. The Leica logo is visible on the bottom right.
<p>-Distributeur de paraffine Slee.</p>	 Two photographs of a Slee paraffin distributor. The left photo shows the front panel with a digital display showing '60.3' and a 'SLEE MPS/W' label. The right photo shows the internal mechanism with a vertical tube and a nozzle.
<p>-Refroidisseur de paraffine Leica</p>	 A white Leica paraffin cooler with a green indicator light on the front. The top surface is covered with numerous small, rectangular paraffin blocks.

ANNEXE

Microtome
Leica

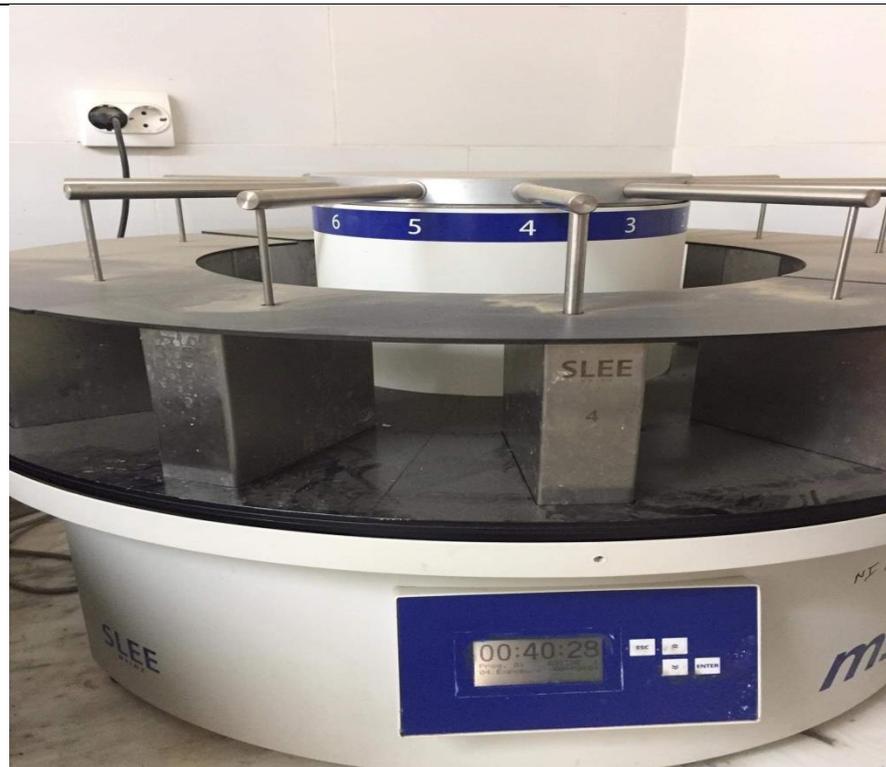


Masque

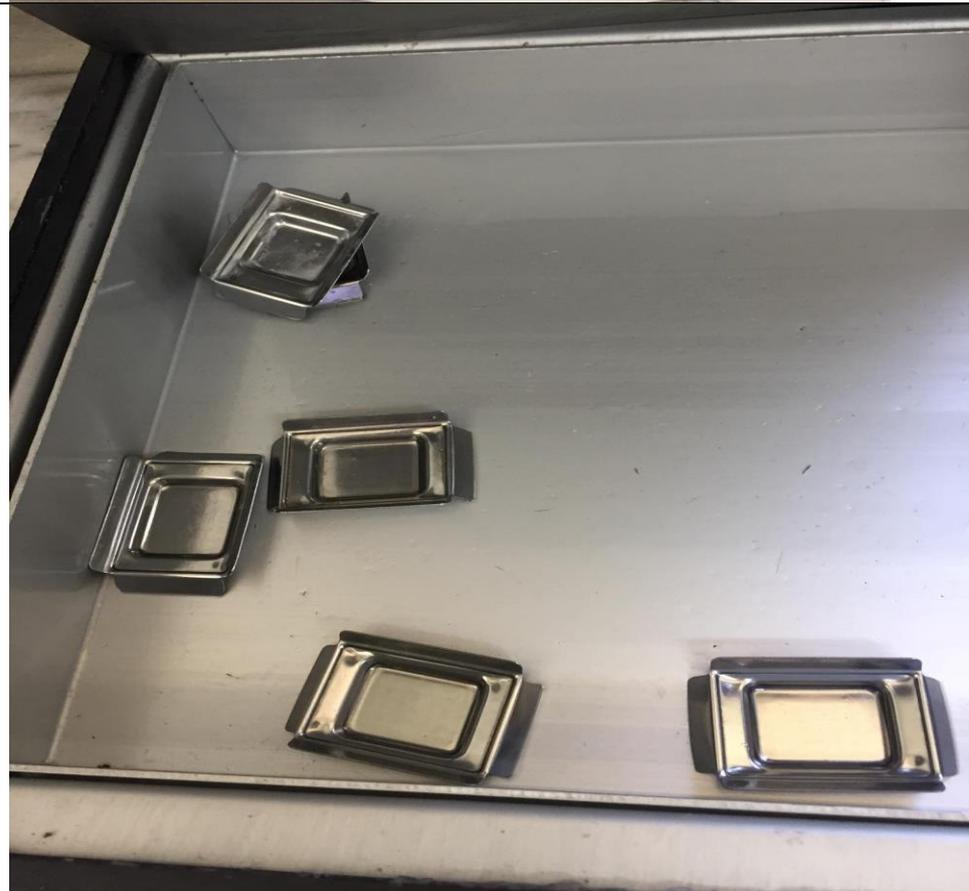


ANNEXE

L'appareil de coloration Slee



-Les moules.



ANNEXE

Bain marie

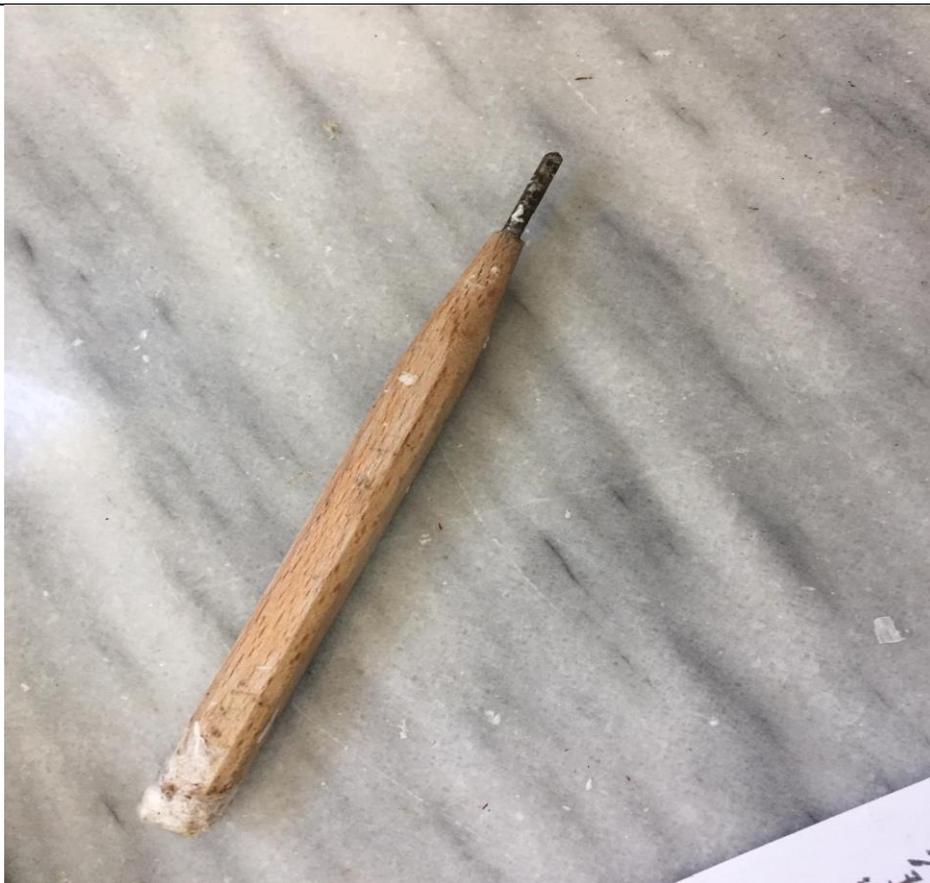


-pince.



