

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

Aspects histologiques et immunohistochimiques du foie de lapin
traité par un insecticide et supplémenté par l'acide ascorbique

Présenté par :

Date de soutenance : 07 juillet 2022

***DJAFRI BOUCHRA**

***HADJADJ NESRINE**

Devant le jury :

M^{me} BELKHITER S.

MCB/ USDB1

Présidente

M^{me} ROUAKI F.

MCA / USDB1

Examinatrice

M^{me} KHALDOUN H.

MCA / USDB1

Promotrice

Pr DJENNAN N.

Professeur / CHU Bab El Oued

Co-promotrice

Promotion : 2021-2022

Remerciement

Tout d'abord nous tenons à remercier le bon Dieu de nous avoir donné la force, le courage, la volonté d'accomplir ce travail.

*Nous exprimons nos profonds remerciements et gratitude à notre promotrice Mme « **KHALDOUN H.** », Maître de Conférences "A" à l'université de Blida 01, pour sa patience, ses précieux conseils et sa grande disponibilité pour l'aboutissement de ce travail.*

*Nous remercions également notre co-promotrice Pr « **DJENNANE N.** » chef de service anatomopathologie du CHU Bab El Oued qui nous a accueillis aimablement et pour la précieuse opportunité qu'elle nous a donné pour faire notre stage dans les meilleures conditions.*

*Nous adressons à remercié Mme « **BELKHITER S.** », de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements et notre très grand considération à Mme « **ROUAKI F.** » Maître de Conférences "A" à l'université de Blida 01 d'avoir acceptée d'examiner ce travail.*

*Nos profonds remerciements et notre gratitude vont également aux responsables et aux personnels du service anatomopathologie à CHU Bab El Oued sans exception, à leur tête l'ingénieure Mme « **KEBBAB N.** » responsable de l'unité d'immunohistochimie et à Mme « **BOUHACHEL A.** » technicienne de laboratoire qui nous a aidés le plus, pour sa patience et ses encouragements.*

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin d'étude.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de leur amour, leur soutien et pour tous leurs sacrifices durant toute ma vie, j'espère que vous êtes fier de moi. Que Dieu me les garde.

A mes proches qui nous ont quittés et qui attendait ce jour avec impatience, j'espère vous rendre hommage. Que Dieu vous accueille dans son vaste paradis.

A mes sœurs

A mes petits frères

A mes grands-mères que Dieu vous garde pour nous je vous souhaite la santé et le bien-être

A toute ma famille chacun par son nom

A mes amis de ma promotion Master 2 BIOCHIMIE 2021/2022 et surtout ma binôme Nesrine qui je lui souhaite une vie plein de bonheur et de réussite.

A

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour ce travail soient possible, je vous dis merci

BOUCHRA

Dédicace

*Je dédie ce travail à mon cher Papa que Dieu l'accueille dans son
vaste paradis.*

*À ma chère maman et mon frère « Mustapha » que je remercie pour
leur amour inconditionnel et leur soutien*

*A mon cher fiancé « Adél » que je remercie énormément pour ses
encouragements*

*A ma binôme « Bouchra » et à toutes mes amies de la promo Master II
Biochimie 2021/2022*

Nesrine

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Classification des pesticides recommandés par l’OMS	8
II	Classification selon la nature chimique	9
III	Type des pyrthrinoides synthétiques	11
IV	Domaine d’application des pesticides	13

Liste des figures

FIGURE	TITRE	PAGE
Figure 1	Structure du foie de lapin montrant le caractère lobé de l'organe.	3
Figure 2	Vascularisation du lobule hépatique.	4
Figure 3	Coupe transversale d'un lobule hépatique.	5
Figure 4	Schéma illustratif montrant les différents constituants d'un hépatocyte.	6
Figure 5	Structure chimique de quelques pyréthrinoides.	10
Figure 6	Structure chimique de la lambda cyhalothrine.	14
Figure 7	Mécanisme d'action de LCT.	14
Figure 8	Structure de la vitamine C.	17
Figure 9	Schéma présentant les jonctions d'adhérence.	21
Figure 10	La jonction d'adhérence et le classique complexe cadhérinecaténine.	21
Figure 11	Illustration schématique de l'E-cadhérine dans la formation de la jonction d'adhérence.	22
Figure 12	Schéma récapitulatif de la voie de signalisation Wnt/ β caténine.	23
Figure 13	Structure de la p53.	25
Figure 14	Schéma illustratif représentant la structure des deux isoformes de la protéine ki67.	27
Figure 15	Fixation des fragments tissulaires dans du formol à 10%.	30
Figure 16	Automate de circulation (<i>Leica</i>).	31
Figure 17	Inclusion des fragments tissulaires.	32
Figure 18	Confection des coupes histologiques.	32
Figure 19	Etalement du ruban sur la lame.	33
Figure 20	Batterie de coloration H&E.	34
Figure 21	Batterie de coloration Trichrome de Masson.	35
Figure 23	Batterie de coloration PAS.	36
Figure 24	Montage des lames histologiques.	36

Figure 25	Schéma représentatif du principe de l'immunohistochimie.	37
Figure 26	Coupe étalées sur les lames silanisées.	37
Figure 27	Automate d'IHC Benchmark ULTRA (<i>VENTANA</i>).	38
Figure 28	Photo des lames à la fin de l'étape du prétraitement.	38
Figure 29	Etape de la titration des AC spécifiques	39
Figure 30	Lames d'IHC prêtes à l'observation.	39

LISTE DES PLANCHES

PLANCHE	TITRE	PAGE
PLANCHE 01	Histologie du foie témoin, coloration (H&E)	41
PLANCHE 02	Histologie du foie traité par LTC. Coloration (H&E).	42
PLANCHE 03	Histologie du foie traité et supplémenté (LTC+ Vit C). Coloration (H&E).	43
PLANCHE 04	Histologie du foie témoin. Coloration Trichrome de Masson.	44
PLANCHE 05	Histologie du foie des lapins traités par LTC . Coloration Trichrome de Masson.	45
PLANCHE 06	Histologie du foie traité et supplémenté (LTC+ Vit C). Coloration Trichrome de Masson.	46
PLANCHE 07	Histologie du foie témoin. Coloration PAS.	48
PLANCHE 08	Histologie du foie traité par LTC. Coloration PAS	49
PLANCHE 09	Histologie du foie traité et supplémenté (LTC+ Vit C). Coloration PAS.	50
PLANCHE 10	IHC de la protéine E-cadhérine du foie des lapins témoins.	52
PLANCHE 11	IHC de la protéine E-cadhérine du foie des lapins traités par LTC.	53
PLANCHE 12	IHC de la protéine E-cadhérine du foie des lapins traités et supplémentés (LTC+ Vit C).	54
PLANCHE 13	IHC du marqueur Ki67 du foie des lapins témoins	56
PLANCHE 14	IHC du marqueur Ki67 du foie des lapins traités par (LTC)	57
PLANCHE 15	IHC du marqueur Ki67 du foie des lapins traité et supplémenté (LTC+ Vit C).	58
PLANCHE 16	IHC du marqueur P53 du foie des lapins témoins.	60
PLANCHE 17	IHC du marqueur P53 du foie des lapins traités par LTC .	61
PLANCHE 18	IHC du marqueur P53 du foie des lapins traités et supplémentés (LTC+ Vit C).	62

Résumé

La présente étude histologique et immunohistochimique a pour but d'évaluer l'effet amélioratif de l'acide ascorbique suite à une hépatotoxicité par un pyréthrianoïde de synthèse de type II lambda cyhalothrine chez le lapin. Des fragments tissulaires hépatiques fixés dans le formol à 10% provenant de lapins mâles témoins, traités par la lambda cyhalothrine (LCT) et traités LCT et supplémentés par AA (LCT + AA) font l'objet de notre recherche. L'observation du parenchyme hépatique des lapins traités par LCT révèle une désorganisation tissulaire et des lésions hépatiques sévères à savoir une congestion vasculaire et un infiltrat inflammatoire. L'étude immunohistochimique montre chez le lot témoin un immunomarquage membranaire de la protéine de jonction E-cadhérine et un marquage négatif du marqueur de la prolifération cellulaire le Ki67 et de l'apoptose la protéine P53. Alors que chez les lapins traités par LCT un marquage membranaire et cytoplasmique positive de la E-cadhérine, et un immunomarquage nucléaire faible et cytoplasmique intense de l'expression du Ki67 et de la P53 ont été observés. Cependant, chez le lot traité et supplémenté par l'AA on constate une réduction de l'expression des trois marqueurs en comparaison avec les animaux traités par LCT.

A la lumière de nos résultats, on constate que l'insecticide lambda cyhalothrine induit des effets hépatotoxiques en altérant la structure tissulaire, cependant la supplémentation par la vitamine C permet de réduire les lésions hépatique à l'échelle tissulaire et moléculaire.

Mots clés : vitamine C, lambda cyhalothrine, histologie, immunohistochimie, E-cadhérine, Ki67, P53

Abstract

The purpose of the present histological and immunohistochemical study was to evaluate the ameliorative effect of ascorbic acid following an hepatotoxicity by a synthetic type II pyrethroid lambda cyhalothrin in rabbits. Hepatic tissue fragments fixed in 10% formalin from control, lambda cyhalothrin (LCT)-treated and LCT-treated and AA-supplemented (LCT + AA) male rabbits are the subject of our research. Observation of the liver parenchyma of the LCT-treated rabbits revealed tissue disorganization and severe liver lesions, namely vascular congestion and inflammatory infiltrate. The immunohistochemical study shows in the control lot a membrane immunolabeling of the junction protein E-cadherin and a negative labeling of the marker of cell proliferation Ki67 and of apoptosis P53 protein. In LCT-treated rabbits, positive membrane and cytoplasmic labeling of E-cadherin, and weak nuclear and intense cytoplasmic immunostaining of Ki67 and P53 expression were observed. However, in the AA-treated and -supplemented batch, there was a reduction in the expression of all three markers compared to LCT-treated animals.

In light of our results, it can be seen that the insecticide lambda cyhalothrin induces hepatotoxic effects by altering the tissue structure, however, supplementation with vitamin C reduces the hepatic lesions at the tissue and molecular levels.

Key words: vitamin C, lambda cyhalothrin, histology, immunohistochemistry, E-cadherin, Ki67, P53

ملخص

الغرض من هذه الدراسة النسيجية والكيميائية الهيستولوجية المناعية هو تقييم التأثير التحسيني لحمض الأسكوربيك بعد السمية الكبدية عن طريق البيريثرويد الاصطناعي لامدا سايهالوثرين في الأرانب. شظايا أنسجة الكبد المثبتة في 10% (LCT), المعالجة والمكملة بـ LCT و AA (LCT + AA lambda cyhalothrin) فورمول من الأرانب الذكور هي موضوع بحثنا عن الخاضعة للتحكم، تكشف مراقبة الحشائش الكبدية في الأرانب المعالجة بـ والمعالجة باستخدام اضطراب في الأنسجة وتلف شديد في الكبد، احتقان الأوعية الدموية والتسلل الالتهابي. أظهرت الدراسة الكيميائية ووضع علامة سلبية E-cadherin الهيستوكيميائية المناعية في دفعة التحكم وضع علامة مناعية لغشاء بروتين الوصل ، لوحظ وجود غشاء إيجابي LCT موت الخلايا المبرمج. أثناء معالجة الأرانب بـ Ki67 P53 على علامة تكاثر الخلايا ، وتعبير مناعي نووي ضعيف وتعبير سيتوبلازمي مكثف عن E-cadherin وعلامات سيتوبلازمية لـ Ki67 P53.

، كان هناك انخفاض في التعبير عن العلامات الثلاث مقارنة بالحيوانات المعالجة AA بـ LCT ومع ذلك، في القطعة lambda cyhalothrin المكملة المعالجة

C يسبب تأثيرات سامة للكبد عن طريق تغيير بنية الأنسجة، لكن مكملات فيتامين في ضوء نتائجنا، نجد أن مبيد الحشرات تساعد على تقليل تلف الكبد على الأنسجة والمقياس الجزيني

الكلمات الرئيسية: فيتامين سي، لامدا سيهالوثرين، علم الأنسجة، الكيمياء الهيستولوجية المناعية،

E-cadherin ،Ki67 ،P53

Glossaire

DL50 : La DL50 (dose létale 50%) correspond à la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises lors de l'administration d'un xénobiotique par voie orale. Elle s'exprime en milligrammes de matière active par kilogrammes du poids de l'animal, plus la dose létale est faible, plus la substance est toxique et vice versa (**Akashe et al, 2018**).

Cryptorchidie : La cryptorchidie est une anomalie de la migration testiculaire qu'il ne faut pas confondre avec le testicule ectopique, le testicule oscillant, le testicule évanescent ou l'anorchidie. La physiopathologie de la cryptorchidie est mieux connue et relève souvent d'un hypogonadisme hypogonadotrophique durant la grossesse, probablement majoré comme le montrent les études épidémiologiques récentes par des facteurs environnementaux toxiques au premier rang desquels figurent les pesticides. Infertilité et cancérisation sont les deux risques majeurs de la cryptorchidie (**Averous et Lopez, 2004**).

Nécrose : Mort d'une cellule ou d'un tissu organique. Une nécrose se traduit par des altérations du noyau et du cytoplasme de la cellule, suivies, éventuellement, par des modifications des éléments extracellulaires (fibres collagènes, vaisseaux sanguins). Dans la plupart des organes vitaux (cœur, cerveau), un tissu nécrosé cesse d'être fonctionnel et n'est pas remplacé ; en revanche, le tissu osseux et la peau peuvent se régénérer (**LAROUSSE**).

Toxicocinétique : Étude du sort d'une substance toxique dans l'organisme. La quantité de substance qui agit avec l'organisme pour causer un effet néfaste dépend de quatre facteurs biologiques principaux qui sont : l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'élimination. La concentration d'une substance toxique dans l'organisme est influencée par différents facteurs qui peuvent être regroupés en trois catégories : les facteurs biologiques (endogènes), les facteurs environnementaux (exogènes) et les caractéristiques physico-chimiques.

Liste des abréviations

OMS : Organisation mondiale de la santé.

DL50 : La dose létale médiane.

T1/2 : Temps de demi-vie.

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane.

CMR : Produits chimiques qui ont des effets cancérogènes, mutagènes ou reprotoxique.

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer.

CS : Choréoatétose-Salivation.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

LTC : Lambda cyhalothrine.

AA : Acide ascorbique.

SVCT1 : Transporteur de vitamine C sodium-dépendant 1.

CAM : Molécules d'adhésions cellulaires.

GPx : Gluthation peroxydase .

GSK3 β : Glycogène synthase kinase-3 β .

APC : Polypose adénomateuse.

LRP5/6 : Low-density lipoprotein receptor-related protein.

MDM2 : Murine double minute 2.

NLS : Nuclear Localization Signal.

NES : Nuclear Export Sequences.

IHC : Immunohistochimie.

HE : Hématoxyline Eosine.

PAS : Réaction à l'acide périodique schiff.

NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B.

MAPK : Protéines kinases activées par les mitogènes.

TNFR1/TNF- α : Récepteur 1 du facteur de nécrose tumorale.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1 Chapitre I : Rappels bibliographiques	
1 Organe de détoxification.....	3
1.1 Anatomie.....	3
1.2 Vascularisation.....	4
1.3 Histologie hépatique	5
1.4 Fonctions du foie.....	6
1.5 Hépatotoxicité	7
2 Pesticides.....	7
2.1 Généralités et définitions	7
2.2 Classification des pesticides.....	8
2.2.1 Classification selon l’OMS.....	8
2.2.2 Classification selon la nature de la cible visée	8
2.2.3 Classification selon la nature chimique	9
2.3 Toxicité des pesticides	9
2.3.1 Intoxication aiguë des pesticides	9
2.3.2 Intoxication chronique	10
2.4 Pyréthrinoïdes de synthèse.....	10
2.4.1 Avantages d’utilisation des pyréthrinoïdes.....	11
2.4.2 Composition chimique des pyréthrinoïdes	11
2.4.3 Toxicité des pyréthrinoïdes	12
2.4.4 Voies d’expositions	12
2.4.5 Domaines d’application des pyréthrinoïdes	13
2.5 Lambda cyhalothrine (LCT)	13
2.5.1 Généralités	13
2.5.2 Propriétés physico-chimiques de la lambda-cyhalothrine	13
2.5.3 Toxicocinétique de lambda cyhalothrine.....	14
3 Stress oxydatif.....	15
3.1 Généralités	15
3.2 Les espèces réactives d’oxygènes (EROs).....	15

3.3	Les conséquences physiopathologiques.....	16
4	Vitamine C.....	16
4.1	Structure chimique.....	17
4.2	Source et besoin.....	17
4.3	Carence.....	18
4.4	Toxicité.....	18
4.5	Fonction physiologique.....	18
4.5.1	Vitamine C en tant que cofacteur enzymatique.....	18
4.5.2	Vitamine C et le stress oxydatif.....	18
4.5.3	Vitamine C et la synthèse du collagène.....	19
4.5.4	Vitamine C et l'immunité.....	19
4.6	Pharmacocinétique de la vitamine C.....	19
4.6.1	Absorption.....	19
4.6.2	Distribution.....	19
4.6.3	Métabolisme et Excrétion.....	20
5	Adhérence cellulaire.....	20
5.1	Jonctions cellule-cellule.....	20
5.2	Molécules d'adhésions cellulaires (CAM).....	20
5.3	Super famille des cadherine.....	21
5.4	E-CADHERINE.....	22
5.4.1	Voie de signalisation Wnt/b -caténine.....	23
5.5	Protéine P53.....	24
5.5.1	Structure.....	24
5.5.2	Activation.....	25
5.5.3	FONCTIOIN.....	25
5.5.4	La P53 dans les cancers humains.....	26
5.6	Marqueur de prolifération Ki67.....	26
5.6.1	Structure.....	26
5.6.2	Fonctions.....	27
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES		
1	MATERIEL.....	29

1.1	Matériel biologique.....	29
1.2	Matériel non biologique.....	29
2	METHODES.....	30
2.1	Etude histologique du foie.....	30
2.1.1	Fixation.....	30
2.1.2	Circulation.....	30
2.1.3	Inclusion et Enrobage.....	31
2.1.4	Microtomie.....	32
2.1.5	Étalement.....	33
2.1.6	Coloration.....	33
	Méthode à l'Hématéine et à l'éosine (H&E).....	33
	Coloration Trichrome de Masson.....	34
	PAS (Réaction à l'acide périodique Schiff).....	35
2.1.7	Montage.....	36
2.1.8	Observation au microscope optique.....	36
2.2	Immunohistochimie.....	36
	Protocole.....	37
2.2.1	Prétraitement.....	38
2.2.2	Réaction immunohistochimique IHC.....	38
2.2.3	Montage lame / lamelle par l'Eukitt.....	39
2.2.4	Observation au microscope et prise des photos.....	39
	Chapitre III Résultats et Discussion	
	RESULTATS.....	40
1.	Etude histologique du parenchyme hépatique.....	40
1.1.	Colorations topographiques.....	40
1.2	Coloration histochimique.....	47
2.	Etude immunohistochimique du foie des lapins.....	51
2.1	IHC E-cadhérine.....	51
2.2	IHC Ki67.....	55
2.3	IHC P53.....	59
	DISCUSSION.....	63

Conclusion et perspectives.....	68
Références bibliographiques	69
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

Le foie est le siège principal de la détoxification du sang par biotransformation des xénobiotiques, il protège l'organisme en empêchant l'accumulation des substances toxiques dans l'organisme tel que les pesticides (**Adikwu et Deo, 2013**).

Le développement de l'agriculture s'accompagne de l'utilisation des produits phytosanitaires ou pesticides partout dans le monde. L'utilisation de ce pesticide indique que ses avantages, notamment en éliminant ou réduire les prédateurs des cultures. Cependant, derrière ces avantages se cachent les impacts potentiels, y compris les dangers pour l'environnement, la qualité des produits agricoles et à propos de la santé de la population. Sur ce dernier point, l'OMS estime à plus d'un million de personnes victimes annuellement d'empoisonnement dont vingt mille en sont morts. L'utilisation des pesticides nécessitent certaines connaissances pour assurer une production de qualité, compétitive sur le marché de la consommation (**Mouden, 2010**).

Les pyréthriinoïdes sont des insecticides largement utilisés dans la production agricole. Les insecticides pyréthriinoïdes sont des analogues des pyréthrines naturelles et ont été développés en tant que nouvelle génération des produits phytosanitaires. Ils sont répartis en deux groupes, type I et II (**Muranli, 2013**).

La lambda-cyhalothrine est un insecticide pyréthriinoïde de synthèse de type II. Il s'agit d'une molécule à large spectre contre les insectes ravageurs des cultures dont les utilisations en agriculture sont de plus en plus importantes (**Ansari et al., 2012; Fetoui et al., 2009**).

Le stress oxydatif est généré par un déséquilibre entre la quantité excessive de radicaux libres par rapport au nombre d'antioxydants. L'ERO a longtemps été considérée comme un sous-produit toxique au métabolisme normal de l'oxygène et implique de nombreuses pathologies. Or, depuis plusieurs années, la production contrôlée de radicaux libres apparaît comme un mécanisme de base de la signalisation cellulaire. Cela aide à maintenir l'homéostasie de la cellule (**Migdal et Serres, 2011**).

La vitamine C est très soluble peu stockée dans l'organisme et nécessite un apport régulier. Elle joue un rôle actif dans l'activité biochimique d'une enzyme, la fabrication de collagène, la synthèse de carnitine, elle a un rôle antioxydant puissant (avec un fonctionnement et un métabolisme différents des autres antioxydants). Elle intervient dans les réactions radicalaires en piégeant les radicaux libres. Des études récentes montrent que la supplémentation en

Introduction

vitamine C peut avoir un effet protecteur sur le foie, améliorant la fonction hépatique(Adikwu et Deo, 2013).

Dans ce cas, les travaux en cours consistent d'une part à étudier les effets toxiques de lambda cyhalothrine sur le foie des lapins males et l'effet protecteur de la vitamine C histologiquement ,d'autre part évaluer l'expression des protéines cytoplasmiques E-cadhérine, de prolifération Ki67 et de l'apoptose P53 au niveau du foie par une étude immunohistochimique.

Le présent mémoire comprend trois parties

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographiques qui commence par des généralités sur les pesticides, les pyréthrinoïdes de synthèse, Puis l'anatomie et l'histologie du foie suivi de la description et de la fonction des trois marqueurs : E-cadherine protéine d'adhésion cellulaire, de prolifération KI67 et d'apoptose P53 et se termine par des généralités sue la vitamine C et le stress oxydatif.

Le deuxième chapitre décrit le matériel utilisé et le protocole suivi pendant l'expérience.

Enfin, le dernier chapitre est réservé à une discussion des résultats obtenus, aboutissant à une conclusion et perspectives.

CHAPITRE I
RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

1 Organe de détoxification

1.1 Anatomie

Le foie se forme au début de la quatrième semaine, à partir d'une invagination de l'épithélium terminal du proentéron, le diverticule hépatique glandulaire de l'intestin primitif (Si-Tayeb et al., 2010).

Le foie est la glande la plus volumineuse du corps humain et l'un des plus grands viscères et organes, il est positionné chez l'homme dans sa plus grande partie du côté infradiaphragmatique droit (hypocondre droit), et s'étend dans l'épigastre et l'hypocondre gauche. Il est de forme ovoïde à grand axe transversale effilé à gauche (Bessaguet et Desmoulière, 2021).

Le foie est de 28 cm de long, 8 cm de haut et son épaisseur sagittale et de 15 cm, il pèse entre 1,6 et 2 kg (80 à 120 g chez le lapin : soit 3 à 4 % de son poids vif) (Lacour et Belon, 2016 ; Garreau et al., 2015) il possède 2 faces (supérieur lisse et inférieur concave) 2 bords (antérieur et postérieur) et 2 extrémités (droite et gauche) et présente une couleur brunrouge. Il est recouvert par le péritoine sauf en arrière (area nuda). Il est constitué de deux lobes distincts (lobe gauche $\frac{1}{3}$ et lobe droit plus gros $\frac{2}{3}$), séparés par le ligament falciforme, qui permet également de le relier à la paroi abdominale antérieure. Il est entouré par la capsule de Glisson (capsule fibreuse du foie) et subdiviser en 8 segments (Dufour, 2018).