ANNEXE

diamant
spéciale
pour
l'identification
des lames



Bacs

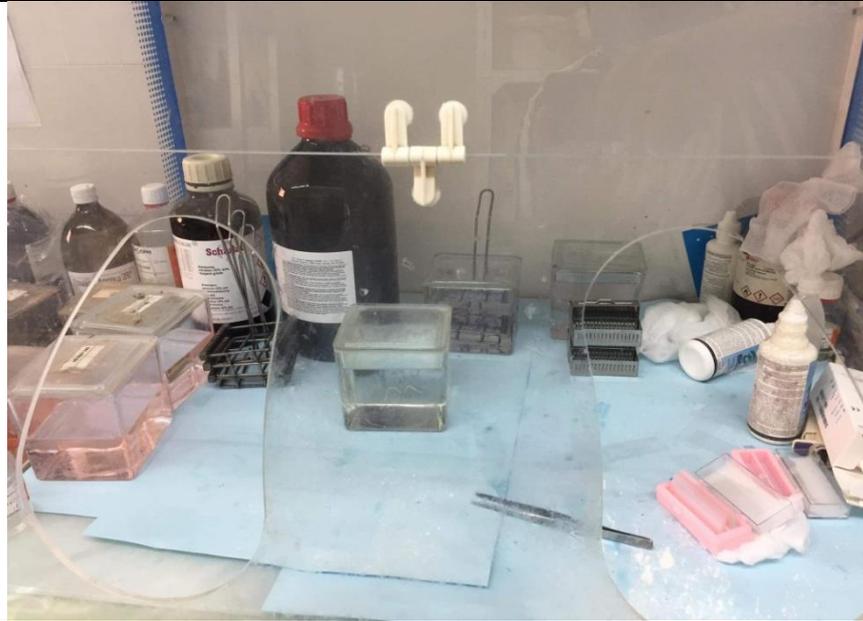


ANNEXE

Table de macro
+ solution de
formol10%



La haute



ANNEXE

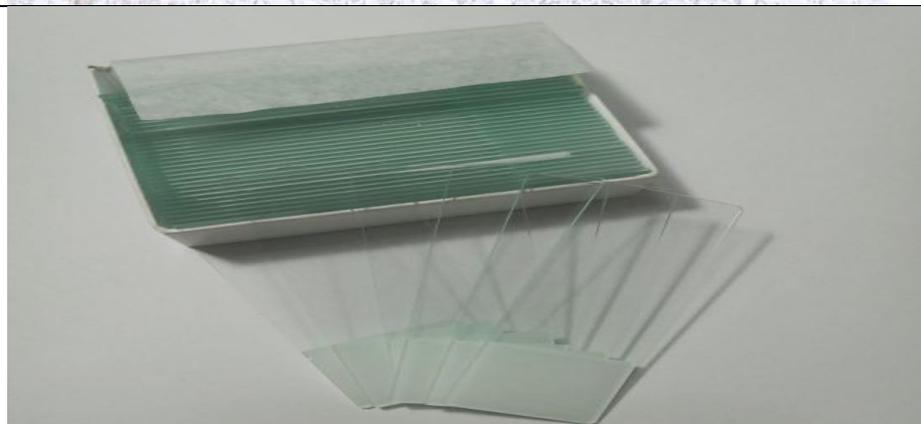
-l'étuve



-Cassettes en paraffine.

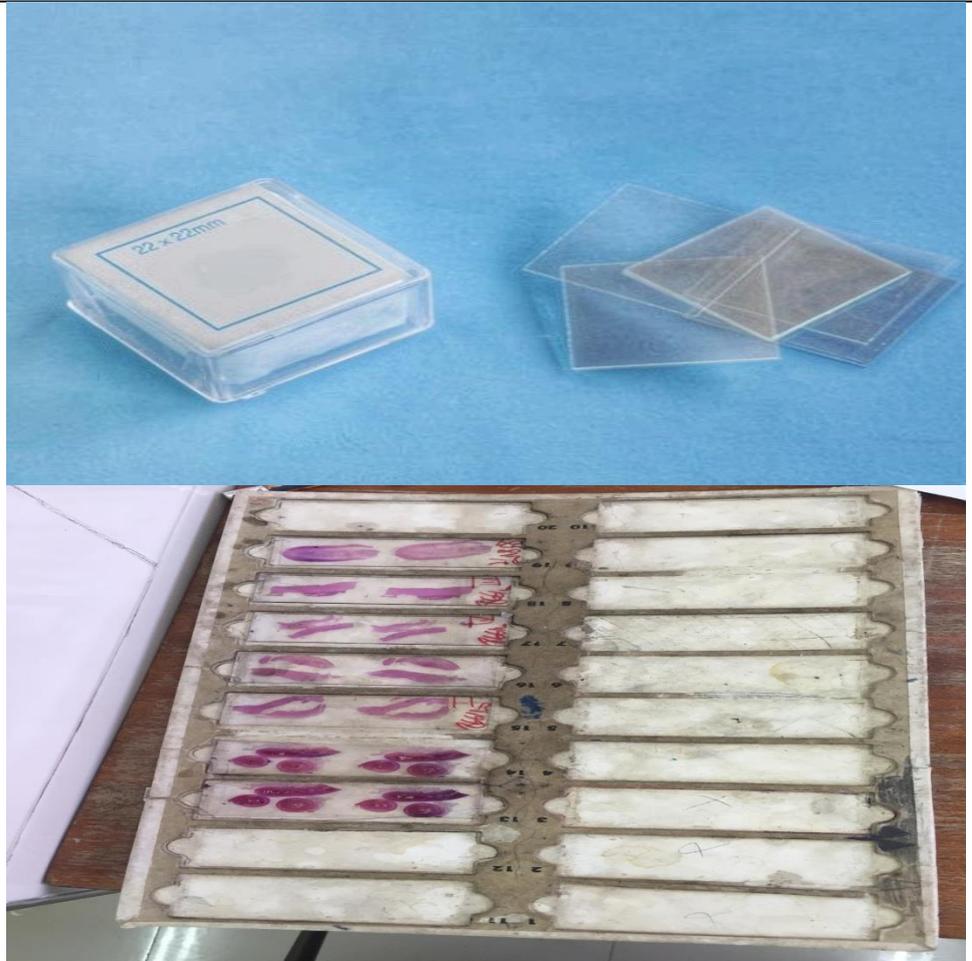


-Les lames.

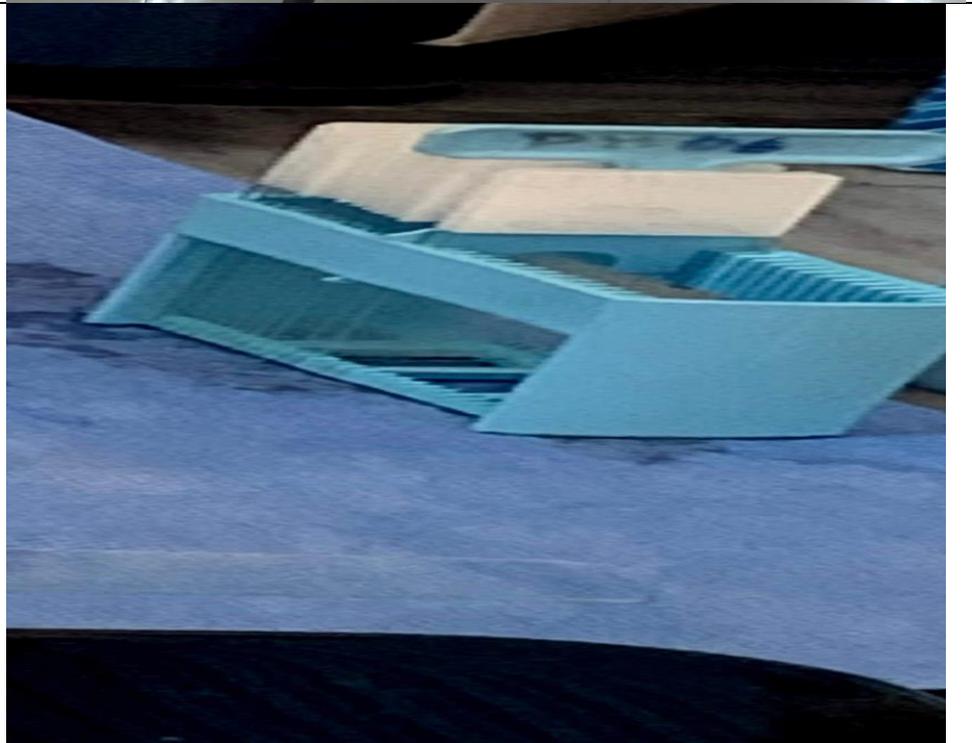


ANNEXE

-Les lamelles.
Lames colorées



-Panier pour les
lames.



ANNEXE

-L'eau distillé.