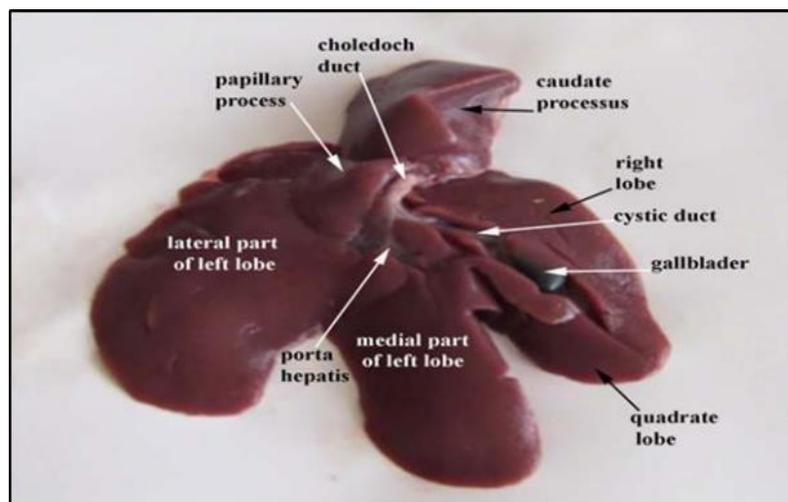


Figure 1 : Structure du foie de lapin montrant le caractère lobé de l'organe (Stamatova-Yovcheva et al., 2012)

Chez le lapin, le foie est situé dans la région épigastrique, entre les deux arcs costaux, atteignant la 7ème côte droite et la 9ème côte gauche, il est composé de 5 lobes distincts ; lobe droit, lobe gauche qui est séparé en partie latérale et partie médiane, lobe quadraté et lobe caudé (**Stamatova-Yovcheva et al., 2012**).

1.2 1.2. Vascularisation

Le foie fait partie des organes les plus richement vascularisés car il reçoit 25 à 30 % du débit cardiaque. La vascularisation hépatique est particulière du fait de la présence d'un double réseau veineux : portal et cave. Le flux sanguin provient en majorité de la veine porte qui contient du sang pauvre en O₂ et riche en nutriments, mais provient également de l'artère hépatique qui contient du sang riche en O₂. Le sang porte se mélange avec le sang artériel au niveau des sinusoides hépatiques qui sont des capillaires en contact très étroit avec les cellules hépatiques constituant une importante zone d'échange, ces sinusoides se drainent par les veines centro lobulaires pour former les trois veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure (**Bessagnet et Desmoulière, 2021**).

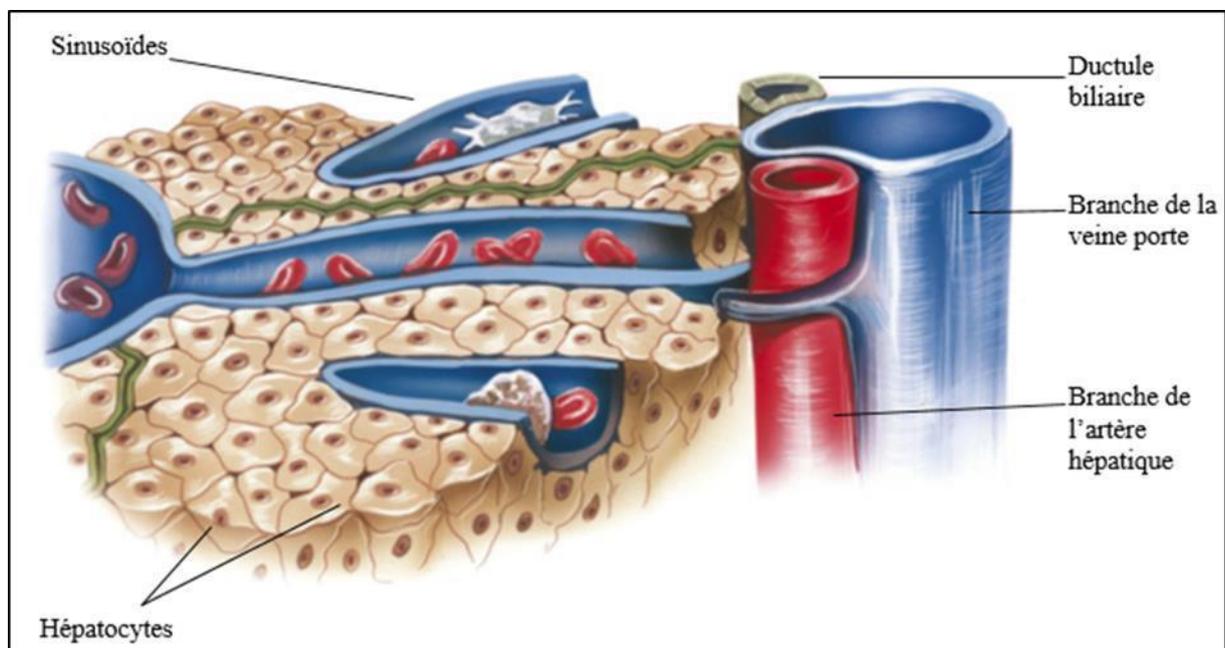


Figure 2 : Vascularisation du lobule hépatique (**Martin et Vicari, 2004**)

L'activité exocrine du foie est représentée par la synthèse et la sécrétion en continu de la bile par les hépatocytes, cette sécrétion est d'abord collectée dans les canalicules biliaires, puis passe dans les ductules biliaires qui naissent au niveau des petits espaces portes et fusionnent

pour donner les deux voies biliaires droite et gauche. La bile s'accumule dans la vésicule biliaire où elle se concentre (Bessagnet et Desmoulière, 2021).

1.3 Histologie hépatique

Le parenchyme hépatique est constitué d'unités fonctionnelles microscopiques : les lobules hépatiques hexagonaux de Kiernan, constitués de trois éléments principaux : les sinusoides, entourées par un cylindre d'hépatocytes, formant les travées hépatocytaires de Remak, et les canicules biliaires, une branche de l'artère hépatique et de la veine porte ainsi qu'un canal biliaire forment la triade portale présente à l'extrémité de chaque lobule (Lacour et Belon, 2016).

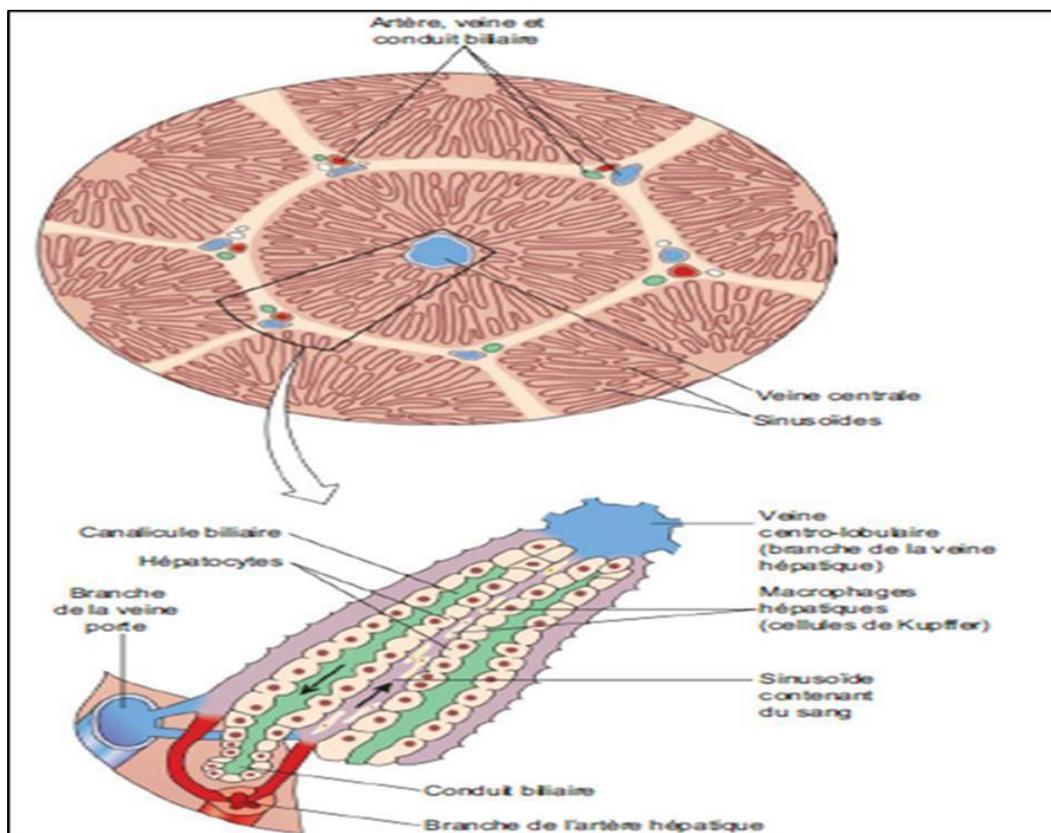


Figure 3 : Coupe transversale d'un lobule hépatique (Waugh et al., 2011) Selon (Lacour et Belon, 2016), le foie est constitué des cellules à savoir :

- **Hépatocytes, ou cellules parenchymateuses** (environ 65 % des cellules hépatiques) des cellules de grande taille orientées avec un pôle sinusoidal (ou vasculaire) en contact direct avec les cellules endothéliales vasculaires (qui ne possèdent pas de lame basale) au travers de l'espace de Disse et un pôle canaliculaire (ou biliaire) définissant le

canalicule biliaire qui ne possède pas de paroi propre, reliées entre elles par des jonctions épithéliales. Chaque hépatocyte contient du glycogène stocké dans le cytoplasme, des mitochondries et des peroxyosomes et un REG et un REL abondants illustrant la fonction de synthèse de la cellule.

- **Cellules endothéliales** (20 % des cellules hépatiques) se trouvent à proximité des hépatocytes, et assurent des échanges importants avec ces derniers.

Cellules de Küpffer (10 % des cellules hépatiques) sont des macrophages résidants, bordants localisés dans l'espace de Disse. Ils phagocytent les hématies âgées et les micro-organismes parvenant au foie par la veine porte, jouant un rôle central dans les mécanismes de défense de l'organisme.

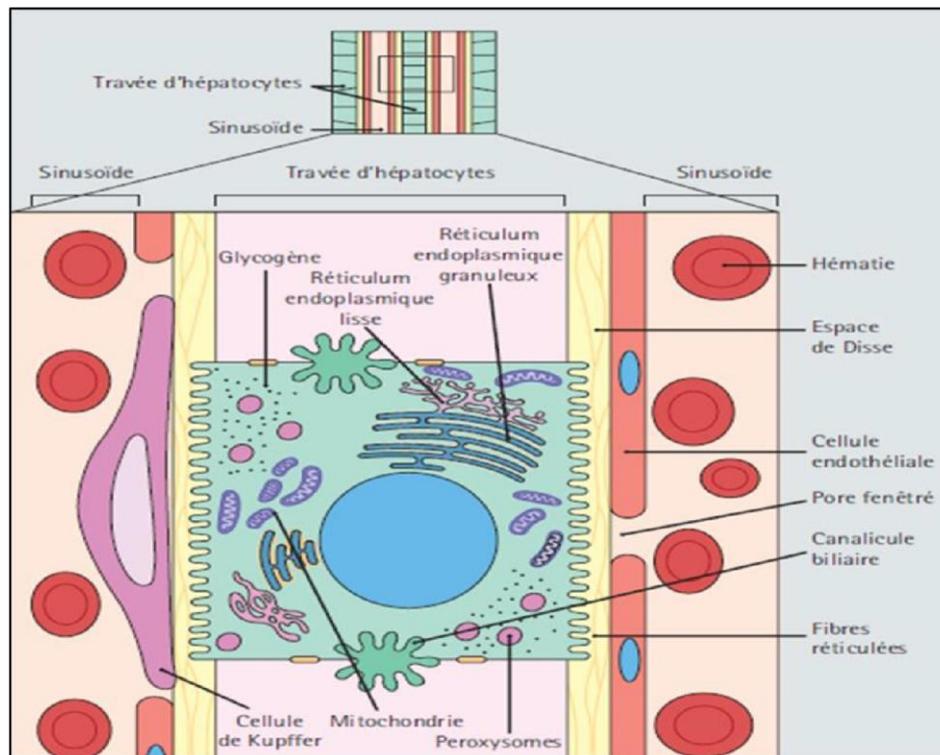


Figure 4 : Schéma illustratif montrant les différents constituants d'un hépatocyte (Lacour et Belon, 2016)

- **Les cellules de Ito** : ou cellules étoilées du foie, (5% des cellules hépatiques), localisées au niveau de l'espace de Disse. Elles sont spécialisées dans le stockage des graisses et de la vitamine A dans le processus de fibrose hépatique.

1.4 Fonctions du foie : le foie joue plusieurs rôles métaboliques à savoir :

- Hydrolyse des lipides en acide gras et glycérol pour produire de l'énergie sous forme d'ATP ou de lipoprotéines libérées dans la circulation sanguine (**Bessagnet et Desmoulière, 2021**).
- Synthèse du cholestérol et des phospholipides, essentiels pour la synthèse des sels biliaires, des hormones stéroïdiennes et des membranes cellulaires. (**Nguyen et al., 2008**)
- Synthèse des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, LDL et HDL) permettant le transport des lipides.
- Digestion des lipides en sécrétant la bile qui est ensuite déversé dans le duodénum.
- Synthèse des protéines plasmatiques (comme l'albumine, qui permet le transport de multiples molécules et médicaments), les protéines de l'hémostase (fibrinogène, facteurs prothrombiniques), les protéines de l'inflammation (système du complément) (**Bessagnet et Desmoulière, 2021**) .
- Synthèse des enzymes : aspartate amino-transférase, alanine amino-transférase, lactate déshydrogénase, et la phosphatase alcaline, sont des marqueurs spécifiques de différentes pathologies hépatiques comme la cytolysse hépatique ou la cholestase (**Lacour et Belon, 2016**) .
- Maintien de la balance glycémique : libération du glucose hépatique dans l'organisme en cas d'hypoglycémie par glycogénolyse ou être stocké en cas d'hyperglycémie par glycogénogenèse (**Silbernagl et Despopoulos, 2004**).
- Détoxification du sang via les enzymes de phase I généralement des cytochromes P450 (CYP450) responsable de greffer des groupements hydrophiles sur les éléments toxiques afin de les rendre plus hydrosolubles et favoriser leur élimination dans les urines (**Bessagnet et Desmoulière, 2021**) .
- Activation de la vitamine D nécessaire à la minéralisation osseuse et à la contraction musculaire et stockage des vitamines lipophiles de types A, D, E, K et les vitamines B hydrophiles, notamment la vitamine B12 (**Bessagnet et Desmoulière, 2021**) .

1.5 Hépatotoxicité

La toxicité peut être à l'origine de plusieurs pathologies telles que la cirrhose hépatique qui se manifeste par une atteinte grave et irréversible majoritairement induite par la

consommation d'alcool, l'hépatite virale, la stéatose hépatique, les maladies rare désignée par une désorganisation de l'architecture lobulaire, la nécrose cellulaire permettant le développement d'une fibrose (**Bessaguet et Desmoulière, 2021**) .

2 Pesticides

2.1 Généralités et définitions

Le mot pesticide s'est élaboré du mot anglais « *Pest* » signifiant « insecte nuisible ou parasite » plus le suffixe « *-Cide* » tiré du verbe latin *Caedere* qui signifie « tuer, faire disparaître ou éliminer ».

Selon **FAO (1992)** , un pesticide est un terme générique qui caractérise toute substance ou association de substances, destinées à neutraliser, détruire ou combattre les ravageurs ,y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales. Ainsi que les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles , du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou administrés à des animaux pour lutter contre les insectes ou autres parasites dans ou sur leur corps.

2.2 Classification des pesticides

Les pesticides diffèrent par leurs besoins et leurs propriétés physico-chimiques et sont donc classés sur la base de différents critères. La nouvelle classification désormais employé par l'OMS et le système général harmonisé vise à mettre en avant la santé publique (**Akashe et al., 2018**) .

2.2.1 Classification selon l'OMS

Les pesticides ont été regroupés en 5 catégories en fonction de l'estimation de la dose létale 50 (DL50). Ce qui a permis d'obtenir un classement de la toxicité aigüe la plus faible à la plus élevée. (**Tableau 1**)

Tableau I : Classification des pesticides recommandée par l'OMS (**OMS, 2018**)

Classe OMS		DL pour les so rats (Mg/kg de poids corporel)		Exemples
		Oral	Dermique	
Ia	Extrêmement dangereux	< 5	< 50	Parathion, Dieldrine, Phorate
ib	Hautement dangereux	5 -50	50 - 200	Aldrine, Dichlorvos
II	Modérément dangereux	50-2000	200-2000	DDT, Chlordane
III	Légèrement dangereux	Plus de 2000	Plus de 2000	Malathion
U	Peu susceptible de présenter un danger aigu	5000 ou plus		Carbétamide, Cycloprothrine

2.2.2 Classification selon la nature de la cible visée

Les pesticides sont classés en fonction de l'organisme nuisible qu'ils tuent. Des noms spécifiques leur sont attribués pour refléter leur activité spécifique contre les ravageurs : **Insecticides, herbicides, fongicides, rodenticides, acaricides, nématocides...** etc (Akashe et al., 2018) .

2.2.3 Classification selon la nature chimique

Les pesticides sont aussi classés selon leurs natures chimiques

Tableau II : Classification selon la nature chimique (Akashe et al., 2018).

Familles des pesticides	Classes selon la nature chimique
Insecticides	carbamates, organochlorés, organophosphorés, pyréthri-noïdes, néonicotinoïdes ...
Fongicides	fongicides azotés, fongicides amides, fongicides aromatique, fongicides décarboximides...
Herbicides	herbicides anilides, herbicides phénoxyacétiques, des herbicides à base d'ammonium quaternaire...
Rodenticides	Inorganique, organique (coumarinique)

2.3 Toxicité des pesticides

Les pesticides sont des produits phytosanitaires toxiques pour l'être humain, et leur degré de toxicité diffère d'une classe à une autre sous l'influence de plusieurs facteurs : le type de pesticide, la dose, les modalités de l'exposition, le degré d'absorption, la nature des effets de la matière active et de ses métabolites et l'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme (OMS, 1991) .

2.3.1 Intoxication aiguë des pesticides

Elle résulte d'une mauvaise utilisation ou d'un usage accidentel des pesticides qui se manifeste immédiatement ou après un peu de temps (quelques minutes, heures ou jours) après une exposition unique ou de courte durée à un pesticide. Elle est observée surtout chez les travailleurs responsables de la préparation ou de l'application de pesticides en milieu professionnel (**Cherin et al., 2012**).

Ce type de toxicité concerne surtout la classe des organochlorés comme le DDT, l'hexachlorobenzène, la dieldrine, le lindane. . . et les pesticides de demi-vie plus courte dans l'organisme, tels que les fongicides (**Cherin et al., 2012**), ainsi que les organophosphorés et les carbamates (insecticides neurotoxiques inhibiteurs des cholinestérases) plus rarement des dérivés de la coumarine (anticoagulants rodenticides).(**Yélamos et al., 1992 ; Aardema, 2008**).

L'intoxication aiguë par les pesticides est à l'origine de plusieurs effets locaux, elle provoque des irritations de la peau, des muqueuses, des réactions allergiques cutanées ou oculaires, des vomissements, la toux et le gêne respiratoire. Elle peut générer ainsi des effets systémiques telle l'atteinte d'un ou plusieurs organes ou systèmes : foie, rein, système nerveux central

La toxicité induit plusieurs symptômes, à savoir des maux de tête (Céphalées) ; des nausées, des vomissements, la fatigue, la diarrhée, trouble de vision, des difficultés respiratoires, convulsions, coma.

2.3.2 Intoxication chronique

Elle regroupe l'ensemble des effets délétères qui touchent un organisme vivant suite à une exposition répétée sur une longue période à un toxique à des doses multiples non létales pouvant être réversible ou irréversible (**Jaeger et al., 2012**). Elle peut causer de multiples effets cancérogènes, mutagènes (tumeurs cérébrales et cancers hormonodépendants ; cancers de la prostate, du sein, des testicules, de l'ovaire) (**Inserm, 2008**), reprotoxiques (atteinte de la spermatogénèse, cryptorchidie, cancer du testicule et altération de la fertilité masculine, effets neurotoxiques) (**Sharpe et Skakkebaek, 1993**).

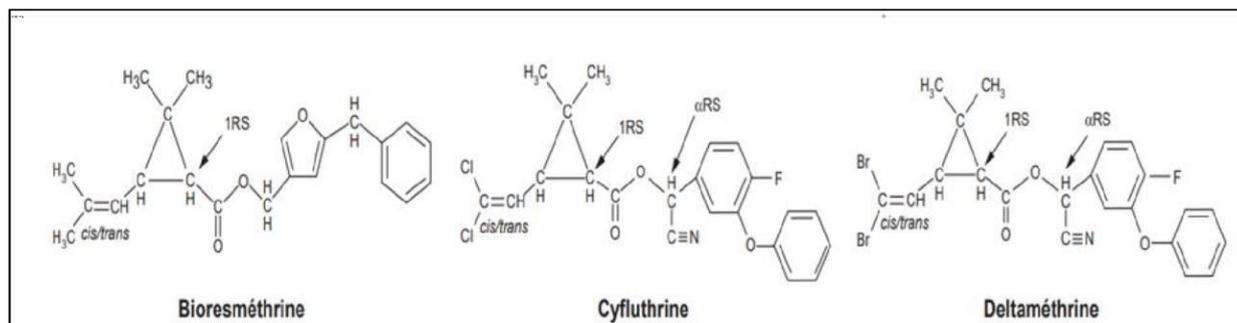


Figure 5 : Structure chimique de quelques pyréthrinoides (Testud et Grillet, 2007)

2.4 Pyréthrinoides de synthèse

Généralités

Les pyréthrinoides sont des analogues chimiques synthétiques des insecticides naturels des pyréthrine produites et extraites à partir des fleurs des chrysanthèmes *Chrysanthème cinerariaefolium* et *Chrysanthème cineum*. (He et al., 2008), employés en Chine dès le Ier siècle de notre ère, avant d'être substitués premièrement par les composés organophosphorés au début des années 1940 car les pyréthrine naturelles présentaient l'inconvénient d'être très rapidement inactivées par la lumière, ce qui limite considérablement leur usage en extérieur. (Testud et Grillet, 2007), puis par les carbamates et enfin les pyréthrinoides synthétiques qui sont développés et introduits sur le marché dans les années 1960 et 1970 (Thatheyus et Gnana Selvam, 2013) en remplacement des organophosphorés jugés plus toxiques.

Ce sont des insecticides polyvalents de nature lipophile, s'adsorbent sur les particules du sol où ils sont rapidement hydrolysés par les micro-organismes et ne laissent pas des résidus significatifs. (Bradberry et al., 2005 ; Ashi, 2015)

2.4.1 Avantages d'utilisation des pyréthrinoides

Efficacité à des faibles doses, le peu de résistances développées par les insectes, la faible toxicité chez les mammifères et l'absence de persistance dans l'environnement, le coût de production réduit (Testud et al., 2001).

2.4.2 Composition chimique des pyréthrinoides

Les pyréthrinoides sont des esters composés de l'acide cyclopropane-carboxylique (acide chrysanthémique) et un composant alcool. On distingue deux groupes différents :

- **Dérivés du groupe 1** : les premiers synthétisés par substitution d'alcool et qui avaient l'inconvénient d'être photo labiles (He et al., 2008) (par exemple l'alléthrine, la

resméthrine, la D-phénothrine et la perméthrine) et qui provoquent principalement des tremblements (**T-syndrome**) .

- **Dérivés du groupe 2** : ils sont beaucoup plus photo-stables, dont le carbone α est substitué par un groupement cyané et par un radical phénoxyphényle (par exemple, la deltaméthrine, la cyperméthrine, la cyfluthrine et le fenvalerate) et qui provoquent la choréoathétose et la salivation (**CS-syndrome**) (**Tordoïr et al., 1994**) .