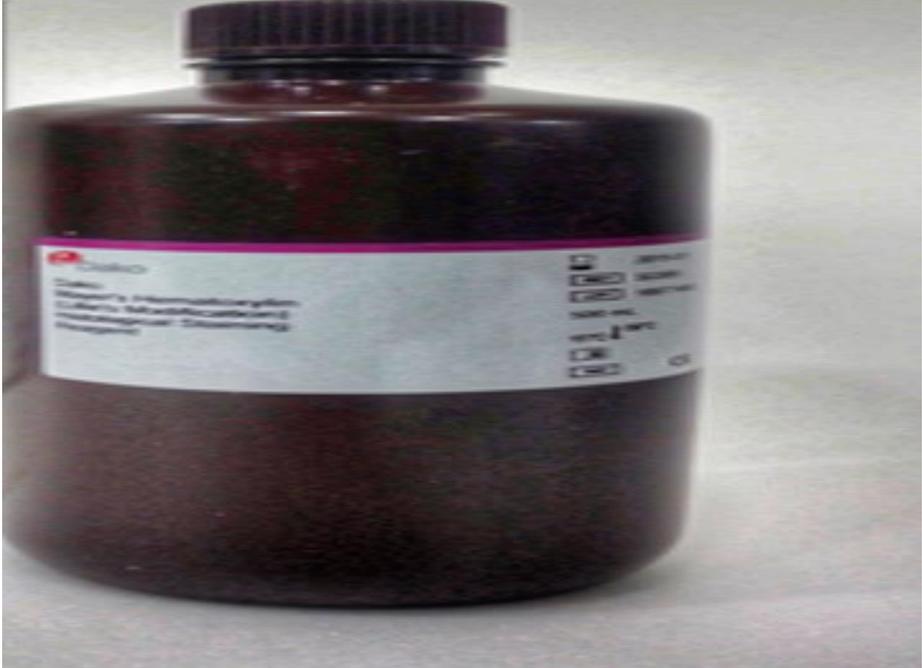
-Bacs de xylène.



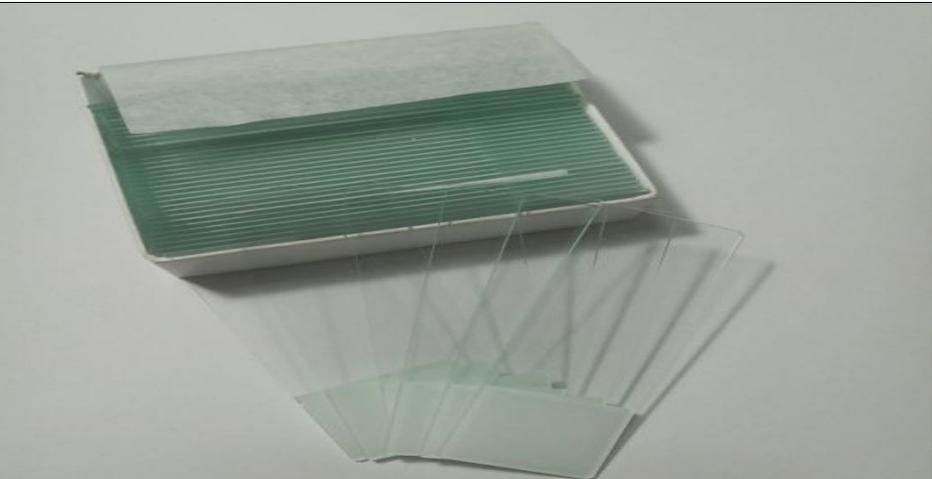
-Bacs d'alcool.



ANNEXE

<p>Hématoxyline eosine</p>	
<p>eukit</p>	

Annexe 2: matériels utilisé pour l'étude immunohistochemique

<p>Les lames</p>	
------------------	--

ANNEXE

diluant



Bacs de xylène.



ANNEXE

-Bacs de l'alcool.



-La solution de démasquage.



-L'eau distillé.