Chaque molécule comprend au moins un centre d'asymétrie chirale, d'où l'existence d'énantiomères (isomères optiques) R et S. De plus, la configuration cis ou trans au niveau du carbone 3 est à l'origine de stéréo-isomères

Tableau III : Types de pyréthrinoides synthétiques (**Thatheyus et Gnana Selvam, 2013**)

Type I Pyrethroids	Type II Pyrethroids
Allethrin	Cyfluthrin
Bifenthrin	Cyhalothrin
Permethrin	Cypemethrin
Phenothrin	Deltamethrin
Resmethrin	Fenvalerate
Tefluthrin	Fenpropathrin
Teramethrin	Flucythrinate
	Flumethrin
	Fluvalinate
	Tralomethrin

2.4.3 Toxicité des pyréthrinoïdes

Ils agissent comme des neuropoisons par contact et ingestion : ils entraînent une sidération immédiate (effet knock-down) puis la mort du ravageur ; certains dérivés possèdent en outre une activité inhibitrice de la ponte et de la prise de nourriture par les larves (**Testud et al., 2001**).

Dans les formulations commerciales, l'activité des pyréthrinoïdes est généralement renforcée par l'ajout d'un synergiste tel que le butoxyde de pipéronyle. Cette molécule augmente l'efficacité et la durée d'action de l'insecticide en inhibant la dégradation métabolique de l'ingrédient actif. Il agit comme un substrat alternatif pour la famille d'enzymes monooxygénase du cytochrome P450 (CYP) responsable de la dégradation métabolique de ces pesticides, inhibant ainsi toute autre activité du CYP (**Testud et al., 2001**).

Les pyréthrinoïdes sont environ 2250 fois plus toxiques pour les insectes que pour les mammifères, car les insectes ont une sensibilité accrue des canaux sodiques, une taille plus petite et une température corporelle plus basse, tandis que les mammifères sont protégés par une

absorption cutanée faible et un métabolisme rapide des composants toxiques en métabolites non toxiques (Bradberry *et al.*, 2005).

2.4.4 Voies d'expositions

Les pyréthrinoïdes peuvent pénétrer dans l'organisme par plusieurs voies :

- **Voie cutanée** : Constitue la principale voie d'exposition aux pyréthrinoïdes surtout en milieu professionnel (Yélamos *et al.*, 1992) et concerne notamment les formulations liquides qui touche principalement le visage et provoque la paresthésie faciale due à l'hyperactivité des fibres nerveuses sensorielles cutanées. L'intoxication par voie cutanée varie selon : les propriétés physicochimiques du produit, l'absence de protection individuelle, le port prolongé de vêtements de travail contaminés et le délai entre deux périodes d'exposition (Cherin *et al.*, 2012).
- **Voie respiratoire** : Elle est moins importante mais reste remarquable lorsque l'utilisation des pyréthrinoïdes est dans des espaces confinés l'absorption respiratoire représentait moins de 1 % de la dose absorbée par la peau, étant donné que les pyréthrinoïdes ne sont pas volatils et les gouttelettes d'aérosols générées par les pulvérisateurs sont retenues au niveau des voies aériennes supérieures.
- **Voie gastro-intestinale** : l'ingestion peut être accidentelle ou volontaire (suicide) (Yélamos *et al.*, 1992). Après ingestion les pyréthrinoïdes subissent une hydrolyse par des estérases non spécifiques du tube digestif, limitant l'absorption systémique. La fraction absorbée se distribue rapidement dans tous les tissus, notamment le système nerveux central, riche en lipides, et le tissu graisseux (Bradberry *et al.*, 2005).

2.4.5 Domaines d'application des pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes peuvent être utilisés dans plusieurs domaines (Tableau IV) :

Tableau IV : Domaines d'application des insecticides pyréthrinoïdes (Hénault-Ethier, 2016).

Domain d'application	Utilisation des pyréthrinoïdes
En agriculture	Cultures cibles : coton, céréales, houblon, plantes ornementales, pommes de terre et légumes, Applications : lutter contre les pucerons, les coléoptères, les lépidoptères, les hémiptères et les diptères

En thérapeutique	Comme antiparasitaires externes par exemple dans les shampooings anti-poux et lotions destinés au traitement topique de la gale et des pédiculoses humaines
Santé publique (lutte anti-vectorielle)	Utilisés par les services de santé publique pour contrôler les cafards, les moustiques, les tiques et les mouches, qui peuvent agir comme vecteurs de maladies infectieuses
Vétérinaire	Les applications vétérinaires contre les tiques, les puces et autres ectoparasites animaux

2.5 Lambda cyhalothrine (LCT)

2.5.1 Généralités

La lambda cyhalothrine est un insecticide qui appartient au groupe des pyréthrinoides de synthèse de type II, utilisée pour lutter contre un large éventail d'insectes nuisibles dans le but de protéger les diverses cultures (**Awumbila et Bokuma, 1994**).

Lambda cyhalothrine est utilisée en agriculture, pour la protection des plantes, la protection des denrées alimentaires et la lutte contre les vecteurs de maladies (**Anadón et al., 2006**) car elle présente une action frénatrice sur les acariens phytophages ainsi qu'une action ovicide sur les œufs de lépidoptères (papillons).

2.5.2 Propriétés physico-chimiques de la lambda-cyhalothrine

La LCT, de formule moléculaire $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$ et de poids moléculaire de 449 g/mol, possède une apparence solide, incolore à température ambiante et jaunâtre en solution, d'une odeur aromatique spécifique des solvants issus du pétrole, peu soluble dans l'eau et soluble dans la plupart des solvants organiques comme l'acétone, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, le toluène et le méthanol (**Zoumenou et al., 2015**).

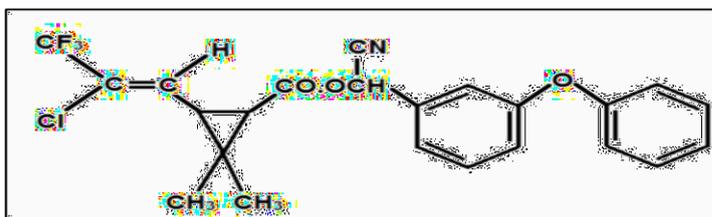


Figure 6 : Structure chimique de la lambda cyhalothrine (**Kanhar, 2017**)

2.5.3 Toxicocinétique de lambda cyhalothrine

La lambda-cyhalothrine est active à une très faible dose sur le système nerveux et provoque la paralysie et la mort des insectes. Sa disparition du plasma et des tissus nerveux des rats a été

caractérisée par une phase initiale de distribution rapide suivie d'une phase d'élimination plus lente (Hénault-Ethier, 2016).

La lambda-cyhalothrine pénètre plus précisément la cuticule de l'insecte, perturbe la conduction nerveuse dans les minutes qui suivent, ce qui conduit à la cessation de l'alimentation, la perte de contrôle musculaire, la paralysie et la mort éventuelle (He et al., 2008).

Elle interfère avec la propagation des signaux neuronaux en provoquant l'inhibition de la fermeture des canaux sodiques voltage-dépendants de la membrane des cellules nerveuses ; les pyréthrinoides sont donc connus pour être des inhibiteurs de l'inactivation du potentiel d'action (*Open Channel Blockers*) (Testud et Grillet, 2007 ; Hénault-Ethier, 2016).

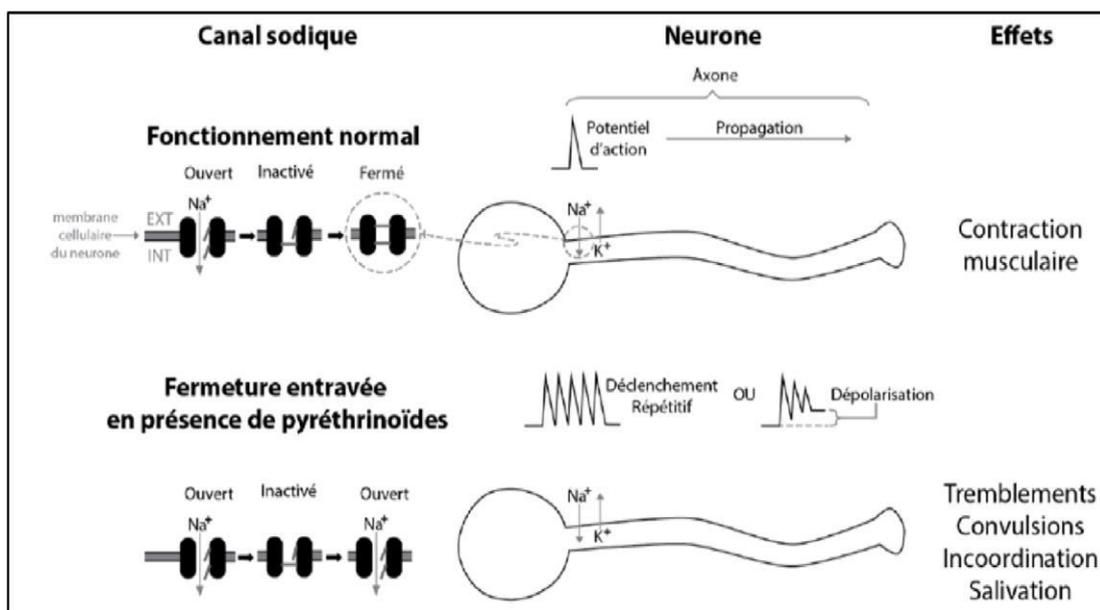


Figure 7 : Mécanisme d'action de LCT (Hénault-Ethier, 2016)

Cela mène à un état d'hyperexcitabilité des cellules nerveuses perturbant ainsi la conduction nerveuse qui conduit une sidération immédiate (effet knock-down), une perte de contrôle musculaire, des tremblements, des mouvements involontaires et la salivation chez les animaux, la paralysie et la mort de l'animal éventuellement (Zoumenou et al., 2015).

3 Stress oxydatif

3.1 Généralités

Il existe un équilibre dans l'organisme entre les espèces réactives d'oxygène (ERO), qui sont présentes en faible concentration à l'état basal, et le système antioxydant, qui comprend des enzymes, des vitamines, des oligoéléments et le glutathion.

Ce mécanisme sert de protection contre une production excessive d'ERO. Par conséquent, le stress oxydatif se caractérise par un déséquilibre entre la production des ERO et la création d'antioxydants et les systèmes de défense (**Delattre et al., 2007**).

Selon **Favier (2003)** ces radicaux libres sont produits avec modération par divers mécanismes physiologiques vitales ; cependant, la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes, et l'organisme doit se protéger de ces excès grâce à divers systèmes antioxydants.

Les radicaux libres sont constamment formés en quantités modestes dans des conditions quotidiennes typiques, comme les médiateurs tissulaires, les résidus énergétiques ou les réactions de défense, et cette production physiologique est parfaitement contrôlée par les mécanismes de défense, qui s'adaptent également au niveau de radicaux présents.

Nous affirmons que l'équilibre antioxydant/pro-oxydant est typique dans ces conditions. Si ce n'est pas le cas, soit à cause d'une carence en antioxydants, soit à cause d'une surproduction massive de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé "stress oxydatif". Cet état de déséquilibre, qui a de graves répercussions, peut être causé par divers facteurs. Toute espèce réactive d'oxygène et d'azote, qu'elle soit radicale ou non, est qualifiée de prooxydant (**Achach, 2006**).

Un radical libre est une entité chimique, une molécule ou un atome qui possède un ou plusieurs électrons célibataires et qui peut exister indépendamment. Le radical libre a pour caractéristiques d'être instable, hautement réactif et d'avoir une courte durée de vie. (**Goudable et Favier, 1997**)

3.2 Les espèces réactives d'oxygènes (EROs)

Parmi toutes les espèces radicalaires qui peuvent se développer dans les cellules, il est important de distinguer un petit groupe de composés radicaux qui jouent un rôle spécifique dans la physiologie, que nous appellerons radicaux primaires. D'autres radicaux libres, appelés radicaux secondaires, se forment lorsque ces radicaux primaires réagissent avec les composants biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène via des réductions

d'électrons, comme l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH^\cdot , ou de l'azote via le monoxyde d'azote NO^\cdot (Yoshikawa *et al.*, 2000).

D'autres espèces dérivées de l'oxygène, appelées espèces actives de l'oxygène, comprennent l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde (ONOOH). Ce ne sont pas des radicaux libres, mais ils sont réactifs et peuvent servir de précurseurs de radicaux. L'expression "espèces réactives de l'oxygène" désigne le groupe des radicaux libres et de leurs précurseurs (Favier, 2003)

3.3 Les conséquences physiopathologiques

La génération excessive de radicaux libres provoque des lésions biologiques directes (oxydation de l'ADN, oxydation des protéines, oxydation des lipides, oxydation des glucides), ainsi que des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut également répondre à ces composés anormaux en produisant des anticorps, qui peuvent toutefois aussi être des autoanticorps, ce qui entraîne une troisième vague d'attaque chimique (Favier, 2003). Le stress oxydant provoque l'apparition de nombreux molécules biologiques anormales et la surexpression de gènes particuliers, ce qui en fait la cause première de diverses maladies, dont le cancer, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'œdème pulmonaire et le vieillissement accéléré (Bensaad *et al.*, 2005).

4. VITAMINE C

La vitamine C est un nutriment essentiel qui joue un rôle important dans la nutrition humaine et le maintien de la santé. Elle a un impact significatif sur la croissance et la différenciation des cellules, et elle est essentielle au bon fonctionnement du système immunitaire (Wintergerst *et al.*, 2006).

La vitamine C a également un rôle antioxydant bien connu dans la prévention de certaines tumeurs malignes (Patil *et al.*, 2009). Selon Klenner, (1949) la vitamine C est un excellent traitement contre les virus, les bactéries et autres agents pathogènes microbiens.

L'acide L-ascorbique est un type de vitamine C nécessaire au traitement du scorbut. En général, l'expression désigne la forme oxydée de la vitamine, l'acide L-déhydroascorbique, qui se transforme facilement en acide L-ascorbique dans le corps humain (Doseděl *et al.*, 2021).

4.1. Structure chimique

C'est un composé à six carbones de formule chimique générale $C_6H_8O_6$ structurellement apparenté au glucose, constitué de deux composés interconvertibles : L'acide l-ascorbique, qui est un puissant agent réducteur, et son dérivé oxydé, l'acide L déhydroascorbique. Elle est composée d'une fonction cétone, d'un cycle lactone, d'une fonctionène-diol (**Guilland et al., 1998**).

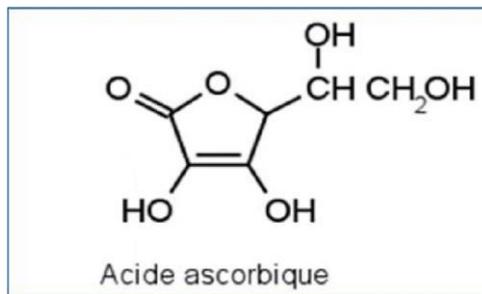


Figure 8: Structure de la vitamine C (**Roche et al., 2005**)

L'acide ascorbique est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité. En solution aqueuse, en revanche, il se transforme rapidement au contact de l'oxygène. La présence d'ions métalliques ou d'un environnement pauvre en oxygène accélère considérablement le processus d'oxydation. (**Roche et al., 2005**).

4.2. Source et besoin

Contrairement à la plupart des vertébrés, les cobayes, les chauves-souris, les oiseaux passériformes et les primates, y compris l'homme, sont dépourvus de L-gulcono-1,4-lactone oxydase et ne peuvent donc pas synthétiser pour contenir environ 1,5 g de vitamine C (**Doseděl et al., 2021**).

Les fruits et légumes, en particulier les agrumes notamment (citron, pamplemousse, choufleur, pomme de terre ...etc.) sont riches en vitamine C (**Liu et al., 2012**). Un certain nombre d'études rapportées ont conclu qu'un apport quotidien de 200 mg de vitamine C maximiserait les avantages potentiels pour la santé de la majorité de la population adulte. L'absorption jusqu'à 3 g/jour ne présente aucun risque de toxicité pour l'organisme (**Frei et al., 2012**).

4.3. Carence

La carence en vitamine C est connue sous le nom de *scorbut* existé dans le cadre d'un régime pauvre en fruits et légumes (**Parreau et al., 2015**). Une carence prolongée en vitamine

C interfère avec la synthèse normale des tissus, qui est le problème sous-jacent aux symptômes cliniques du scorbut.

4.4. Toxicité

A des doses quotidiennes inférieures à 1 g, la vitamine C n'entraîne pratiquement jamais d'effets indésirables. Lors de l'administration de fortes doses, des effets délétères peuvent survenir : agitation, insomnie (la prendre le matin), diarrhée. La vitamine C augmente les niveaux d'oxalate dans l'urine de manière dose-dépendante et il existe des inquiétudes quant à la possibilité de formation de calculs urinaires (**Doseděl et al., 2021**).

4.5. Fonction physiologique

La vitamine C joue un rôle essentiel dans une variété de processus enzymatiques et biologiques présents dans tout l'organisme, notamment le système nerveux, le système immunitaire, la fonction cutanée et le métabolisme.

4.2.1. Vitamine C en tant que cofacteur enzymatique

Les fonctions enzymatiques de la vitamine C sont liées soit aux dioxygénases (synthèse du collagène et de la carnitine, implication dans la transcription des gènes, régulation de la traduction par divers mécanismes et élimination de la tyrosine), soit aux monooxygénases (synthèse des hormones). Toutes ces oxygénases vitamine C-dépendantes ont un métal dans leur site actif, comme le fer ou le cuivre. Le rôle de la vitamine C dans divers processus enzymatiques a été largement reconnu (**Doseděl et al., 2021**).

4.2.2. Vitamine C et le stress oxydatif

La vitamine C ou acide ascorbique est hydrosoluble et considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant. Présente sous sa forme ascorbate, elle piège les radicaux peroxydes en phase aqueuse avant qu'ils initient la réaction de peroxydation lipidique protégeant ainsi les membranes et les lipoprotéines. La vitamine C peut avoir un effet pro-oxydant et ainsi se lier avec des ions métalliques dont Fe^{3+} pour le réduire en Fe^{2+} qui pourra ensuite catalyser différentes réactions dont celle de Fenton :

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH} + \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$ générant ainsi de nouvelles EROs (**Gulcin, 2012**)

La vitamine C élimine efficacement l'oxygène singulet, le superoxyde, l'hydroxyle, le radical peroxyde hydrosoluble et l'acide hypochloreux. Elle est également considérée comme une

excellente source d'électrons et peut donc donner des électrons aux radicaux libres tels que le radical hydroxyle et superoxyde et éteindre leur activité.

4.2.3. Vitamine C et la synthèse du collagène

Le mécanisme d'hydroxylation de la vitamine C joue un rôle dans une variété de réactions biochimiques. Elle joue un rôle vital dans la synthèse du collagène ; c'est un cofacteur essentiel de la proline oxydase et de la lysine oxydase, qui interviennent dans la biosynthèse du procollagène, ainsi qu'un cofacteur de la synthèse des catécholamines (**Bachmeyer, 2006**).

4.2.4. Vitamine C et l'immunité

La vitamine C semble avoir une variété d'effets bénéfiques sur les fonctions cellulaires du système immunitaire inné et adaptatif. C'est un puissant antioxydant qui protège l'organisme du stress oxydatif endogène et exogène, mais elle stimule également la migration des neutrophiles vers le site de l'infection, améliore la phagocytose et la synthèse des oxydants, et a des effets antimicrobiens. Tout en protégeant le tissu hôte en augmentant l'apoptose et en diminuant la nécrose des neutrophiles. Par conséquent, il est clair que la vitamine C est nécessaire au système immunitaire pour mettre en place et maintenir une réponse appropriée aux agents pathogènes, ainsi que pour traiter les maladies respiratoires et systémiques (**Carr et Maggini, 2017**).

4.6. Pharmacocinétique de la vitamine C

4.6.1. Absorption

L'absorption de la vitamine C a lieu principalement dans l'iléon distal de l'intestin. Le SVCT1 facilite la translocation vers les entérocytes (sodium-dépendant vitamin C transporter 1) (**Doseděl et al., 2021**).

La vitamine C étant présente sous une forme non ionisée au niveau de l'estomac, une certaine diffusion passive dans le tractus gastro-intestinal ne peut être totalement exclue (**Lykkesfeldt et Tveden-Nyborg, 2019**).

4.6.2. Distribution

Après ingestion, la vitamine C pénètre rapidement dans la circulation sanguine, puis propage à des degrés divers dans tous les tissus. Dans le sang au total, nous avons trouvé principalement de l'acide ascorbique (80 à 95 %) ; l'acide déhydroascorbique n'est que de 5 à 20 % Vitamine C

circulante. Faibles concentrations (5 à 15 mg/l) dans le plasma et les globules rouges, très élevée dans les plaquettes et les leucocytes (80 fois plus élevé). La concentration leucocytaire reflète la concentration tissulaire (**Djeffal, 2014**).

4.6.3. Métabolisme et Excrétion

La vitamine C est réabsorbée à plus de 90% au niveau tubulaire rénal après filtration postglomérulaire (**Fain, 2004**). Elle est métabolisée dans le foie et les reins, avec une série de réactions. La vitamine C non métabolisée et les métabolites de la vitamine C, comme l'oxalate, sont largement excrétés dans l'urine (**Hellman et Burns, 1958**). L'élimination urinaire se fait sous forme native ou sous formes des métabolites (**Doseděl et al., 2021**).

5. Adhérence cellulaire

5.1. Jonctions cellule-cellule

Les jonctions intercellulaires sont importantes pour maintenir la polarité et l'intégrité des cellules et des tissus. D'après **Green et al (2010)**, les vertébrés possèdent trois systèmes de jonctions intercellulaires :

- Jonctions gap qui servent de canaux intercellulaires permettant le transfert direct d'ions et de petites molécules entre les cellules.
- Jonctions serrée principal déterminant cellulaire de la fonction de la barrière épithéliales.
- Jonction d'ancrage comprenant les desmosomes.
- Jonctions d'adhérence AJ qui s'associent au cytosquelette cortical pour réguler le comportement des cellules et des tissus.

Parmi les molécules structurelle constitutives qui s'assemblent pour former les jonctions d'adhérences, les jonctions d'ancrage basées sur cadhérine /cathénine organisent et attachent les microfilaments pour maintenir les propriétés adhésives des cellules et intégrer la signalisation intra et intercellulaires (**Gumbiner, 2015**).

5.2. Molécules d'adhésions cellulaires (CAM)

Les CAM sont des glycoprotéines intrinsèques de la membrane cellulaire dont le domaine NH2 –terminal débordent largement dans la matrice extracellulaire. Ce sont des molécules

hémophiliques, c'est-à-dire qu'une CAM présente à la surface de la cellule adhère à une molécule de même type portée par une cellule adjacente. Selon leurs propriétés physicochimiques, structurales et fonctionnelles, on distingue les CAM indépendantes du calcium et les CAM dépendantes du calcium (Mège, 1991).

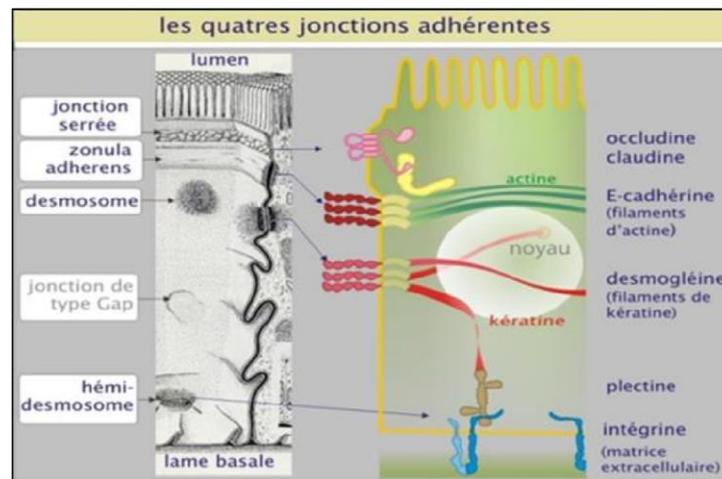


Figure 9 : Schéma présentant les jonctions d'adhérence (Anonyme).

Les molécules d'adhérence cellulaire : molécules morphogénétiques elles sont composées de quatre grandes familles regroupées selon leurs structures : les immunoglobulines, les sélectines, les intégrines et les cadherine.

5.3. Super famille des cadherine

Chaque membre de la famille est constitué d'un domaine extracellulaire, d'une séquence transmembranaire et d'un domaine intracellulaire (Morton *et al.*, 1995). Les molécules d'adhésion cadhérine constituent une grande famille de protéines transmembranaires à passage unique qui assurent la médiation de la formation des jonctions cellule-cellule, des sites d'adhésion intercellulaire dépendants du Ca^{++} qui se développent entre des cellules épithéliales polarisées (Green, 2005).

Dans cette superfamille les cadhérines ont été classées en plusieurs sous-familles sur la base de propriétés communes et de propriétés partagées et des similarités de séquence.

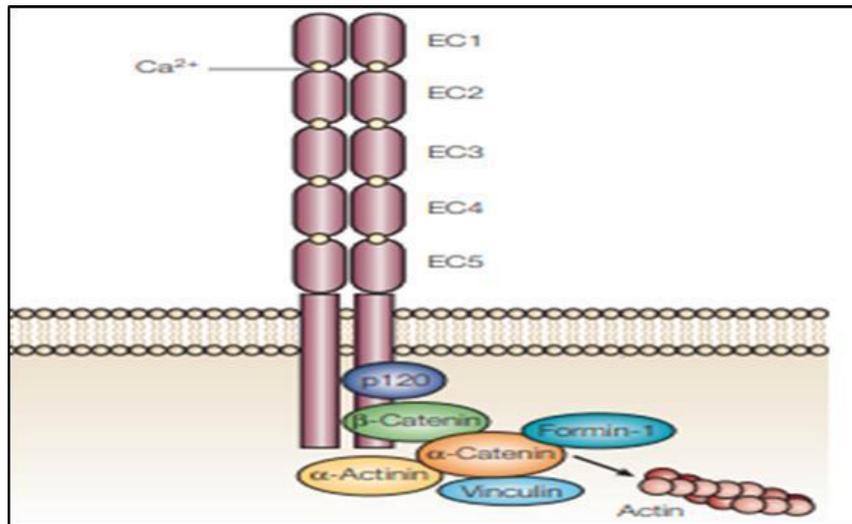


Figure 10 : La jonction d'adhérence et le classique complexe cadhérine-caténine (**Gumbiner, 2005**)

5.4. E-CADHERINE

L'E-cadhérine, est une glycoprotéine transmembranaire située sur le chromosome 16q22.1. Composée de cinq répétitions et d'un domaine cytoplasmique, connus sous le nom de domaines E-CAD (EC1-EC5).

Sa région extracellulaire a une fonction d'adhésion homophile dépendante du Ca^{2+} . Elle est liée au cytosquelette par association avec plusieurs caténines (α et β) cytoplasmiques (**Cavallaro et Christofori, 2004 ; Gumbiner 2005**).

La partie intracellulaire juxtamembranaire de l'E-cadhérine se lie à la caténine p120, qui est une protéine capable de moduler le regroupement de l'E-cadhérine essentielle à la stabilité de la cadhérine et à la formation d'un système de défense (**Baranwal et Alahari, 2009 ; Hirano et al., 1992**).

Le segment distal de domaine cytoplasmique de l'E-cadhérine peut interagir avec la β caténine ou la plakoglobine (gamma caténine), des protéines qui se lient à leur tour à la α caténine. L'extrémité carboxyle de la α -caténine se lie directement à la F-actine. Par un mécanisme direct, la α -caténine peut alors relier le complexe cadhérine-caténine lié à la membrane au cytosquelette d'actine (**Hirano et al., 1992**).

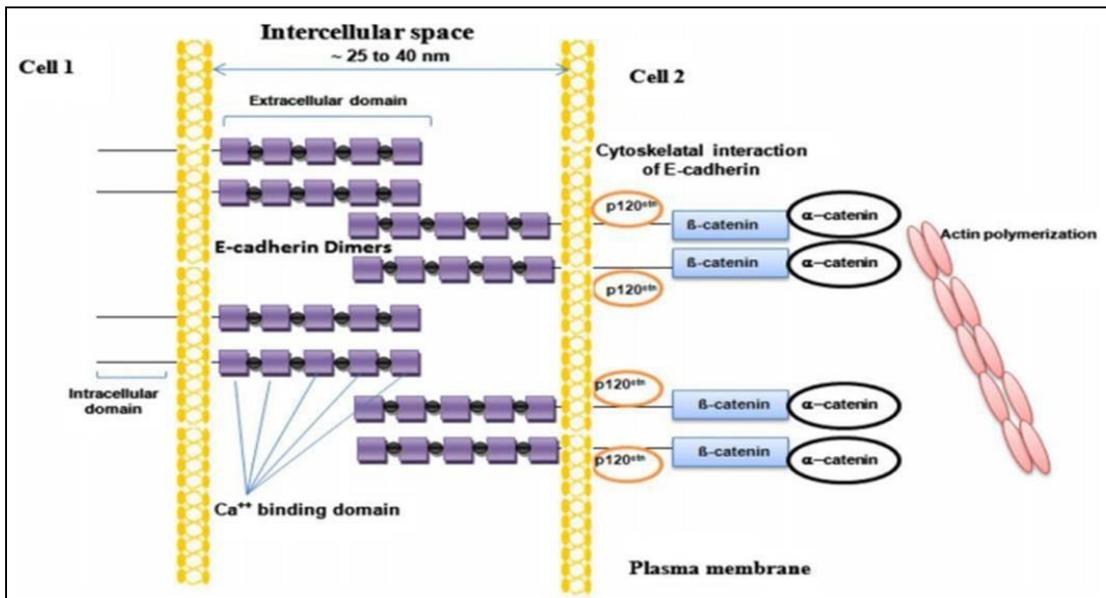


Figure 21 : illustration schématique de l'E-cadhérine dans la formation de la jonction d'adhérence (Baranwal et Alahari, 2009).

5.4.1. Voie de signalisation Wnt/ β -caténine

Les molécules de β -caténine sont impliquées dans l'adhésion et la signalisation cellulaire. En plus de leur implication structurelle dans la stabilisation des contacts intercellulaires, les composants du complexe cadhérine-caténine jouent également un rôle dans l'activation des réseaux de transduction du signal.

La caténine est un régulateur clé de la signalisation Wnt canonique, avant d'être transloquée dans le noyau, où elle s'associe aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF pour activer la transcription de gènes cible, conduisant à un sous-ensemble de rôles cellulaires tels que l'adhésion cellulaire, la morphogenèse tissulaire et le développement tumoral (Clevers, 2006 ; Grigoryan, 2008).

En l'absence de signalisation Wnt, un complexe de destruction multiprotéique impliquant les Axin, et la polyose adénomateuse (APC) et est continuellement phosphorylée par GSK-3 β qui à son tour favorise la phosphorylation des résidus sérine N-terminaux de la caténine cytoplasmique, conduisant à son ubiquitination et à sa destruction protéasomique (Luo et lin 2004).

En interagissant avec les récepteurs Frizzled et en émettant des signaux par l'intermédiaire des protéines LRP5/6 liées aux lipoprotéines de basse densité qui les accompagnent, la

signalisation Wnt bloque ce processus de dégradation, permettant à la caténine de s'accumuler dans le cytosol et de pénétrer dans le noyau (Amit *et al.*, 2002 ; Yanagawa *et al.*, 2002).

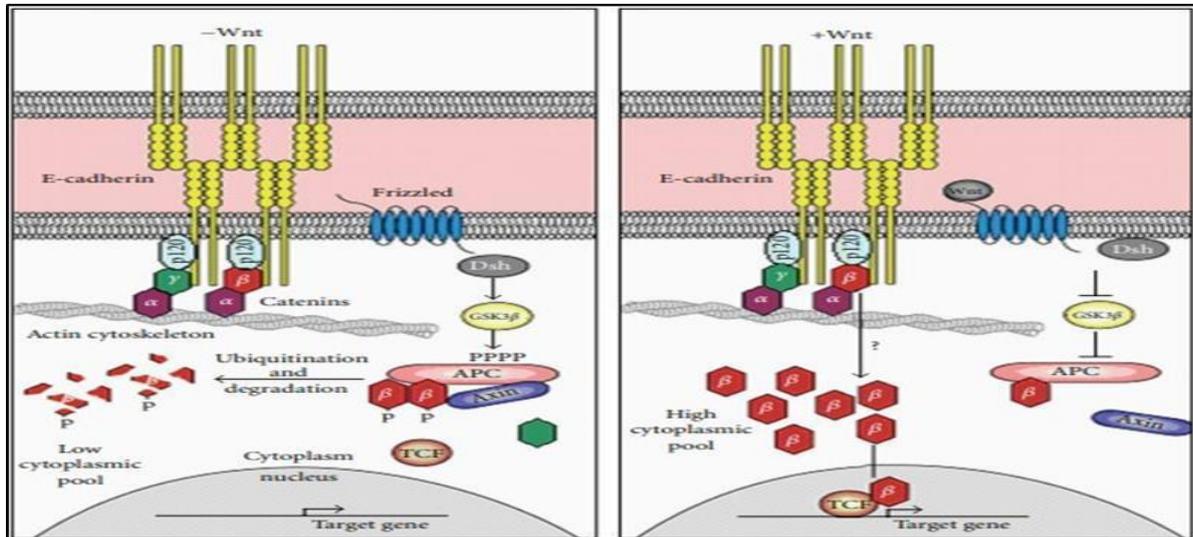


Figure 32 : Schéma récapitulatif de la voie de signalisation Wnt/β-caténine (Tian *et al.*, 2011).

L'endocytose de l'E-cadhérine, les niveaux d'ERC-caténine et les niveaux du substrat caténine disponibles en aval de la voie Wnt peuvent tous être affectés par la dissociation de l'AJ (Tian *et al.*, 2011).

5.5. PROTEINE P53

Le suppresseur de tumeurs p53 est souvent décrit comme le "gardien du génome". La protéine p53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés, de poids moléculaire de 55kDa et qui est normalement exprimée à taux faible dans les cellules normales avec une courte demeurée de vie.

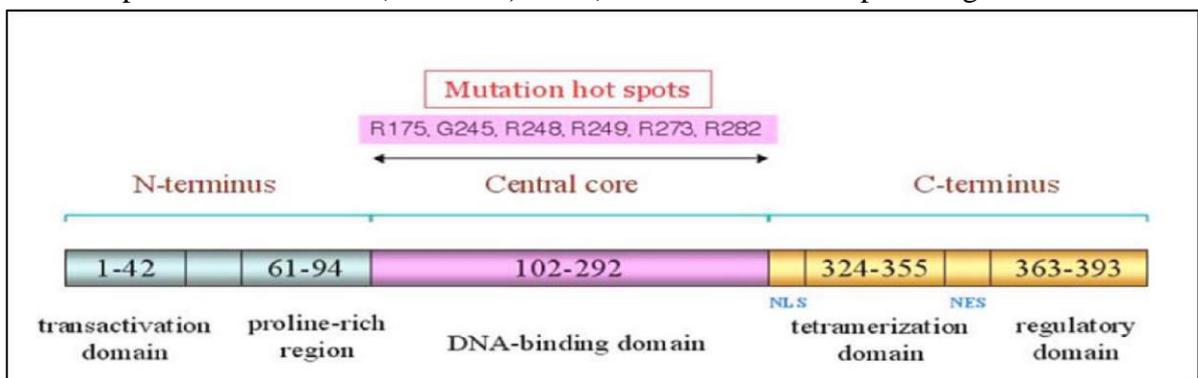
Elle fonctionne comme un régulateur de gènes dont les produits contrôlent négativement la prolifération cellulaire. La forme sauvage de la protéine agit comme un suppresseur de tumeur ; ainsi, la transfection du gène sauvage dans une lignée de cellules d'ostéosarcome dépourvues de p53 endogène abroge le phénotype néoplasique des cellules (May *et May*, 1999).

Des études structurales de p53 ont révélé que la majorité des mutations de p53 trouvées dans les cancers sont des mutations faux-sens qui sont principalement situées dans le domaine central de liaison à l'ADN (Bai *et Zhu*, 2006).

5.5.1. Structure

C'est une phosphoprotéine composée de 393 acides aminés répartis en 05 domaines majeurs :

- Domaine de transactivation qui joue deux rôles majeurs : l'activation transcriptionnelle de gènes cibles et la régulation et la stabilité de p53 par interaction avec une protéine appelée Murine Double Minute 2 (MDM2) (**Stavridi, 2005**).
- Domaine riche en proline est nécessaire à la fois pour la fin du cycle cellulaire et le déclenchement de l'apoptose.
- Domaine central qui interagit avec l'ADN est le domaine de liaison spécifique de l'ADN qui permet l'activation transcriptionnelle nécessaire à la fonction onco-suppressive (**Okorokov, 2006**)
- Domaine de tétramérisation qui aide à la fixation spécifique de P53 ; il est également impliqué dans l'activité oncogène de certaines formes mutantes de P53 (**Stavridi, 2005**)
- Domaine qui joue un rôle à la fois dans la régulation de l'association P53-ADN et, par conséquent, dans la reconnaissance de l'ADN endommagé, ainsi que dans la régulation transcriptionnelle de P53 (**Bourdon, 2005**). Ce domaine comprend également trois



séquences de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signal) qui permettent la translocation de P53 dans le noyau et NES (Nuclear Export Sequences) qui permettent l'exportation de P53 vers le noyau (Nuclear Export Signal) (**Stavridi, 2005 ; Dang, 1989**)

P53 est une protéine présente dans le cytoplasme, le noyau ou les mitochondries. Les séquences NLS et NES assurent le transport nucléocytoplasmique de P53 (**Dridi et al., 2006**).

Figure 43: Structure de la p53 (**Bai et Zhu, 2006**).

5.5.2. Activation

La p53 est une protéine à courte durée de vie, avec une demi-vie d'environ 20 minutes et est souvent indétectable dans les cellules normales. Elle peut également exister sous une forme inactive latente, qui peut être activée par de faibles doses d'irradiation UV sans aucune augmentation détectable des niveaux de la protéine p53 (**Hupp, 1995**).

On pense que la protéolyse médiée par l'ubiquitine joue un rôle dans la rotation rapide de la protéine p53 (**Chowdary,1994**). Des études in vitro suggèrent que la protéine p53 peut s'autoréguler de manière négative en inhibant spécifiquement la traduction de son propre ARNm (**Mosner ,1995**).

Plusieurs conditions stressantes agissent comme des événements en amont en signalant p53 , telque des dommages à l'ADN, l'hypoxie, le choc thermique, le traitement des cellules avec des produits chimiques radioactifs (**Vonsdenet et Lu, 2002 ; Vogelsten, 2000**).

5.5.3. Fonction

Le caractère fonctionnel de la protéine p53 a été déterminé par des expériences montrant que la p53 contient un domaine d'activation transcriptionnel puissant au sein de sa structure et qu'il s'agit d'une protéine de liaison à l'ADN tétramérique, spécifique à la séquence.

Bien que la protéine p53 agisse comme un activateur transcriptionnel des gènes contenant des sites de liaison p53, elle est également capable d'inhiber fortement la transcription de nombreux gènes dépourvus de sites de liaison p53. Plusieurs virus à ADN oncogènes expriment des produits génétiques viraux ,qui s'associent à la fonction de trans-activation de p53 et l'inhibent.

L'expression des niveaux élevés de p53 de type sauvage (mais pas de mutant) a deux conséquences : l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, protégeant ainsi le génome d'une accumulation de mutations excessives. Conformément à cette notion, les cellules p53 se sont révélé plus instables génétiquement et donc plus sujettes aux tumeurs (**Ko et Prives,1996**).

5.5.4. P53 dans les cancers humains

Près de 50 % des cancers humains ont une p53 mutée qui a perdu ses capacités antiprolifératives et apoptotiques (**HAINAUT, 1999**), aussi l'altération de protéine régulant le

gène P53 est impliquée dans l'autre moitié des cancers, témoignant ainsi le rôle essentielle de cette protéine dans la suppression tumorale (**Toledo, 2007**).

5.6. Marqueur de prolifération Ki67

Il est nommé en référence à l'université de Kiel où les études ont été réalisées par **Gerdes et al. (1983)** et le numéro 67 correspond à la localisation du clone de l'anticorps capable de détecter la protéine Ki-67 pour la première fois.

Elle est exprimée et détectée dans toutes les phases actives de la division cellulaire ; en phase G₁, S, G₂ et en mitose chez les cellules en prolifération, tandis qu'elle est absente en phase G₀ chez les cellules quiescente ou au repos.

L'antigène Ki67 est un marqueur de prolifération très important en pratique anatomopathologique clinique de routine, il est utilisé dans l'identification d'une fraction de croissance d'une population cellulaire donnée, ainsi que dans le diagnostic, la classification et l'évaluation pronostique des cancers humains. Le taux d'expression de la protéine Ki-67 est strictement associé à la prolifération cellulaire (**Sun et Kaufman, 2018**).

5.6.1. Structure

Il s'agit d'une protéine nucléaire non-histone impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, codée par le gène *MKI67* chez l'être humain dont le promoteur est régulé par le cycle cellulaire (**Ishida et al., 2001**). Elle possède deux isoformes de poids moléculaire de 320 et 350kDa.

D'après **Schluter et al., (1993)** la structure primaire de base de la protéine ki67 comprend :

- Domaine FHA (fork-head-associated) à l'extrémité N-terminale qui reconnaît les épitopes des protéines phosphorylées et qui permet à la Ki-67 d'interagir avec deux phosphoprotéines au cours de la mitose : la protéine Hklp2/Kif15 indispensable pour le maintien de la bipolarité du fuseau mitotique, et la protéine nucléolaire NIFK ayant la capacité de favoriser la prolifération cellulaire et les métastases cancéreuses
- Domaine d'interaction PP1 (protéine phosphatase 1) souvent impliquée dans les réactions de déphosphorylations chez les eucaryotes.
- Région centrale comprenant des répétitions en tandem.

- Domaine de liaison à la chromatine LR (Leucine/arginine Rich) à l'extrémité Cterminale qui se lie à la protéine hétéro-chromatinienne 1 HP1 qui interagit avec plusieurs protéines impliquées dans la formation de l'hétérochromatine.

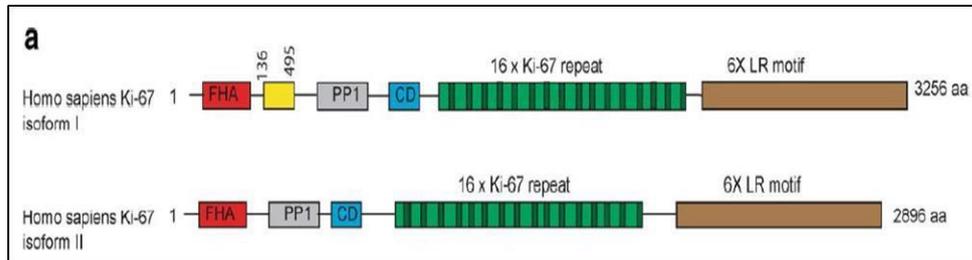


Figure 14: Schéma illustratif représentant la structure des deux isoformes de la protéine ki67 (Sun et Kaufman, 2018)

5.6.2 Fonctions

Le ki67 assure plusieurs rôles au niveau cellulaire :

- Au début de la mitose le Ki67 est, très mobile à la périphérie des chromosomes et se lie moins à l'ADN et ce, dans le cas hyper phosphorylé tandis qu'à la fin de la mitose et dans le cas dé-phosphorylé, il provoque la dissociation de la couche péri-chromosomique (Sun et Kaufman, 2018).
- Le Ki67 est un composant fondamental à la couche périchromosomique qui couvre les chromosomes mitotiques condensés, cette protéine possède une charge hautement élevée du à sa forte densité d'acides aminés chargés positivement, donc elle sert de barrière électrostatique à la surface des bras des chromosomes empêchant leur agrégation et assurant leur dispersion
- Utilisation du ki67 comme marqueur de prolifération dans la catégorisation des tumeurs.

CHAPITRE II
MATERIEL
ET
METHODES

Présentation de l'étude

Notre étude a été réalisée durant la période allant du mois de mars jusqu'au mois de juin 2022 au niveau :

- ✚ Clavier de la station expérimentale ou nous avons assisté au sacrifice et au prélèvement des organes (foie et autres organes)
- ✚ Laboratoire PFE de la faculté SNV de l'université de Blida 1, ou nous avons réalisé l'étude macroscopique
- ✚ Service d'anatomie pathologie du CHU Bab El-Oued d'Alger où nous avons recherchés l'effet hépatotoxique de l'insecticide lambda cyhalothrine et l'effet amélioratif possible de l'acide ascorbique par :
 - ✓ Etude histologique par deux colorations topographiques : H&E et Trichrome de Masson
 - ✓ Etude histochimique par la coloration PAS (Periodic Acid Sciff)
 - ✓ Etude immunohistochimique : Recherche de l'expression des marqueurs suivants : E-cadhérine, Ki-67 et P53.

1 MATERIEL

1.1 Matériel biologique

Le modèle animal choisi dans la présente étude est le lapin (*Oryctolagus cuniculus*), un mammifère lagomorphe, phylogénétiquement plus proche de l'homme, sa manipulation est aisée, sa taille permet d'obtenir facilement des échantillons tissulaires et sanguins, ainsi que son taux de reproduction est élevé.

Notre étude expérimentale a débuté à partir des prélèvements d'organes inclus dans le formol à 10%. Cependant nous avons assisté au sacrifice et au prélèvement des organes et à l'étude macroscopique avec d'autres étudiants master.

- **Taxonomie du lapin**

Règne : Animale

Embranchement : Chordata

Sous-embr : Vertébrés

Classe : Mammifère

Ordre : Lagomorphe

Famille : Leporidae

Genre : Oryctolagus

Espèce : Oryctolagus cuniculus

1.2 Matériel non biologique

Pour cette expérience le matériel non biologique suivant a été utilisé :

- ✚ Insecticide de la famille des pyréthriinoïdes de synthèse de type II « lambda cyhalothrine »
- ✚ Vitamine C ou Acide ascorbique.

Matériel : verrerie, appareillage et réactifs disponible dans le laboratoire d'anatomie pathologique plus de donné sont détaillés dans l'**Annexe 1**.

2 METHODES

2.1 Etude histologique du foie

Des coupes histologiques ont été réalisées à partir des blocs confectionnées dans de la paraffine. La technique histologique de base comporte plusieurs étapes à savoir :

2.1.1 Fixation

Les foies prélevés à la fin de l'expérimentation ont été pesés puis coupés en petits fragments et mis dans des piluliers remplis de formol à 10% pour leur fixation. La fixation est l'étape critique de la préparation du tissu, elle permet sa préservation dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, et de résister à toutes les manipulations ultérieurs par inactivation des protéinases responsables de la dénaturation des tissu par l'autolyse, et permet le durcissement des tissus mous (**Hould, 1984**).



Figure 15 : Fixation des fragments tissulaires dans du formol à 10% (**Photo originale**)

2.1.2 Circulation

La circulation a pour but l'imprégnation du tissu par une matière rigide qui lui donnera la résistance mécanique voulue. Toutes les étapes de la circulation sont réalisées par un circulateur automatique (autotechnicon Leica) qui comporte 12 baignoires dont les dernières contenant de la paraffine chauffés, et permettant une série de manipulations :

- ✚ **Post mordançage** : qui consiste à déposer les cassettes dans des bains de formol afin de compléter leur fixation.



Figure 16: Automate de circulation (*Leica*) (**Photo originale**).

- ✚ **Déshydratation** : qui consiste à débarrasser les tissus de l'eau qu'ils contiennent en utilisant un agent fixateur ayant une grande miscibilité à l'eau et qui provoque un durcissement important du tissu (4 bains d'éthanol à des concentrations croissantes : à 70°, 90°, 95° et 100° ou éthanol absolu).
- ✚ **Eclaircissement** à ce niveau l'éthanol est remplacé dans le tissu par le xylène (un solvant de la paraffine).
- ✚ **Imprégnation** des tissus dans des bains de paraffine liquide à 56° C pour rendre les prélèvements rigides afin de procéder à la coupe.