ANNEXE

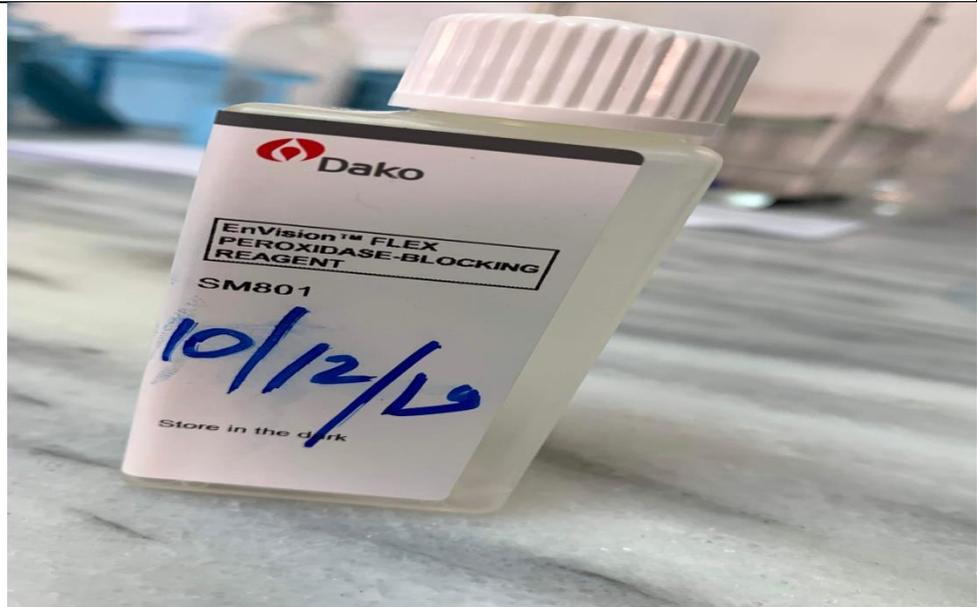
-La chambre humide.



-Dako pen.



-La Peroxydase.