2.1.3 Inclusion et Enrobage

Elle permet de fournir un support externe pendant et après la coupe. Cette étape est réalisée par un appareil refroidisseur de paraffine de type Leica, pour la mise en blocs on utilise des moules d'inclusion métalliques chauffés légèrement à 45° sur une plaque chauffante :

- ✚ La paraffine liquide est versée dans le moule, on dépose délicatement le prélèvement à inclure à l'aide de pinces chauffées.
- ✚ le fragment de tissu est orienté de manière que la surface de coupe permette de voir simultanément toutes les structures que l'on veut observer, puis on place sur le moule une cassette.

- ✚ On laisse la surface de la paraffine figer légèrement et on remplit l'attache en plastique de paraffine liquide lorsqu'elle durcie, on refroidit le moule rapidement en le déposant sur une plaque réfrigérante au bout de quelques minutes le bloc durci et est prêt à être coupé.

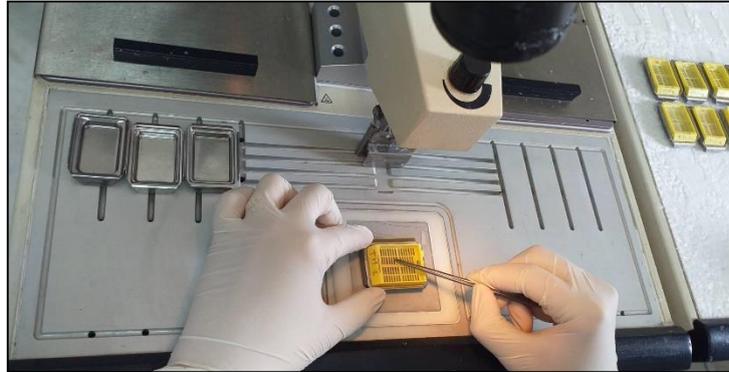


Figure 17 : Inclusion des fragments tissulaires (**Photo originale**).

2.1.4 Microtomie

Ce processus est effectué à l'aide d'un microtome rotatif permettant d'obtenir des rubans de coupes d'épaisseur d'environ 1-2 microns selon les étapes suivantes :

- ✚ Installation du bloc.
- ✚ Rabotage : consiste à dégrossir le bloc en enlevant une mince couche de paraffine à 25 microns,
- ✚ Confection des coupes fines en forme de rubans.



Figure 18: Confection des coupes histologiques (**Photo originale**).

2.1.5 Étalement

On dépose la coupe ou le ruban de paraffine sur une surface d'eau d'un bain marie, la paraffine se ramollit brusquement et la coupe se décompresse sous l'effet de la tension de vapeur présente à la surface d'eau enfin la coupe est collée sur une lame.



Figure 19 : Etalement du ruban sur la lame (**Photos originales**).

2.1.6 Coloration :

- Etape préparatoire de la coloration :

- ✚ **Déparaffinage** : cette étape sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer, pour cela on laisse les lames dans l'étuve pendant 20 minutes environ, et on le fait passer dans un bain de xylène.
- ✚ **Hydratation** : elle a pour but de retirer le xylène du tissu et le remplacer par l'eau en utilisant des bains d'éthanol à des concentrations décroissantes (éthanol absolu, 95°C, 80°C et 70°C 3 à 5 minutes chacun) et on termine par un traitement de quelques minutes à l'eau courante.
- ❖ Etude histologique : colorations topographiques
 - a) **Méthode à l'Hématéine et à l'éosine (H&E)**

Principe

Cette technique permet la distinction qui peut être faite entre le cytoplasme et les noyaux ; le cytoplasme apparaît en rose, alors que les noyaux se colorent en bleu



Figure 20 : Batterie de coloration H&E (Photo originale).

Mode opératoire

- Rincer à l'eau distillée après hydratation à l'alcool
- Colorer avec de l'hématoxyline de Harris pendant 15min
- Laver les coupes avec l'eau courante du robinet
- Bleuir dans l'eau ammoniacale (une à deux plongées)
- Laver à l'eau du robinet
- Colorer dans la solution de l'éosine (15 secondes à 2 minutes) (l'éosine ne doit produire qu'une coloration cytoplasmique franche et donner une gamme de roses plus ou moins vifs ; selon l'intensité de l'acidophilie des divers éléments)

b) Coloration Trichrome de Masson

Principe

Elle associe une coloration bleue nucléaire par l'hématoxyline, une coloration rose a rouge cytoplasmique par un mélange de coloration acide (fuschine acide et ponceau de xyline) qui colore l'hématine et kératine en rouge vif et l'élastine en rose une coloration **verte du collagène** et le mucus par le vert lumière (coloration acide).

Mode opératoire :

- Colorer la coupe dans l'hématoxyline de Harris pendant 5min
- Laver à l'eau courante
- Placer dans une solution de fuschine-ponceau pendant 5min
- Rincer à l'eau distillée
- Plonger dans une solution aqueuse à 1% d'acide phosphomolybdique pendant 1 minute
- Sans laver plonger la lame dans du vert lumière ; pendant 1 à 4 minutes

- Passer dans l'eau acétifiée à 1% pendant 5 minutes
- Plonger dans l'alcool absolu (100°)



Figure 21 : Batterie de coloration Trichrome de Masson (**Photo originale**).

❖ Etude histochimique

c) PAS (Réaction à l'acide périodique Schiff)

• Principe

L'oxydation périodique des glycols libère des fonctions aldéhydes et permet leur visualisation et leur mise en évidence par le réactif de Schiff, qui forme avec eux un produit de condensation rouge.

Procédé opératoire

- Placer les lames dans une solution aqueuse d'acide périodique à 1 % (15min)
- Laver à l'eau courante pendant 5 à 10 min
- Plonger dans le réactif de Schiff pendant 15 min
- Laver à l'eau courante pendant 15 min
- Coloration de fond : hématoxyline de Harris 3min
- Alcool



Figure 22: Batterie de coloration PAS (**Photo originale**).

2.1.7 Montage

Consiste à mettre sur la préparation une lamelle (de taille adéquate) fixée à l'aide d'une colle appelée Eukitt et les lames doivent être nettoyé afin d'éviter la formation des bulles d'air.



Figure 23 : Montage des lames histologiques (**Photo originale**).

2.1.8 Observation au microscope optique

2.2 Immunohistochimie

Principe : C'est une méthode qui rassemble à la fois les techniques d'histologie et d'immunologie, elle comprend la détection *in situ* d'antigènes dans les cellules des coupes tissulaires, via les interactions entre des anticorps mono et polyclonaux marqués et des épitopes de la molécule cible observables au microscope. Ces anticorps sont conjugués d'une manière covalente à des molécules chromogènes ou des enzymes

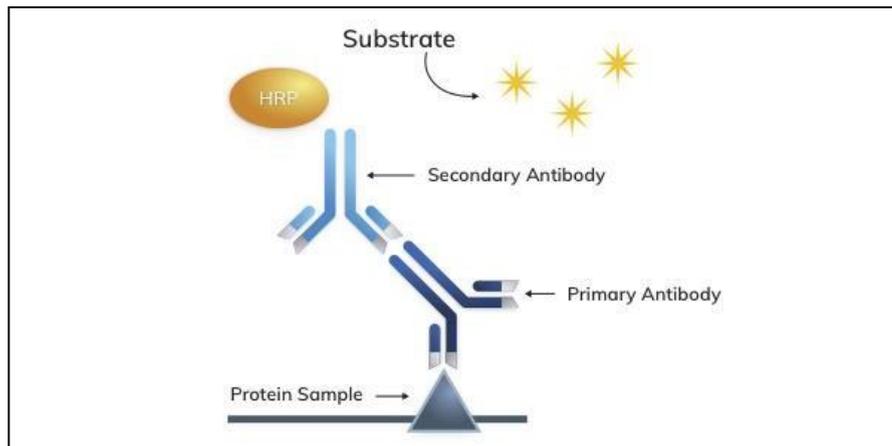


Figure 24 : Schéma représentatif du principe de l'immunohistochimie (**Anonyme**).

- **Protocole**

Cette étape vise à mettre en évidence l'expression de trois immunomarqueurs dans le foie des trois lots lapins de l'étude traités, cette procédure est à la recherche du marqueur de prolifération (ki67), d'apoptose (p53) et d'adhésion (E-cadhérine).

Les échantillons sont préalablement fixés au formol tamponné à 10%, ensuite ils sont inclus en paraffine. Des coupes d'environ 3µm sont confectionnées et étalées sur des lames chargées positivement dite silanisées « X-tra Adhesive» pour une adhésion maximale du tissu, ces dernières sont séchées à l'étuve pendant une nuit à 40°C pour éliminer tout excès de paraffine.



Figure 25 : Coupe étalées sur les lames silanisées (**Photo originale**).

- **Étapes**

Toutes les étapes qui suivent sont réalisées à l'aide du nouveau automate innovateur de VENTANA-group : Le BenchMark ULTRA , qui est un système de coloration entièrement automatisé pour l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ* qui présente de

multiples fonctionnalités pour améliorer la confiance diagnostique des laboratoires d'histopathologie et optimiser le flux de travail avec ses tiroirs de lames indépendants.



Figure 26 : Automate d'IHC Benchmark ULTRA (VENTANA) (Photo originale).

2.2.1 Prétraitement

Déparaffinage : pour éliminer les traces restantes de la paraffine.

Restauration antigénique : c'est une étape clé qui consiste au démasquage des sites antigéniques pour rompre les ponts méthylène formé lors de la fixation sous l'effet de la chaleur.

Inhibition des molécules endogènes : pour bloquer les sites peroxydases et éviter une fausse positivité (marquage non spécifique) pour réduire le signal de fond.



Figure 27 : Photo des lames à la fin de l'étape du prétraitement (Photo originale).

2.2.2 Réaction immunohistochimique IHC

Elle comprend principalement :

- Incubation d'un AC primaire dirigé spécifiquement contre les sites antigéniques recherchés, pour cette étude des AC : anti-E-cadhérine, anti-ki67 et anti-p53 ont été mis en évidence (ce sont des préparations prêtes à l'emploi).

- Détection colorimétrique de l'AC primaire en utilisant un AC secondaire conjugué à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase) ou peroxydase de raifort qui est une oxydoréductase qui catalyse la conversion du substrat chromogène DAB (3-3 diaminobenzidine) qui forme un précipité de couleur marron pouvant être visualisé au microscope optique. Cet AC secondaire est utilisé de façon non spécifique car il se lie à la partie constante des AC primaires, et son temps d'incubation varie selon le protocole élaboré.
- Contre-coloration à l'Hématoxyline pour colorer les noyaux en bleu.
- Post contre-coloration par le Bleuing reagent pour bleuir les noyaux.

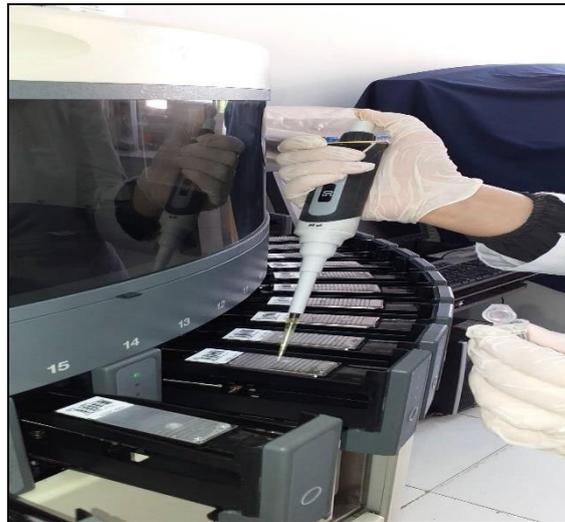


Figure 28 : Etape de la titration des AC spécifiques (Photo originale).

2.2.3 Montage lame / lamelle par l'Eukitt

2.2.4 Observation au microscope et prise des photos



Figure 29 : Lames d'IHC prêtes à l'observation (Photo originale).

CHAPITRE III
RESULTATS
ET
DISCUSSION

RESULTATS

Dans ce travail nous avons réalisé deux colorations histologiques topographiques hématoxyline éosine (H&E) et Trichrome de Masson et une coloration histochimique acide périodique de Schiff (PAS) du parenchyme hépatique des lapins témoins, LCT et LCT+AA.

L'observation des coupes histologiques à différents grossissements nous a permis d'examiner d'une part l'architecture du tissu hépatique et de détecter les lésions causées par LCT et d'autre part rechercher l'effet remédiant probable de l'acide ascorbique.

Etude histologique du parenchyme hépatique

1.1. Colorations topographiques

Dans la présente étude deux colorations topographiques ont été réalisés : la coloration de routine adoptée en anatomie pathologie l'hématoxyline éosine et trichrome de Masson

Hématoxyline Eosine (H&E) et trichrome de Masson

❖ Histologie du foie des lapins témoins

L'étude histologique du foie des lapins témoins permet de décrire une architecture normale composé d'unités structurales du foie « le lobule hépatique » de forme hexagonale avec au centre une veine centro lobulaire (VC) et de chaque côté une triade ou espace porte (EP) composé d'une artériole d'une veinule et d'un canalicule biliaire. Les travées hépatocytaires séparés par des sinusoides(S) sont formés d'hépatocytes (H) mono et parfois binucléés (Cb) a noyaux (N) arrondis (**Planche 1**) avec observation de peu de fibres de collagène autour de la zone portale et de la veine centro-lobulaire (**Planche 4**).

❖ Histologie du foie des lapins traités par la LCT

L'examen histologique du parenchyme hépatique des lapins traités par LCT à faible puis à fort grossissement, révèle une architecture des lobules hépatiques plus ou moins désorganiser avec dilatation de la veine centro-lobulaire, de l'espace porte. On remarque aussi une congestion vasculaire et présence d'un infiltrat inflammatoire au niveau des espaces portes (**Planche 2**) et une augmentation de dépôts de collagène autour de l'espace porte (**Planche 5**).

❖ Histologie du foie des lapins traités par la LCT et supplémentés par la vitamine C

L'histologie du foie des lapins traités par la LCT et supplémentés par l'acide ascorbique montre une architecture lobulaire hépatocytaires moins altérée avec absence de congestion et d'infiltrat inflammatoire et des travées d'hépatocytes à noyaux arrondis et bien délimités indiquant une

bonne activité nucléaire. Cependant, une légère dilatation de la veine centro-lobulaire persiste. (**Planche 3**). Une absence de dépôts de collagène sur tout le parenchyme hépatique a été observée (**Planche 6**).

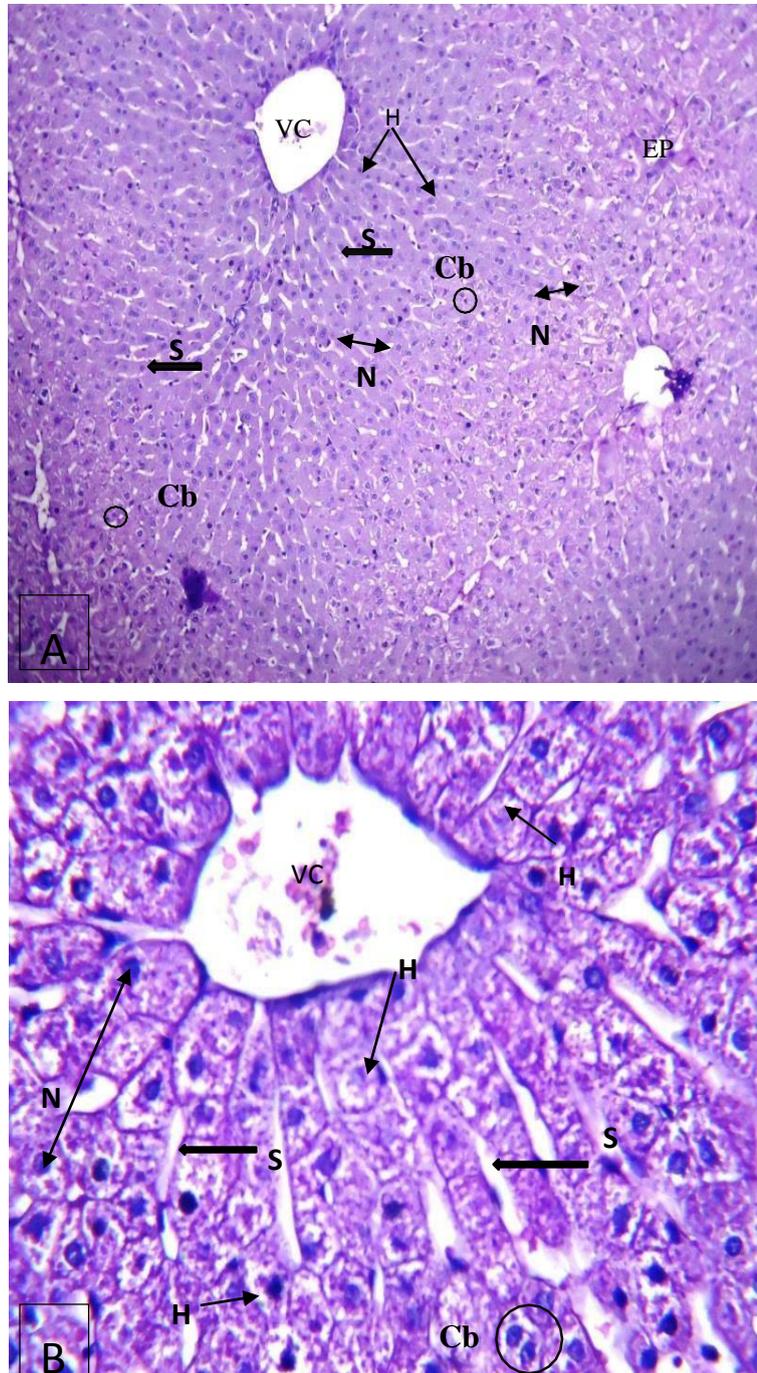


Planche 1 : Histologie du foie des lapins témoins, coloration (H&E)

Grossissement : A : Gr \times 10 B : Gr \times 40

H : Hépatocytes

VC : Veine Centro lobulaire

EP : Espace Porte

Cb : Cellule binucléés

S : Sinusoides

N : Noyau

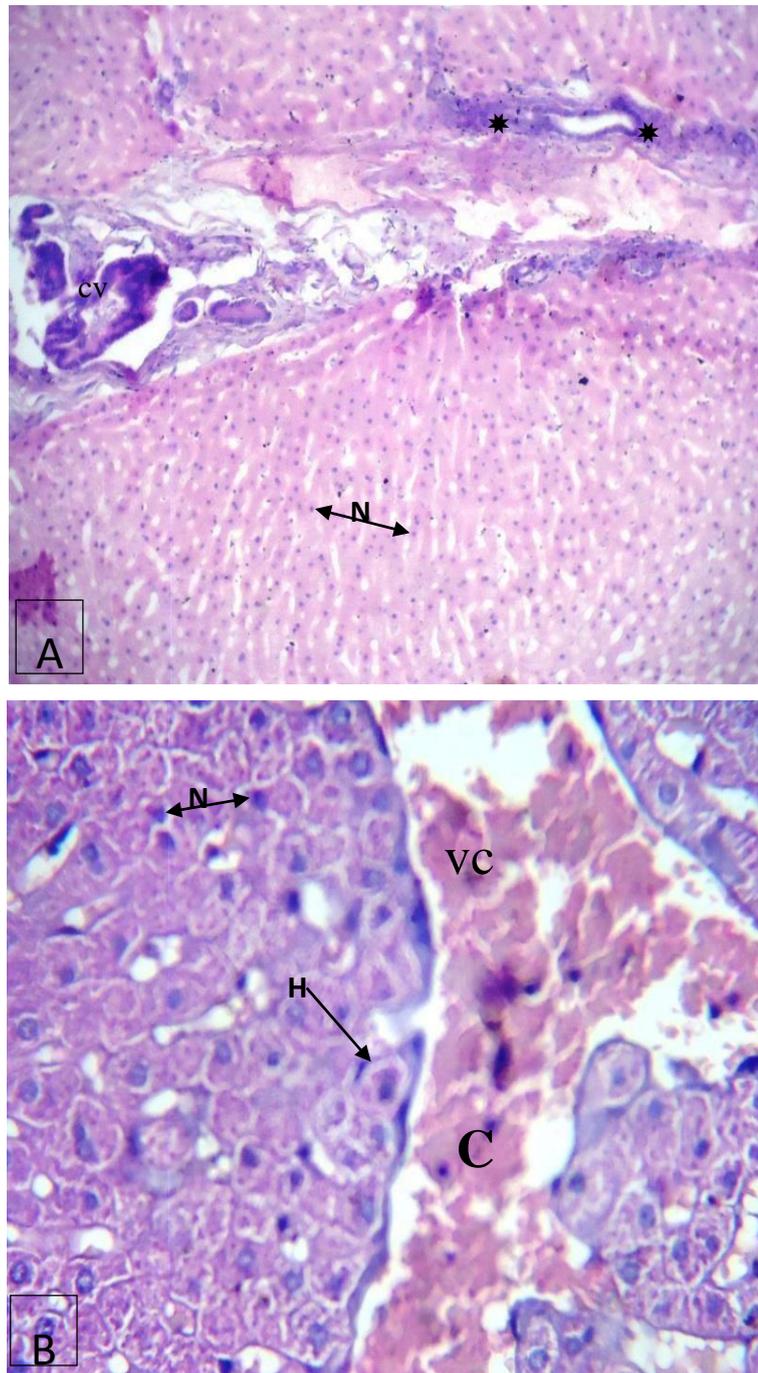


Planche 2 : Histologie du foie traité par LCT. Coloration (H&E).

Grossissement : A : Gr \times 10

B : Gr \times 40

H : Hépatocytes

VC : Veine Centro lobulaire

C : Congestion

Infiltrat inflammatoire (*****)

S : Sinusoïdes

N : Noyau

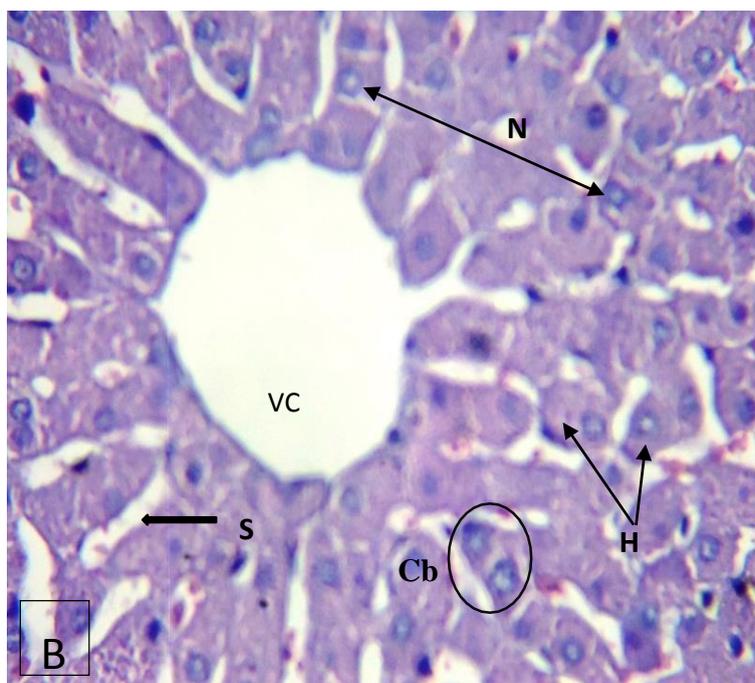
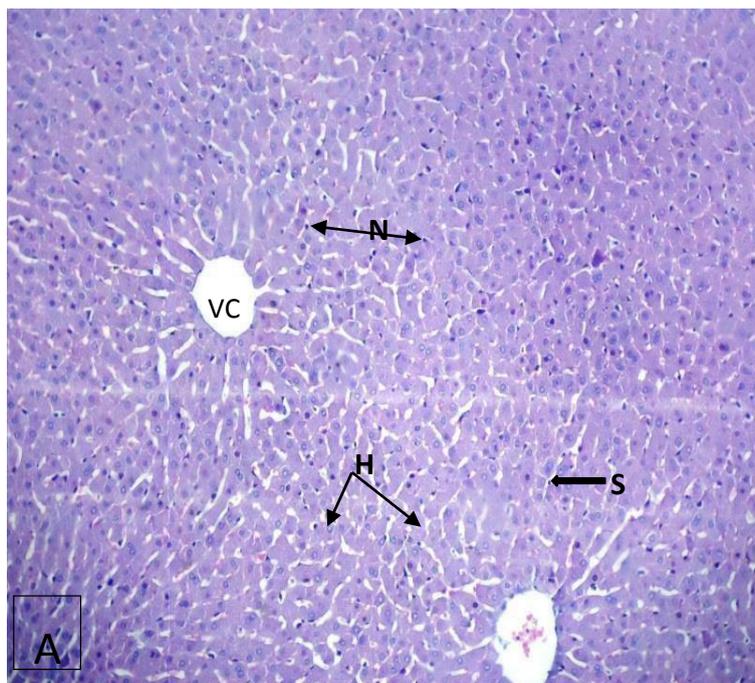


Planche 3 : Histologie du foie traité et supplémenté (LCT+ Vit C). Coloration (H&E).

Grossissement :

A : Gr x10

B : Gr x40

H : Hépatocytes

VC : Veine Centro lobulaire

EP : Espace Porte

Cb : Cellule binucléés

S : Sinusoïdes

N : Noyau

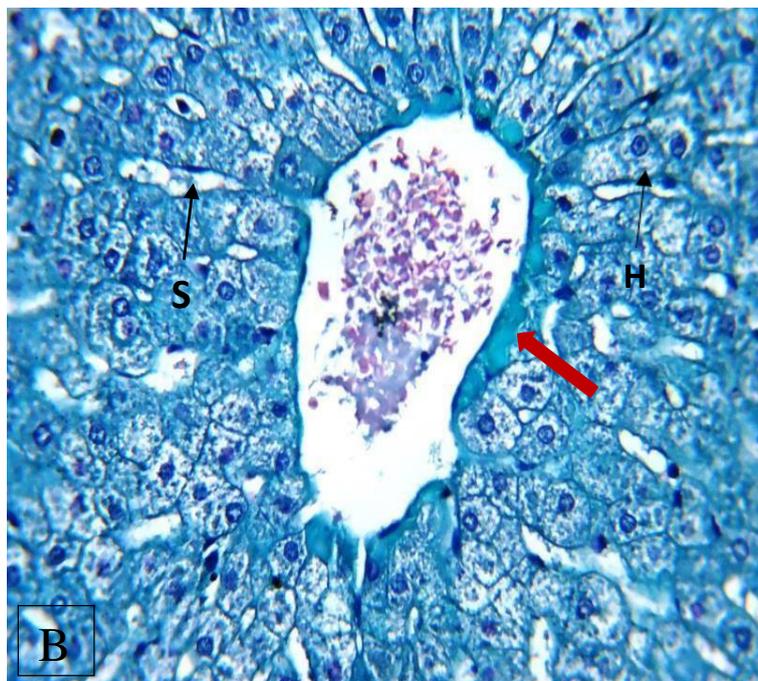


Planche 4 : Histologie du foie témoin. Coloration Trichrome de Masson.

Grossissement : A : Gr × 10

B : Gr × 40

H : Hépatocytes

VC : Veine Centro lobulaire

EP : Espace Porte

S : Sinusoïdes

→ : Fibre de collagène

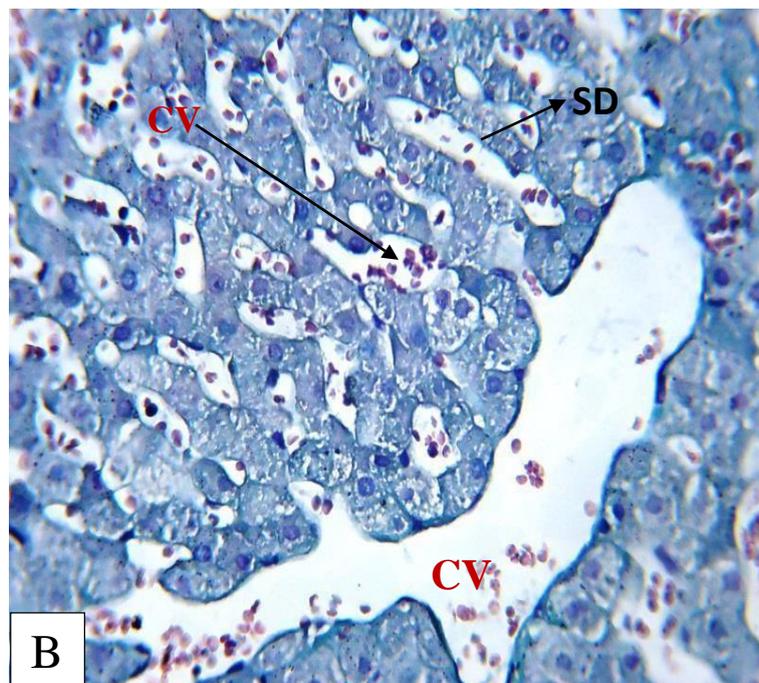
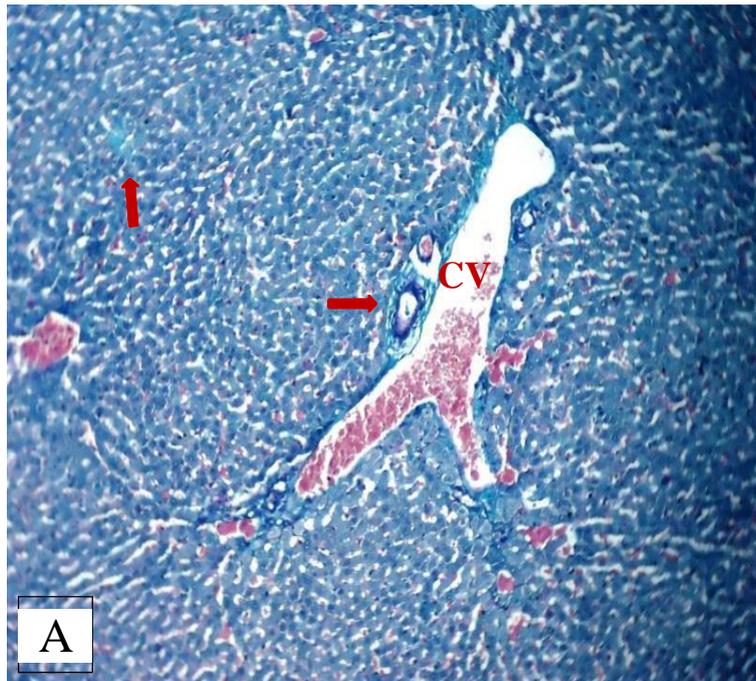


Planche 5 : Histologie du foie traité par LTC. Coloration Trichrome de Masson.

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

SD : Sinusoïdes dilatés **CV** : congestion vasculaire **→** Fibres de collagène

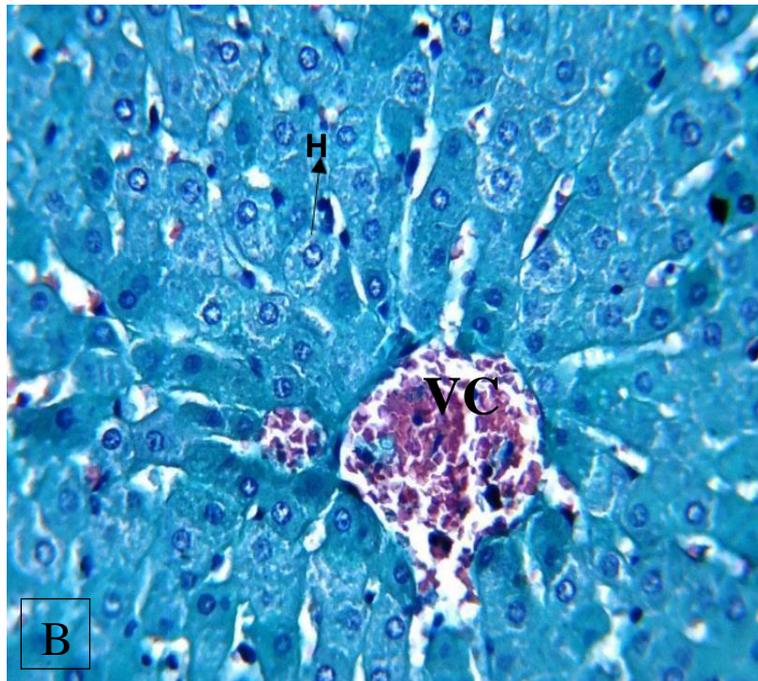
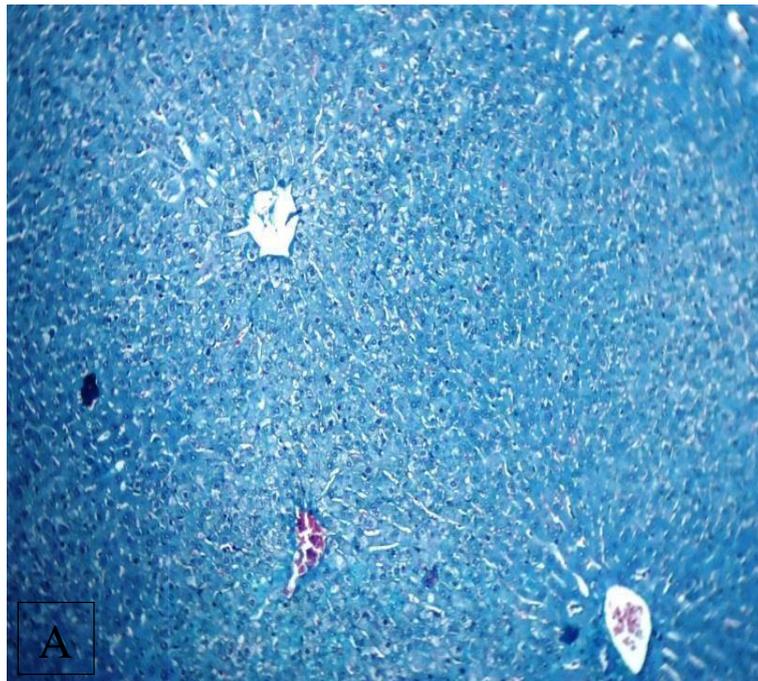


Planche 6 : Histologie du foie traité supplémenté (LTC+ Vit C). Coloration Trichrome.

Grossissement : A : Gr $\times 10$

B : Gr $\times 40$

H : Hépatocytes

N : Noyaux **VC**

: Veine centro-lobulaire

1.2 Coloration histochimique

Coloration PAS (Acide périodique de Schiff)

❖ Histochimie du foie des lapins témoins :

L'examen des sections du foie des lapins témoins colorées avec de l'acide périodique de Schiff (PAS) a montré une architecture hépatique normale, avec des granules de mucopolysaccharides dans le cytoplasme des hépatocytes colorés en rose foncé représentant le glycogène (**Planche 7**).

❖ Histologie du foie des lapins traités par lambda cyhalothrine :

L'étude histochimique a montré une diminution marquée du contenu en glycogène dans les hépatocytes. Les sinusoides dilatées sont remplis de globules rouges et la veine centrale et également congestionnée et une infiltration de cellules inflammatoires a été observé ainsi que des noyaux pycnotiques (**Planche 8**).

❖ Histochimie du foie des lapins traités par lambda cyhalothrine supplémentés par la vitamine C :

L'examen histochimique du foie des lapins traités LCT et supplémentés révèle une augmentation modérée de la teneur en mucopolysaccharides dans le cytoplasme des hépatocytes indiquant une augmentation modérée du glycogène (**Planche 9**).

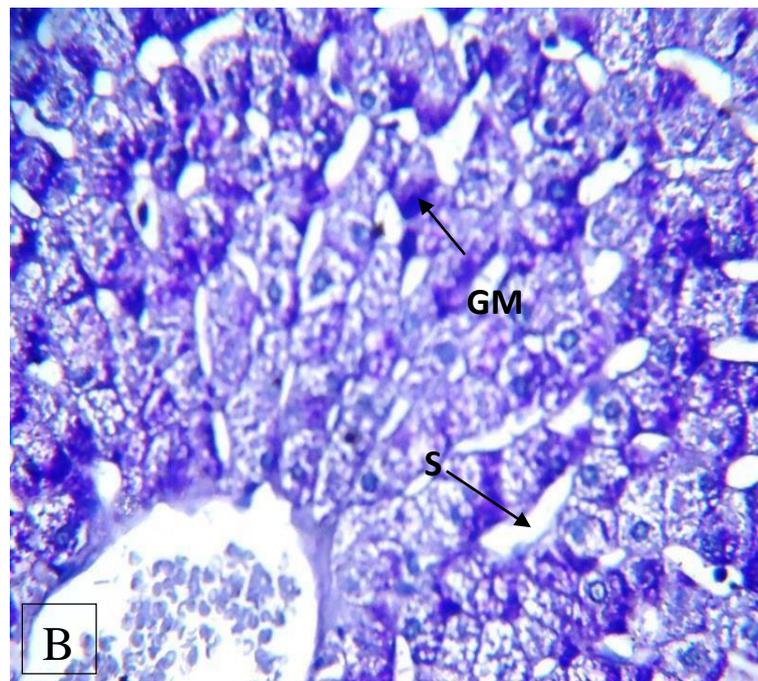
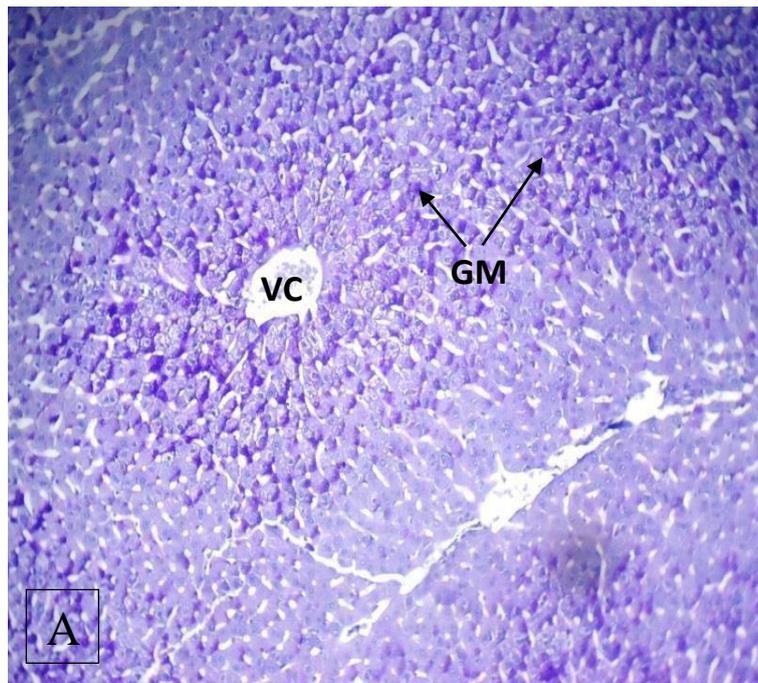
**S****B**

Planche 7 : histologie du foie témoin. Coloration PAS.

Grossissement : A : Gr $\times 10$

B : Gr $\times 40$

VC : Veine-centro-lobulaire

GM : Granules de Mucopolysaccharides

S : Sinusoïdes

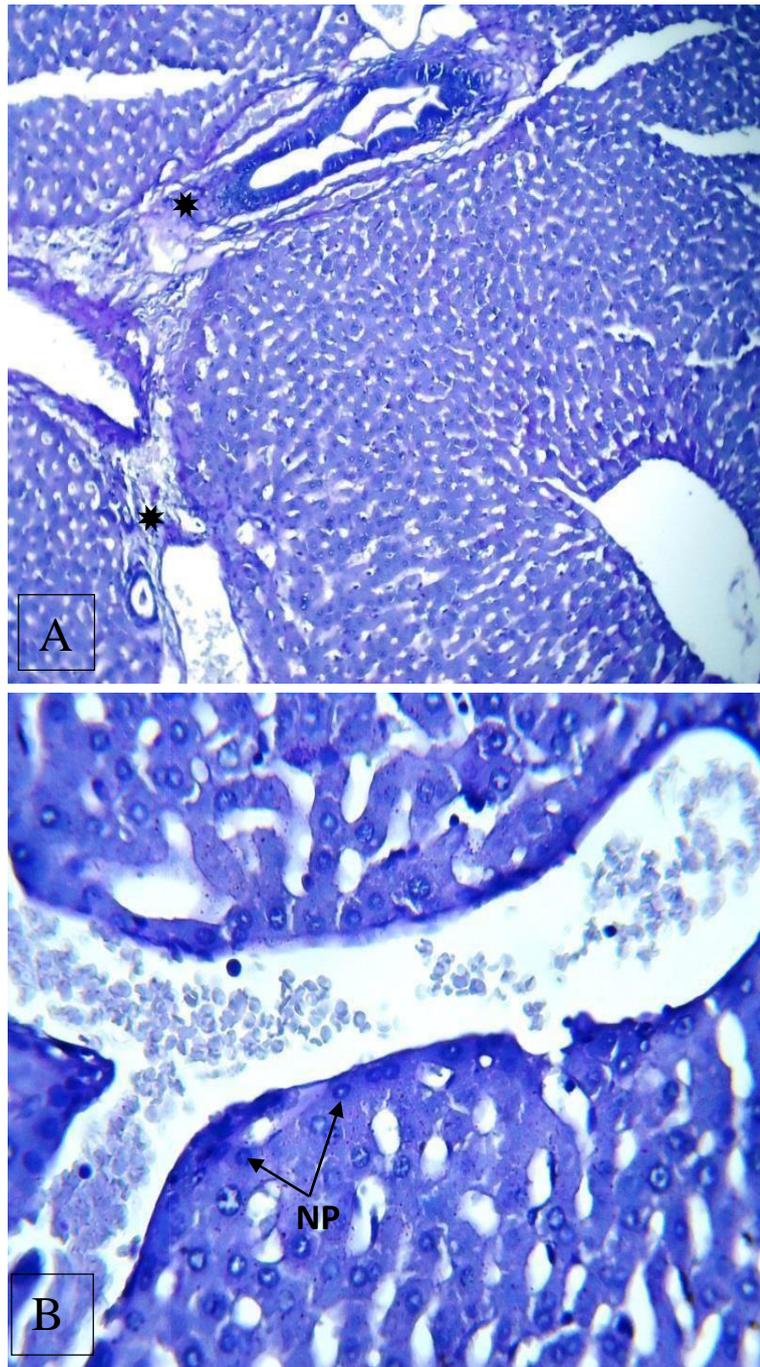


Planche 8 : Histologie du foie traité par LTC. Coloration PAS.

Grossissement : A : Gr \times 10

B : Gr \times 40

NP : Noyaux Pycnotiques

(*) Infiltrat inflammatoire

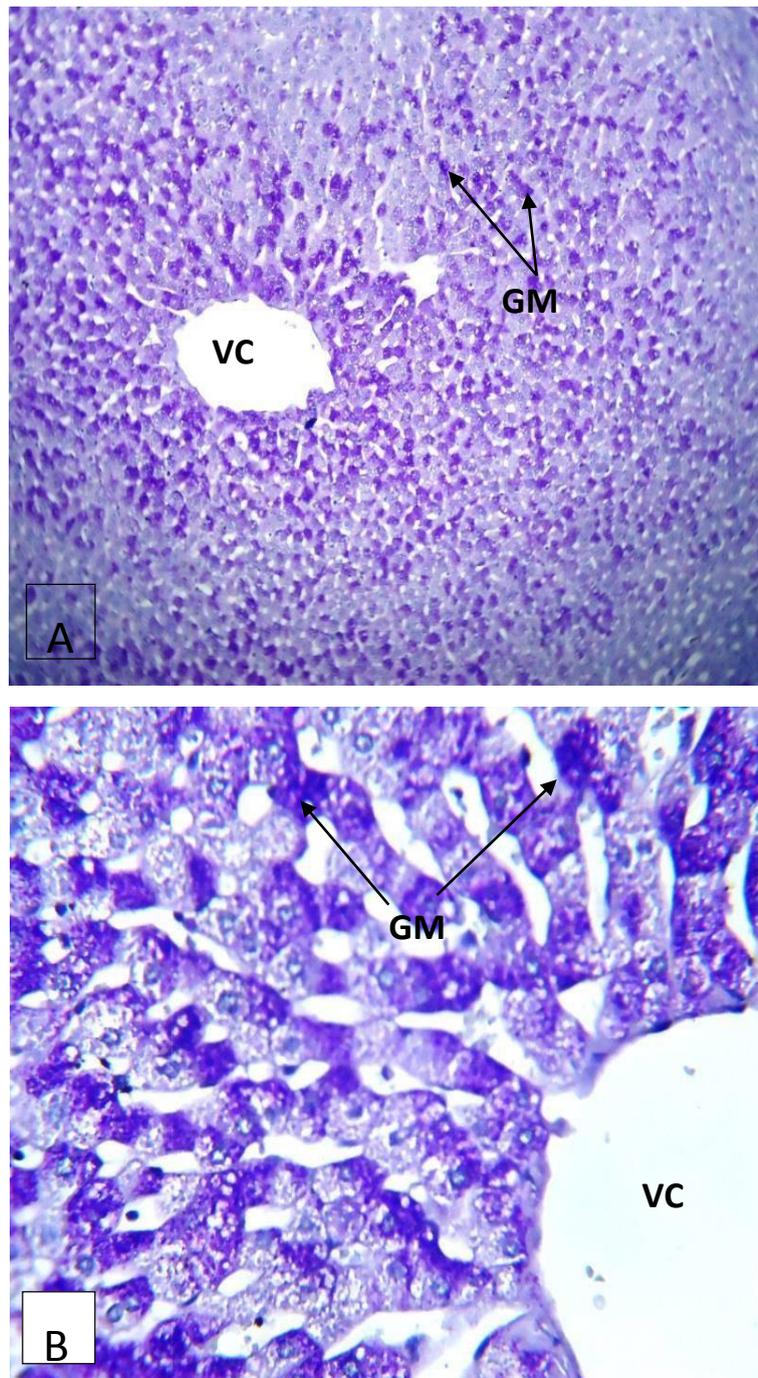


Planche 9 : Histologie du foie traité supplémenté (LTC+ Vit C). Coloration PAS.

Grossissement : A : Gr $\times 10$

B : Gr $\times 40$

VC : Veine centro-lobulaire

GM : Granules de Mucopolysaccharides

S : Sinusoïdes

Etude immunohistochimique du foie des lapins

2.1 IHC E-cadhérine

Les planches **10,11 et 12** montrent l'expression de de la protéine E-cadhérine chez les lapins témoins, traités par LCT et traités par LCT et supplémenté par la Vit C (LCT+ Vit C).

❖ IHC du foie des lapins témoins

Faible grossissement : l'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif membranaire.

Fort grossissement : on observe un marquage cytoplasmique négatif et membranaire positif avec une absence de lésions.

❖ IHC du foie des lapins traités par LCT

Faible grossissement : l'observation à faible grossissement montre un signal immunohistochimique positif membranaire hétérogène.

Fort grossissement : l'observation au fort grossissement montre un signal immunohistochimique membranaire et cytoplasmique modérée.

❖ IHC du foie des lapins traités supplémentés (LCT+ Vit C)

Faible grossissement : l'observation à faible grossissement montre un marquage cytoplasmique intense autour de la veine centro-lobulaire et l'espace porte et un marquage modérée membranaire dans les hépatocytes composant le reste du parenchyme.

Fort grossissement : l'observation montre au fort grossissement un immunomarquage à la fois membranaire et cytoplasmique autour de la veine centro-lobulaire.