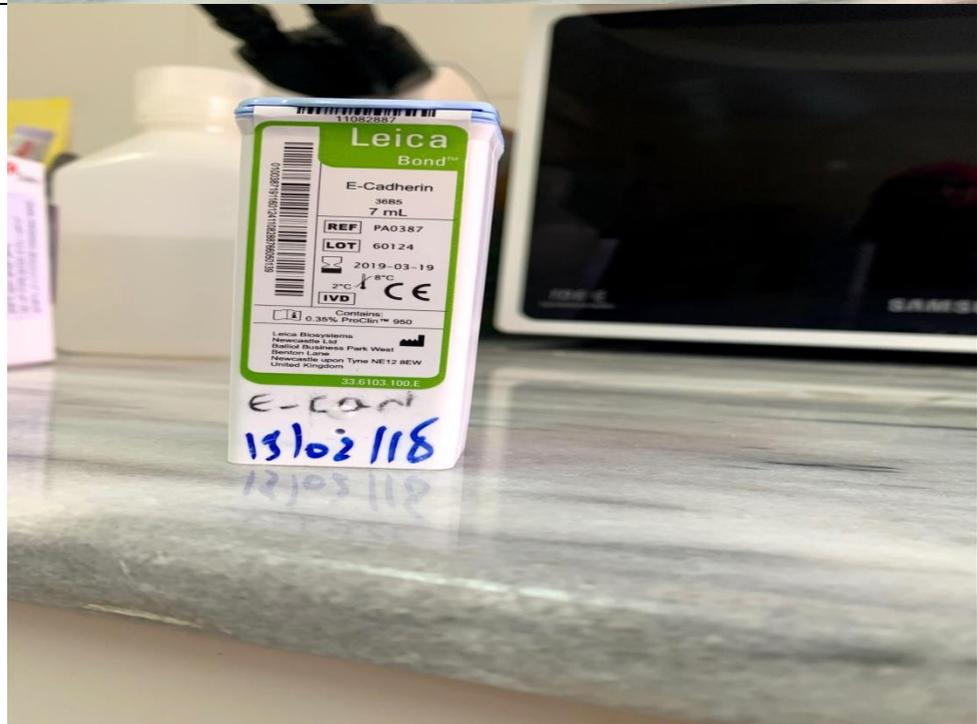


ANNEXE

-Solution de
rincage PBS +
bain marie

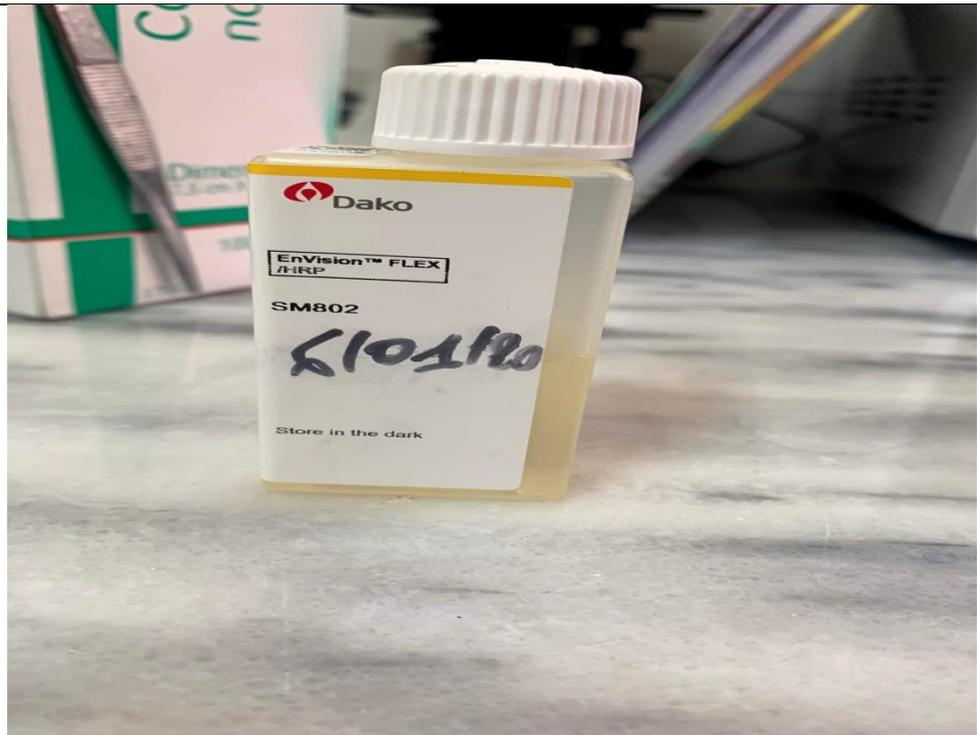


-Anticorpt anti
E-cadherine.



ANNEXE

-Anticorpt
secondaire :
l'amplificateur
HRP

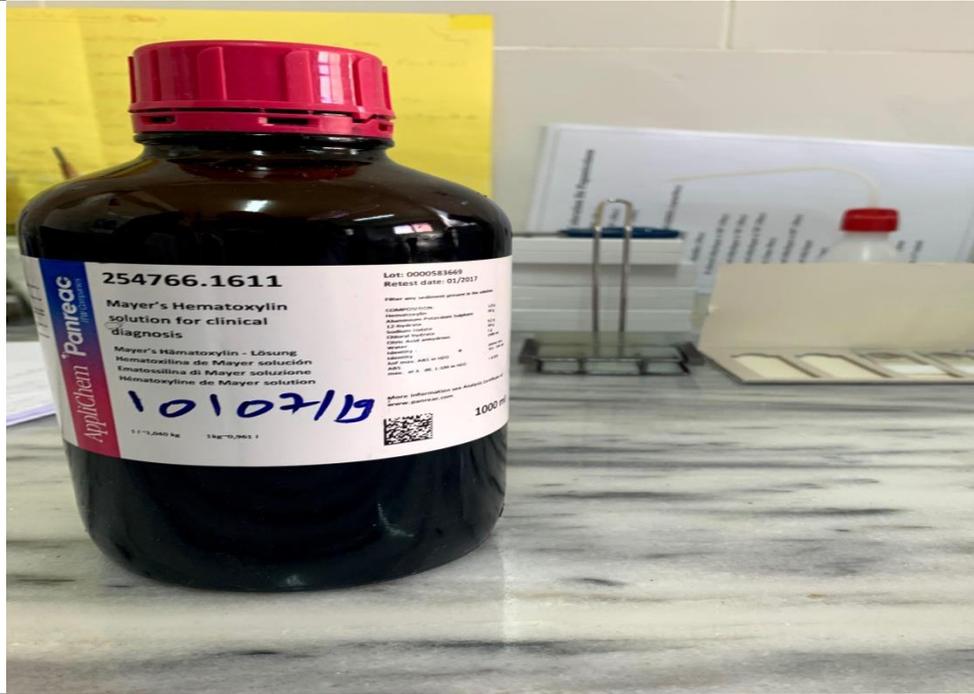


-Substrat de
buffer.



ANNEXE

L'hématoxylène de mayer.



-Faramount aqueous.