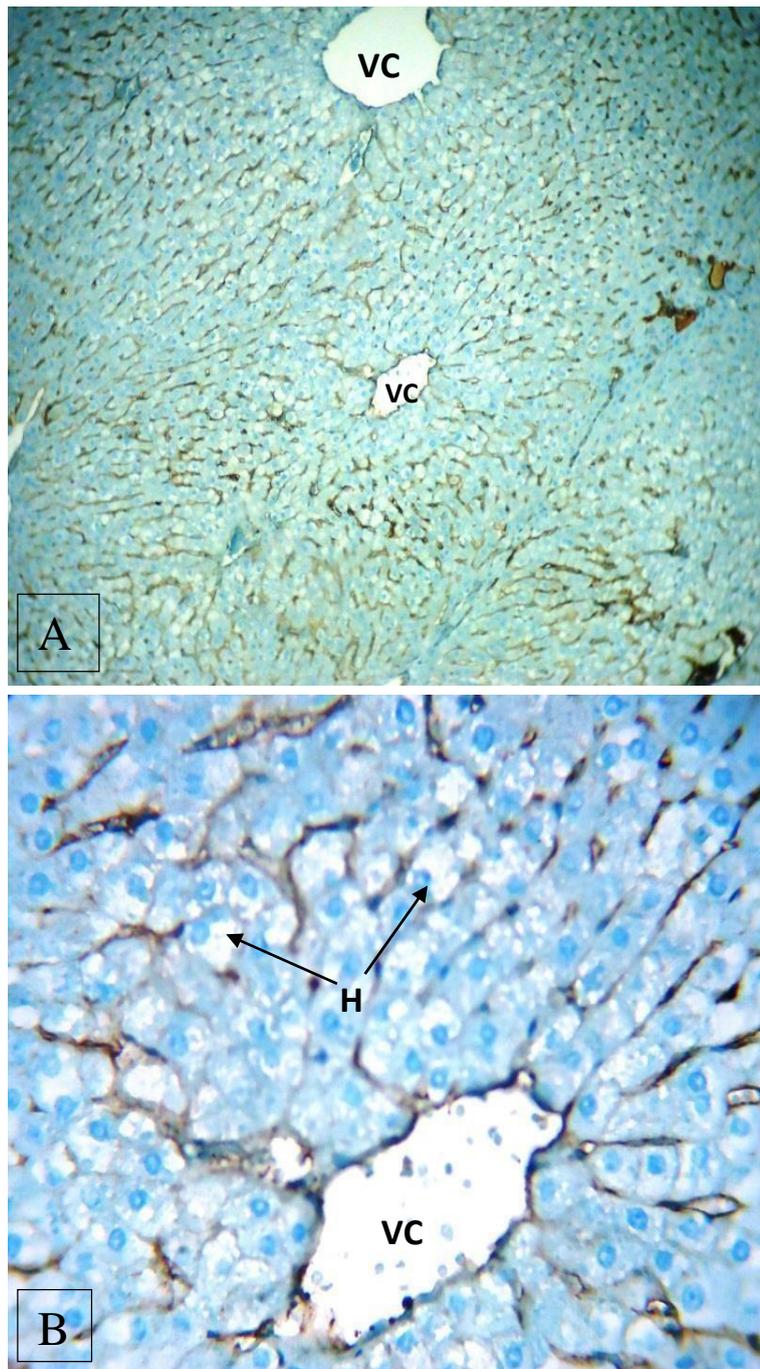


Planche 10 : IHC de la protéine E-cadhérine du foie des lapins témoin.

Grossissement :

A : Gr ×10

B : Gr × 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

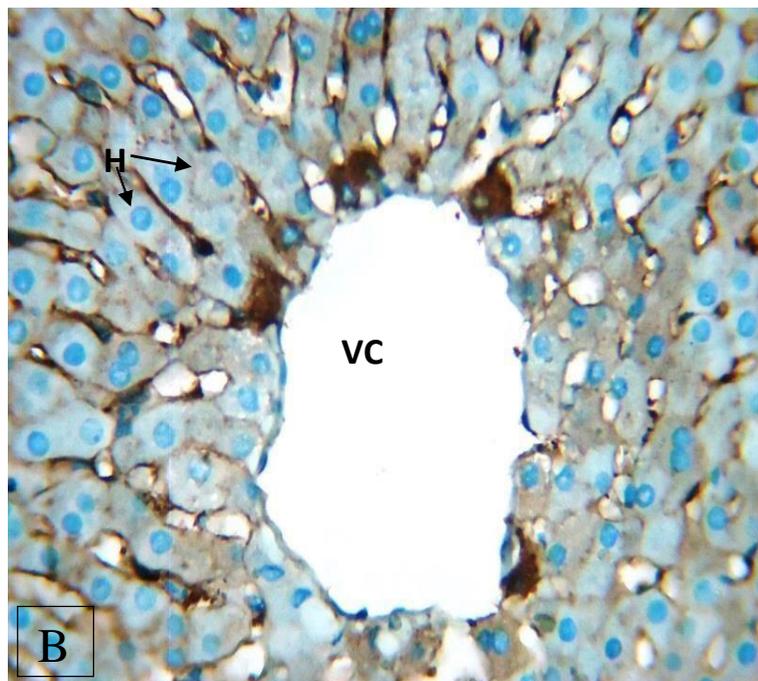
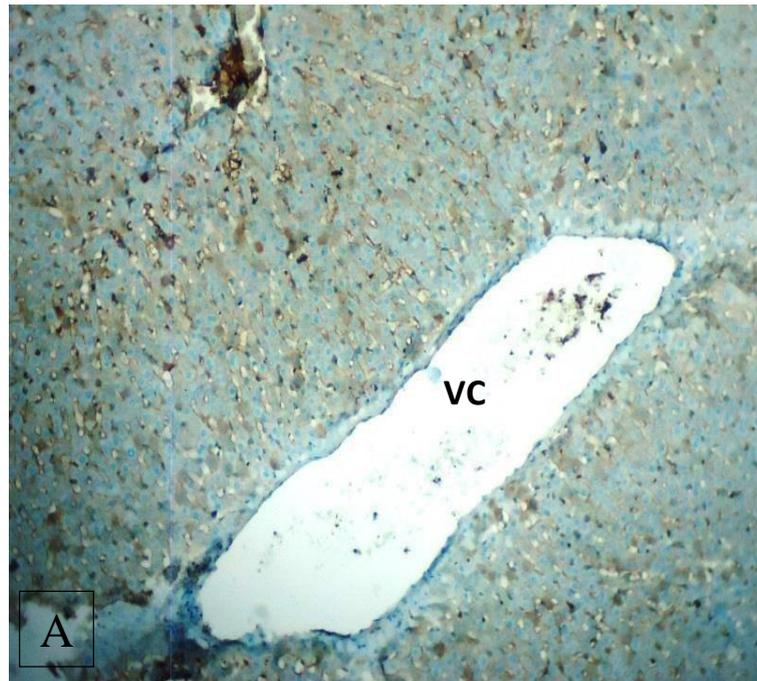


Planche 11 : IHC de la protéine E-cadhérine du foie des lapins traités par LCT

Grossissement : A : Gr \times 10

B : Gr \times 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

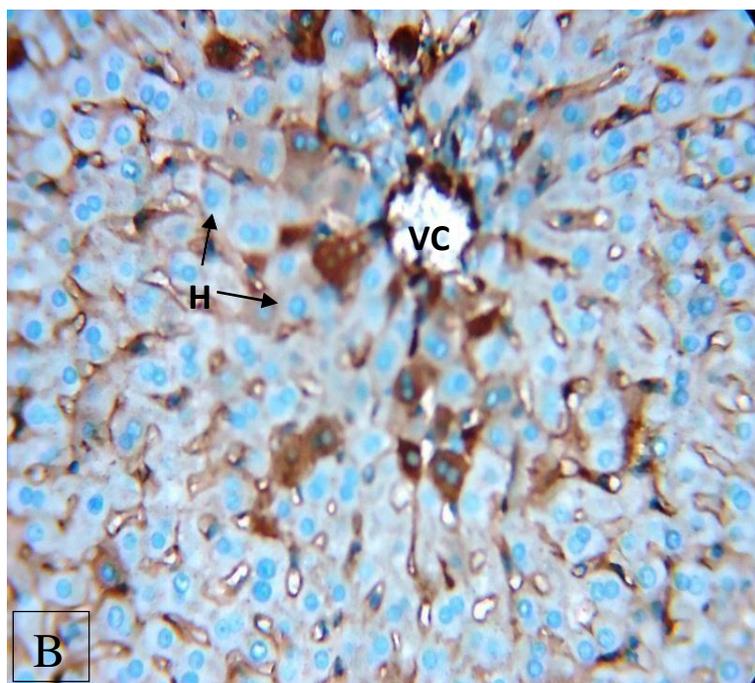
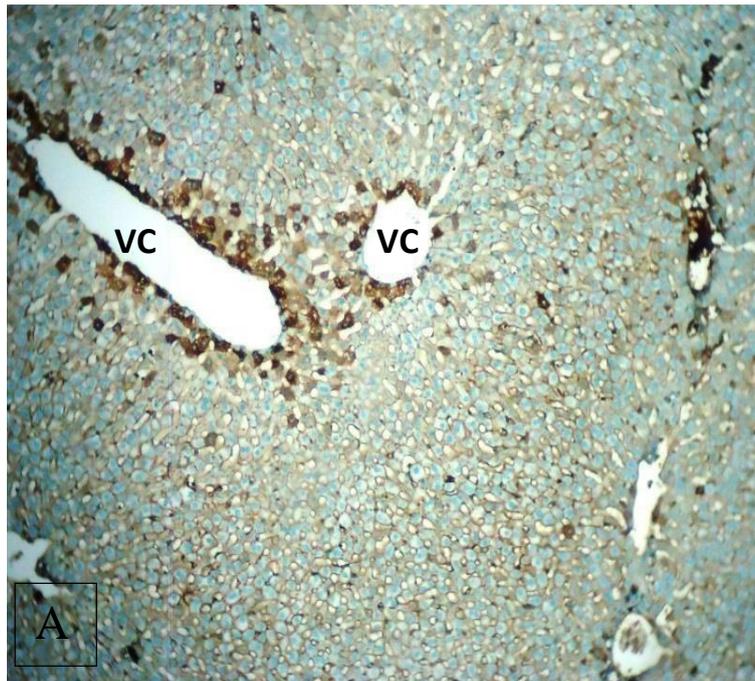


Planche 12 : IHC de la protéine E-cadhérine du foie des lapins traités et supplémentés (LCT+ Vit C)

Grossissement : A : Gr ×10

B : Gr × 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

2.2 IHC Ki67

Les planches **13,14 et 15** montrent l'expression de de Ki67 chez les lapins témoins, traités par LCT et traités par LCT et supplémenté par la Vit C (LCT+ Vit C).

❖ IHC du foie des lapins témoins (Planche13) :

L'observation microscopique révèle une structure histologique normale de la veine centro-lobulaire et des hépatocytes environnants, le sujet témoin ne montre aucune altération histopathologique.

Faible grossissement : un signal immunohistochimique négatif au niveau de l'ensemble du parenchyme hépatique, au tour de la veine centro-lobulaire et de l'espace port.

Fort grossissement : montre un marquage immunohistochimique négatif au niveau nucléaire et cytoplasmique.

❖ IHC du foie des lapins traités par LTC (Planche14) :

Faible grossissement : on remarque un marquage fortement positif au niveau des cellules situées au tour de la veine centro-lobulaire et un marquage moins intense par rapport au reste des hépatocytes.

Fort grossissement : montre un marquage cytoplasmique et nucléaire positif au niveau des cellules proche de la veine centro-lobulaire avec un marquage négatif des noyaux dont la structure est arrondie et délimitée.

❖ IHC du foie des lapins traités supplémentés (LTC+ Vit C) (Planche15) :

Faible grossissement : une immunoréactivité positive modérée au niveau de l'ensemble du parenchyme hépatique plus précisément au niveau des hépatocytes entourant la veine centro-lobulaire.

Fort grossissement : un fort marquage positif au niveau de la membrane cytoplasmique des hépatocytes et un marquage moins intense au niveau de leur cytoplasme.

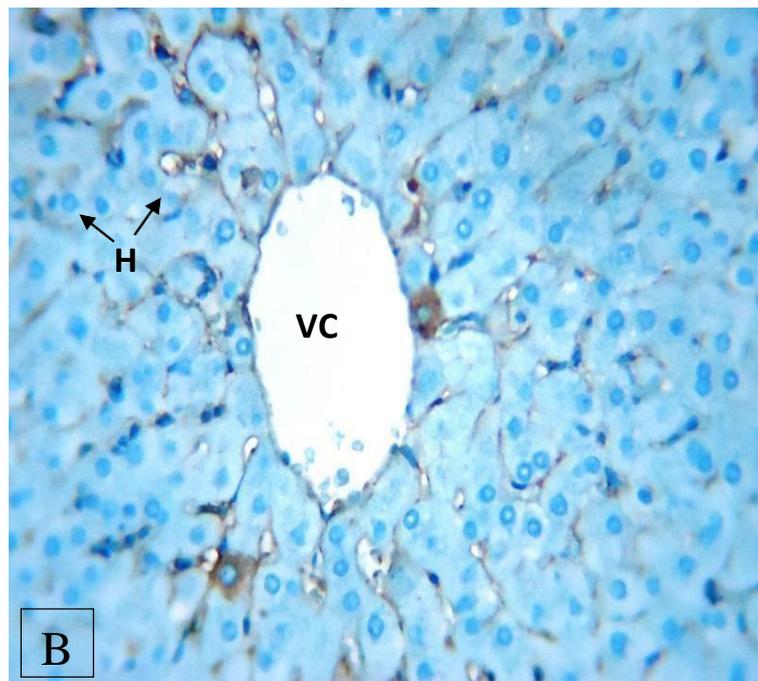
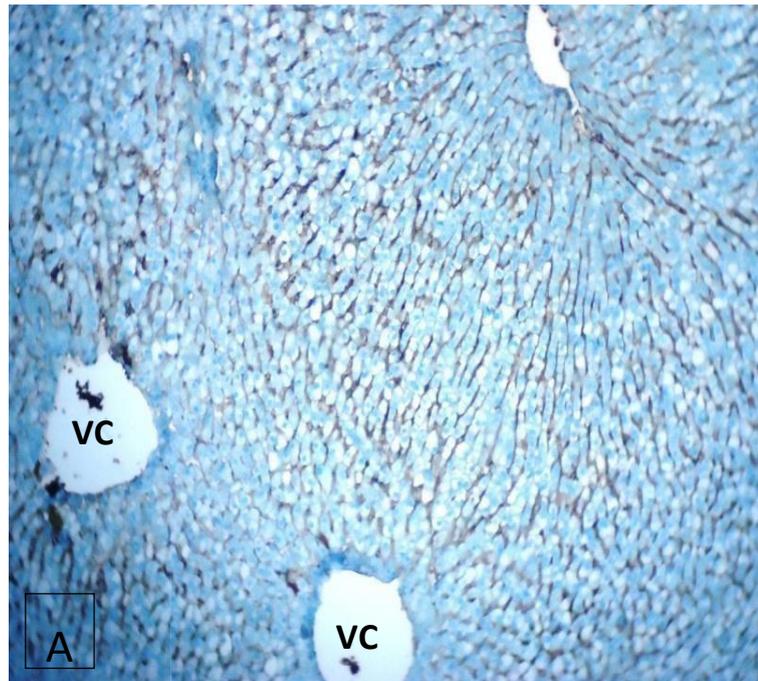


Planche 13 : IHC du marqueur Ki67 du foie des lapins témoins

Grossissement : A : Gr \times 10

B : Gr \times 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

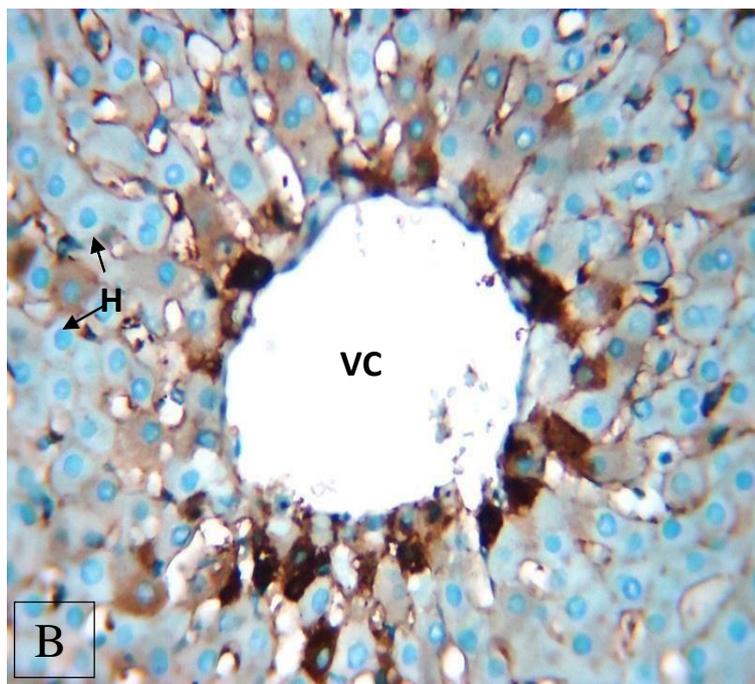
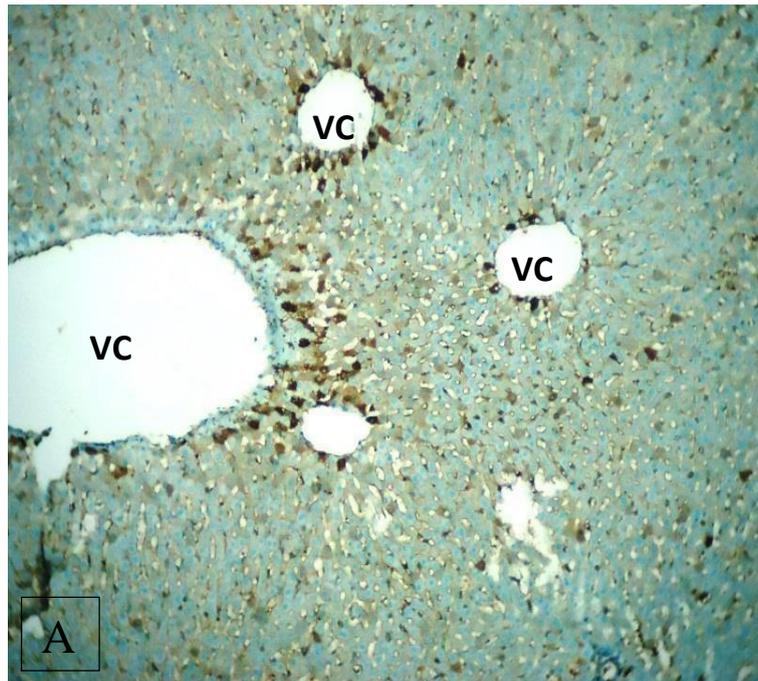


Planche 14 : IHC du marqueur Ki67 du foie des lapins traités par LTC

Grossissement : A : Gr \times 10

B : Gr \times 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

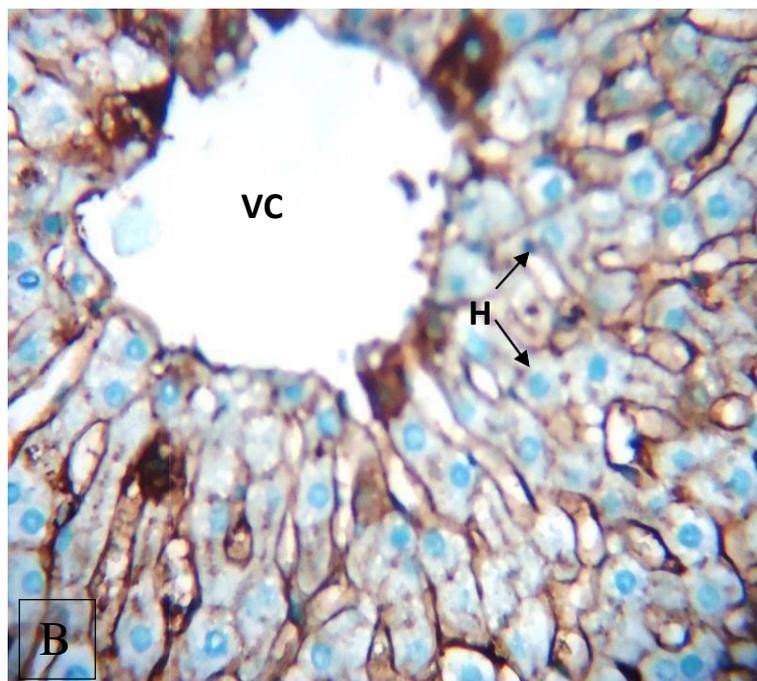
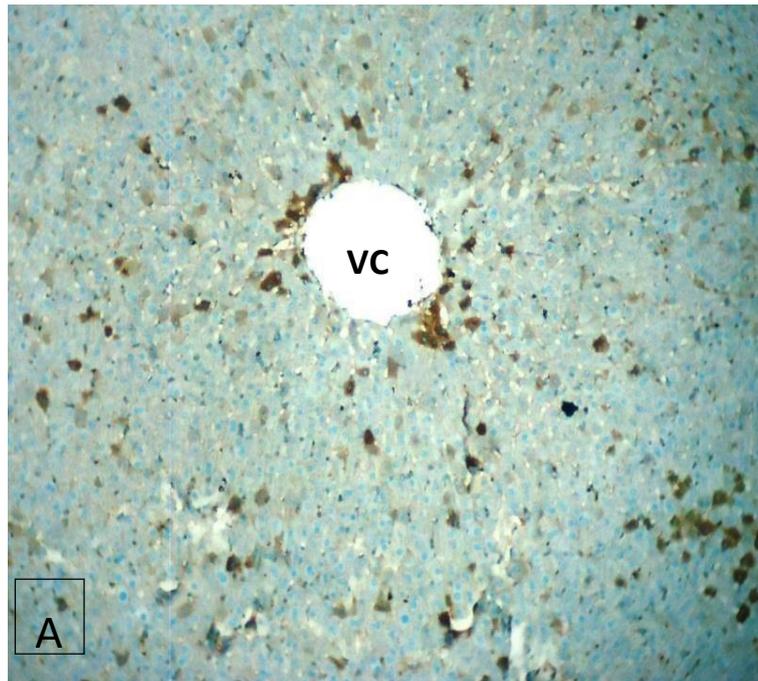


Planche 15 : IHC du marqueur Ki67 du foie des lapins traités supplémentés par (LTC + Vit C)

Grossissement : A : Gr × 10

B : Gr × 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

2.3 IHC P53

Les planches **16,17 et 18** montrent l'expression de P53 chez les lapins témoins, traités par LCT et traités par LCT et supplémenté par la Vit C (LCT+ Vit C).

❖ **IHC du foie des lapins témoins (Planche16) :**

Faible grossissement : Expression de p53 et l'incidence des cellules hépatocytaires apoptotiques très faible.

Fort grossissement : immunomarquage négatif de la p53.

❖ **IHC du foie des lapins Traités (Planche17) :**

Faible grossissement : une augmentation visible de l'immunomarquage cytoplasmique de p53 dans l'ensemble du parenchyme hépatique

Fort grossissement : marquage fortement positif de p53 cytoplasmique.

❖ **IHC du foie des lapins traités supplémentés (Planche18) :**

Faible grossissement : diminution de l'intensité de l'immunomarquage par rapport au groupe traité sauf en quelque région qui reste fortement marquées.

Fort grossissement : un marquage positif moins intense des cellules entourant la veine centrolobulaire à l'exception de quelque cellules.

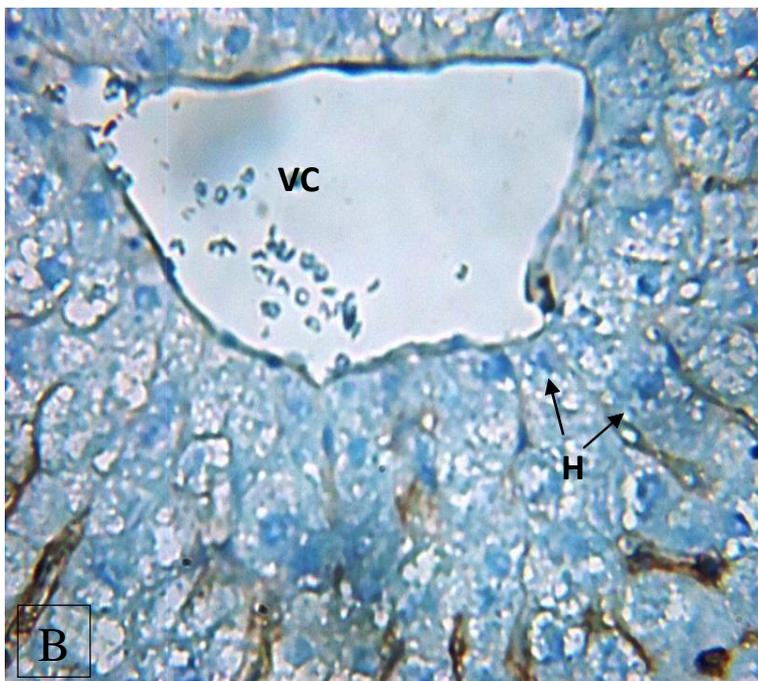
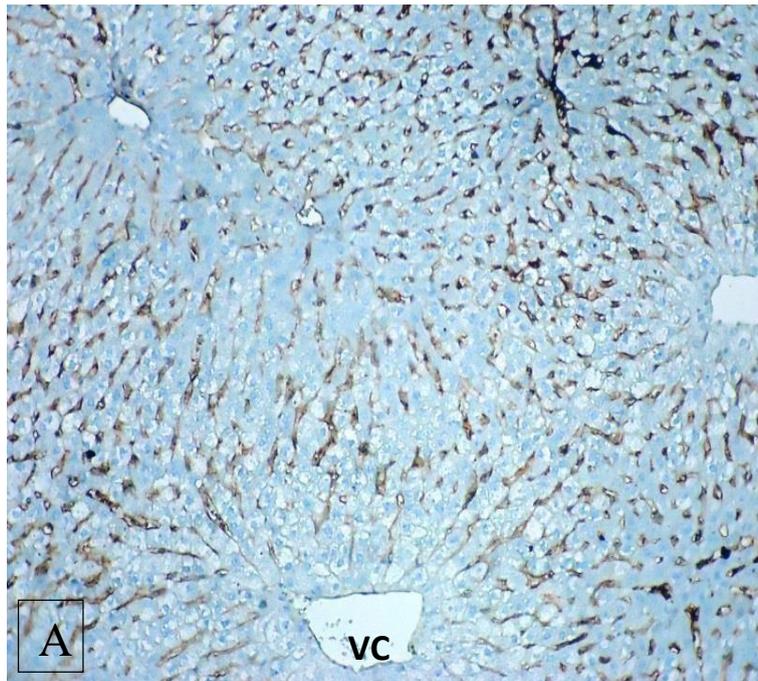


Planche 16 : IHC du marqueur P53 du foie des lapins témoins.

Grossissement : A : Gr \times 10

B : Gr \times 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

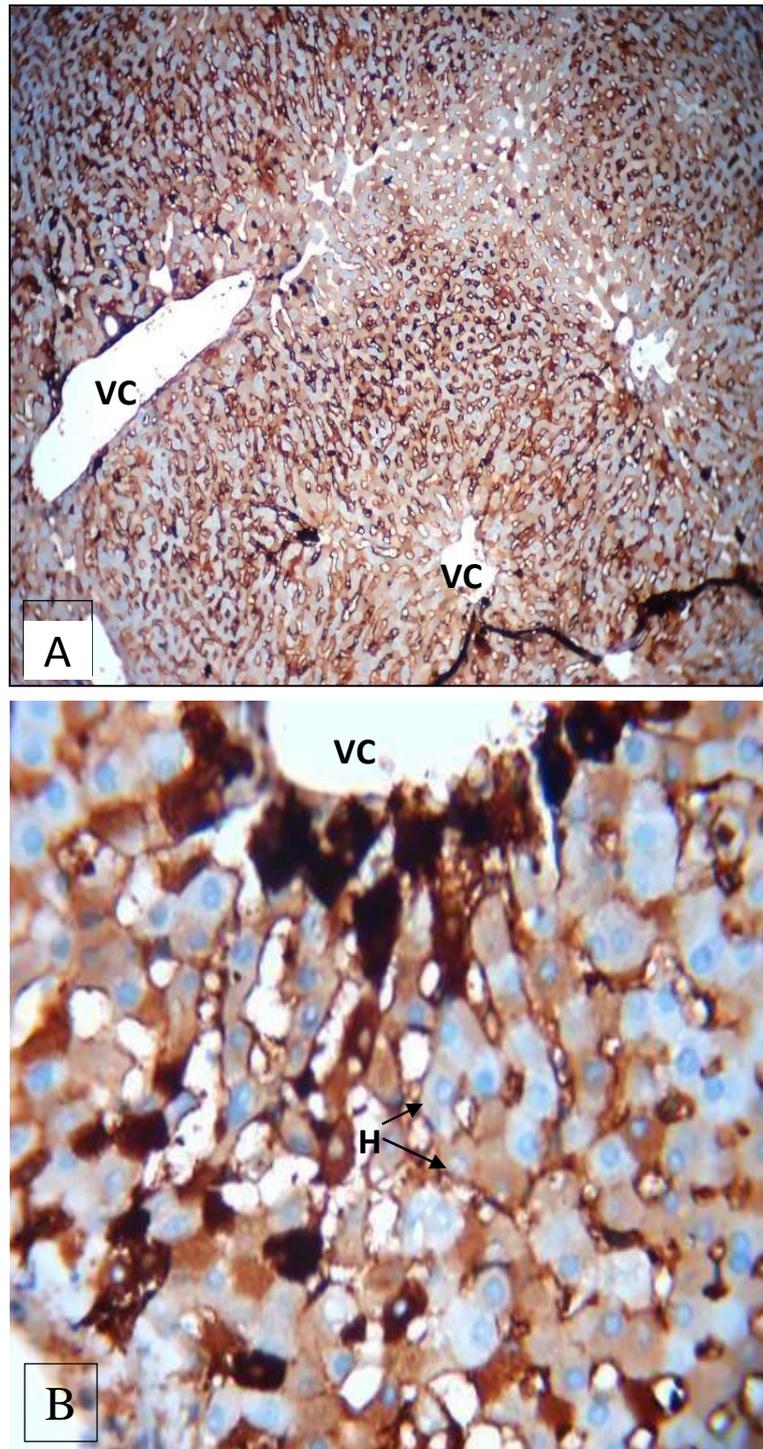


Planche17 : IHC du marqueur P53 du foie des lapins traités par LCT

Grossissement : A : Gr × 10

B : Gr × 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

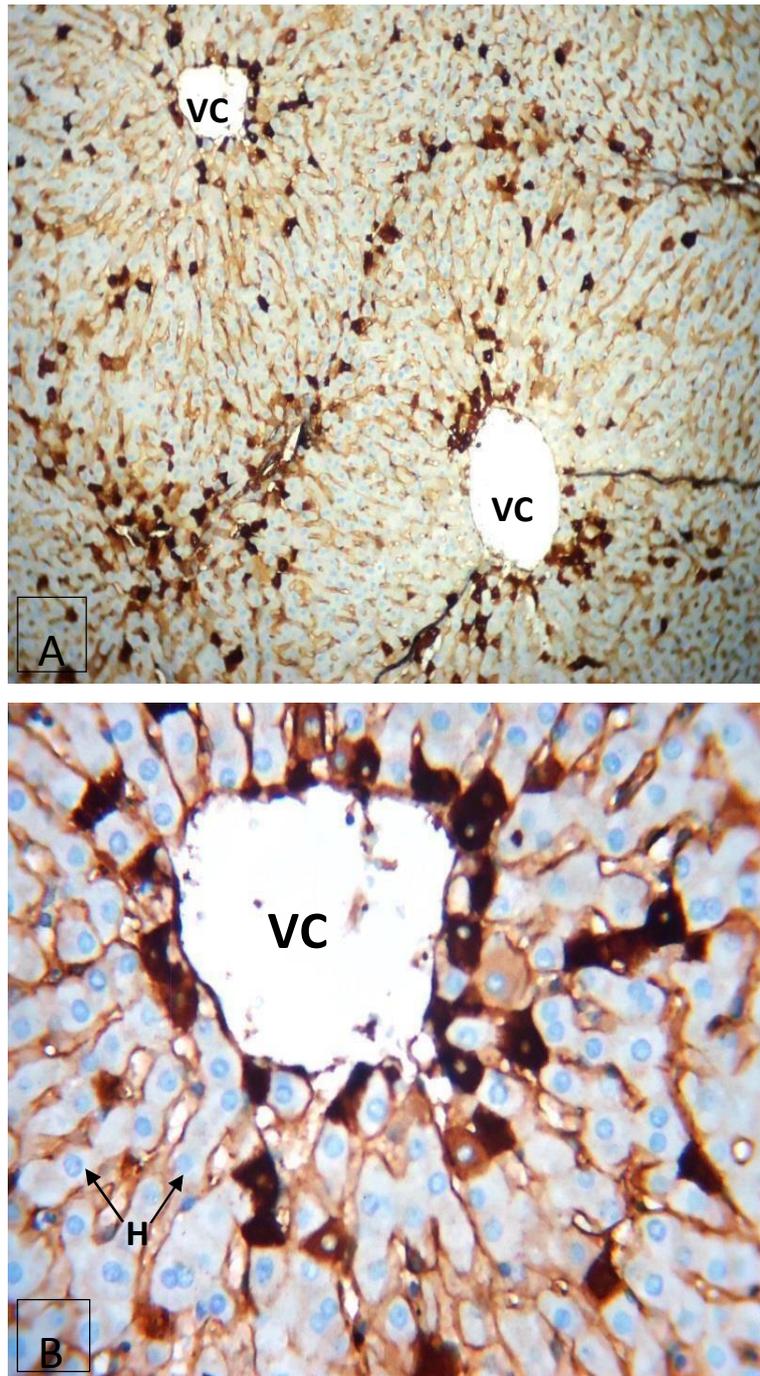


Planche18 : IHC du marqueur P53 du foie des lapins traités supplémentés (LCT + Vit C)

Grossissement : A : Gr \times 10

B : Gr \times 40

VC : Veine centro-lobulaire

H : Hépatocyte

DISCUSSION

Notre étude, vise à étudier les modifications histologiques et immuno- histochimiques du tissu hépatique après traitement par un insecticide « lambda cyhalothrine », et examiner l'effet protecteur probable d'une vitamine antioxydante, l'acide ascorbique, suite une toxicité subaiguë chez le lapin mâle *Oryctolagus cunuculus*.

L'étude immunohistochimique porte sur l'expression des marqueurs moléculaires : d'adhésion cellulaire (E-cadhérine), de prolifération cellulaire (Ki67) et d'apoptose (P53).

Le choix du foie est principalement dû à la sensibilité du tissu hépatique au stress oxydatif induits par les pesticides étant donné que le foie est l'organe responsable de la détoxification du sang (**Banerjee, 2001**).

Dans notre étude nous avons constaté que l'administration de lambda cyhalothrine a provoquée plusieurs lésions histologiques remarquables au niveau du parenchyme hépatique notamment ; une architecture des lobules hépatiques plus ou moins désorganiser avec dilatation de la veine centro-lobulaire et de la structure de l'espace porte. On remarque aussi une congestion et des infiltrats inflammatoires importants ainsi qu'une quantité minimale du dépôt de collagène autour de la veine centro-lobulaire et une diminution marquée du contenu en glycogène dans le parenchyme hépatique des lapins traités en comparaison avec les témoins.

Cependant, on observe après co-supplémentation de la vitamine C et de lambda cyhalothrine une restauration et une réorganisation tissulaire du parenchyme hépatique. Nos résultats montrent une réduction de la dilatation sinusoidale, de la congestion vasculaire et de l'infiltration des cellules inflammatoires et une diminution du dépôt de collagène autour des veines centro-lobulaire et des espaces porte et une augmentation modérée de la teneur en mucopolysaccharides et en glycogène.

Fetoui et al. (2009) ont montrés que les effets toxiques des pyrèthrinoïdes et notamment la lambda cyhalothrine sont probablement dû à la génération des EROs causant des dommages à divers composant de la cellule induisant un stress oxydatif.

Une caractéristique commune à l'exposition aux pesticides est l'induction d'un stress oxydatif qui provoque des dérèglements au niveau du système antioxydant. Plusieurs recherches scientifiques ont prouvées que la toxicité liée à l'exposition aux pesticides est étroitement associée au stress oxydatif (**Guney et al., 2007 ; Yavuz et al.,2004**).

Selon **Sule et al. (2022)**, dans les conditions normales, les espèces réactives de l'oxygène sont produites au niveau cellulaire à de faibles quantités fonctionnant comme des régulateurs physiologiques des voies de signalisation intracellulaires.

Cependant, l'exposition aux pesticides provoque une augmentation significative de la signalisation des ROS dans la cellule via l'augmentation des niveaux de NADPH oxydases (NOX) et de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), et induit ainsi un stress oxydatif, au-delà de ce que le système antioxydant cellulaire intrinsèque peut réduire. Cela peut conduire à des dommages des biomolécules tel que l'oxydation protéique, la peroxydation des lipides et l'oxydation de l'ADN. Ces facteurs de stress déclenchent les voies de signalisation TNFR1/TNF- α , des MAPK, et de NF- κ B. Ce qui favorise l'apoptose et l'inflammation des cellules (**Sule et al., 2022**).

Al-Jassim et al. (2016) ont montré que la vitamine C peut moduler les biomarqueurs hépatiques et prévenir les dommages histologiques du parenchyme hépatique du lapin traité par un insecticide l'ivermectine signalant ainsi l'effet protecteur de l'acide ascorbique.

D'après nos résultats nous pouvons supposer que les dommages histologiques hépatiques de lambda cyhalothrine sont principalement attribués à l'augmentation du stress oxydatif puisque les effets ont été largement prévenus par la supplémentation en acide ascorbique administré par gavage. Des études antérieures ont également montré l'efficacité curative des antioxydants vitaminique y compris l'acide ascorbique (**Omshi, 2018**).

Selon **Stoyanova et al. (2012)** les résultats de l'étude histochimique ont démontré que l'intensité de la coloration de la réaction PAS est inversement proportionnelle à la concentration croissante de l'insecticide.

Les résultats de l'étude immunohistochimique ont révélés chez les sujets témoin, un signal immunohistochimique positif membranaire intense et un marquage cytoplasmique négatif avec une absence de lésion. Ces résultats peuvent expliquer le bon déroulement des activités cellulaires de l'E-cadhérine qui assure cruciale dans le maintien et l'organisation des cellules en tissus. Dans les cellules épithéliales, il existe plusieurs complexes protéiques d'adhésion cellulaire, dont la protéine E-cadhérine, qui possède un domaine extracellulaire responsable des contacts d'adhésion homotypique avec les molécules d'E-cadhérine d'autres cellules voisines.

L'étude immunohistochimique du parenchyme hépatique des lapins traités par lambda cyhalothrine montre un signal immunohistochimique positif membranaire hétérogène et cytoplasmique modéré. Selon **(Yoshino et al., 2002)** cela peut être expliqué par une perte fonctionnelle d'adhésion cellule-cellule médiée par l'E-cadhérine et/ou une augmentation de la motilité cellulaire.

Nos résultats corroborent les résultats de **(Cabello et al., 2003)** qui ont trouvés que l'exposition au malathion, un pesticide organophosphoré, induit la déstabilisation des jonctions cellule-cellule diminuant l'expression de la E-cadhérine à la surface latérale des cellules épithéliales avec une perte graduelle de l'adhésion cellulaire ce qui peut indiquer une translocation de cette protéine dans les cellules exposées au pesticide.

L'IHC de l'E-cadhérine au niveau du tissu du foie chez les sujets co-administrés par la vitamine C et lambda cyhalothrine montre une immunoréactivité positive membranaire et cytoplasmique des hépatocytes et un marquage moins intense au niveau de leur cytoplasme.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Khaldoun et al. (2017)** ; **Settar et al. (2021)** qui ont montré que la supplémentation de la vitamine C, chez les rats et les lapins intoxiqués par des insecticides, réduit les lésions engendrés au niveau du parenchyme hépatique.

La protéine Ki67 est une protéine utilisée comme marqueur de prolifération des cellules cancéreuses, c'est une protéine associée à la prolifération cellulaire active et exprimée dans toutes les phases du cycle cellulaire, à l'exception de la phase G0 et l'expression la plus élevée étant observée en phases G2 et M. **(Baiomy et al., 2015)**. Nos résultats de l'étude immunohistochimique du Ki67 ont montrés chez les témoins un marquage immunohistochimique négatif au niveau nucléaire et cytoplasmique. Cependant, l'IHC du Ki67 des lapins traités a révélé un immunomarquage cytoplasmique et nucléaire positif au niveau des cellules proche de la veine centro-lobulaire avec un marquage négatif des noyaux dont la structure est arrondie et délimitée, nos résultats corroborent les résultats de **(Baiomy et al., 2015)**.

L'évaluation de la présence des protéines liées au cycle cellulaire tel que la Ki67 peut fournir des informations importantes sur le comportement biologique des cellules.

Selon **Astiz et al. (2012)** La surexpression cytoplasmique de la Ki67 dans l'ensemble du parenchyme hépatique peut être expliqué par les dommages de l'ADN causé par les radicaux libres suite à l'administration de l'insecticide.

Nous avons remarqué aussi que la Co-administration de la vitamine C a diminué l'expression cytoplasmique de la Ki67 probablement suite à une réduction de l'accumulation des radicaux libres.

Le large éventail de fonctions exercées par le foie sur le reste de l'organisme est maintenu par des événements évolutifs qui ont conféré au foie une capacité phénoménale de régénération. Ce processus permet au foie exposé aux xénobiotiques de récupérer la masse perdue sans mettre en danger la viabilité de l'organisme entier (**Michalopoulos, 2007**).

Selon **Rabes. (1977)** La prolifération des hépatocytes progresse des zones périportales vers les zones péricentrales du lobule, sous forme d'une vague de mitoses. Il convient de souligner que le remplacement de la masse hépatique perdue est médié par prolifération des hépatocytes adultes matures et des autres types de cellules hépatiques (**Michalopoulos, 2007**).

L'immunohistochimie de P53 du foie des lapins témoins révèle une expression de p53 et une incidence des cellules hépatocytaires apoptotiques très faible. La p53 est une protéine impliquée dans la suppression de tumeur la mieux étudié. Ses principales fonctions sont l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et le contrôle des voies métaboliques.

La p53 « gardien du genome » dont les principales fonctions sont l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et le contrôle des voies métaboliques. L'immunohistochimie de la protéine P53 du foie des lapins témoins révèle une faible expression de p53 montrant un niveau très faible des cellules hépatocytaires apoptotiques. Selon **Kumar et al. (2015)** les pyréthriinoïdes de synthèse de type II peuvent induire l'apoptose en activant les voies de signalisation p53 apoptotiques.

Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans les voies de signalisation apoptogènes induites par les pyréthriinoïdes de synthèse de type II (**Aydin, 2011**). Ce qui permet d'expliquer nos résultats qui montrent un immunomarquage cytoplasmique significative de p53 avec une augmentation des hépatocytes apoptotiques.

Les liens entre le stress oxydatif et le cancer sont devenus très forts, les radicaux libres intervenant dans la conversion des pro-carcinogènes en carcinogènes, provoquant des lésions de l'ADN, amplifiant les signaux prolifératifs et inhibant les gènes suppresseurs de tumeurs

comme p53. En cas de faible quantité d'EROs, p53 a une activité anti-oxydante en induisant notamment la GPx, alors qu'en cas d'excès d'EROs, il aura un effet prooxydant (**Bensaad et al., 2005**).

Les résultats du marquage immunohistochimique des lapins supplémentés par la vitamine C révèle une diminution de l'intensité de l'immunomarquage par rapport au groupe traité par lambda cyhalothrine.

Nos résultats corroborent les résultats de **Kalender et al. (2010)** qui ont enregistré que les vitamines C et E peuvent réduire l'hépatotoxicité du malathion. L'ensemble des altérations biochimiques de l'état d'oxydoréduction qui ont été induites par l'exposition au profenofos un insecticide organophosphoré étaient presque ou au moins partiellement normalisées lorsque la vitamine C a été administrée en même temps que le profenofos (**Dessouki et al, 2012**).

De ce fait, notre étude montre clairement que la vitamine C a un effet améliorant et protecteur cellulaire contre les dommages dégénératifs du tissu hépatique induits par lambda cyhalothrine.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVE

Conclusion

L'explosion démographique a augmenté amplement la demande aux différentes denrées alimentaire ce qui a augmenté ainsi l'utilisation massive des pesticides pour protéger les cultures maraichères. Les pesticides sont neurotoxiques pour le développement, affectent le comportement, l'équilibre hormonal, et peuvent être cancérigènes.

Au cours de notre étude ; nous avons mis en lumière l'effet hépatotoxique d'un insecticide pyréthriinoïde type II « lambda cyhalothrine » qui provoque un stress oxydatif par la génération des radicaux libre et par conséquence une perte de l'architecture tissulaire hépatique à savoir une dilatation des sinusoides, dilatation de la veine centro-lobulaire et de l'espace porte, des congestions vasculaires et des infiltrats inflammatoires.

Nous avons également constatés à partir des résultats obtenus que la supplémentation de l'acide ascorbique a la capacité de restaurer les lésions hépatique et de régénérer et réorganiser l'ensemble du parenchyme hépatique.

Les données histopathologiques et immunohistochimiques confirment la toxicité de « lambda cyhalothrine » dans le tissu hépatique. En conclusion la vitamine C possède des propriétés thérapeutiques très importantes qui peuvent réduire les effets néfastes provoqué par les insecticides.

En perspectives il serait intéressant :

- De quantifier le marquage immunohistochimique
- Etudier profondément l'effet toxique de « lambda cyhalothrine » sur d'autres fonctions notamment le système nerveux central, le système endocrinien et la fonction reproductrice.
- Tester d'autres molécules impliquées dans l'effet protecteur, améliorant et antioxydant telles que le zinc ou d'autres vitamines telles que les vitamines A et E.
- Comparer les résultats sur différents organes et systèmes de l'organisme.
- Exercer une étude morphométrique et statistiques qui consistent à détailler, d'analyser et de comparer les différentes forme des cellules dans l'ensemble du parenchyme hépatique de manière objective et chiffrée.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Achach N(2006)** : Stress oxydatif et angor instable: Mémoire de fin d'études pharmaceutiques; Faculté de pharmacie de Monastir Tunisie.
2. **Adikwu, E., & Deo, O. (2013)**. Hepatoprotective effect of vitamin C (ascorbic acid).
3. **Akashé, M., Pawade, U., & Nikam, A. (2018)**. CLASSIFICATION OF PESTICIDES : A REVIEW. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy, 9, 144-150. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.094131>
4. **Al-Jassim KB, Jawad AADH, Al-Masoudi EA, Majeed SK(2016)**. Histopathological and biochemical effects of ivermectin on kidney functions, lung and the ameliorative effects of vitamin c in rabbits (Lupus cuniculus). Basrah J Vet Res; 14: 110-24.
5. **Altuntas I, Delibas N, Demirci M, Kilinc I, Tamer N (2002)**. The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes role of vitamins E and C. Arch Toxicol; 76:470-3.
6. **Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., ... & Alkalay, I. (2002)**. Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: à molecular switch for the Wnt pathway. Genes & development, 16(9), 1066-1076.
7. **Ansari, R. W., Shukla, R. K., Yadav, R. S., Seth, K., Pant, A. B., Singh, D., ... & Khanna, V. K. (2012)**. Involvement of dopaminergic and serotonergic systems in the neurobehavioral toxicity of lambda-cyhalothrin in developing rats. Toxicology letters, 211(1), 1-9.
8. **Anadón, A., Martínez, M., Martínez, M. A., Díaz, M. J., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2006)**. Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. Toxicology Letters, 165(1), 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.01.014>
9. **Aardema, H. (2008)**. Organophosphorus pesticide poisoning : Cases and developments. 66(4), 5.
10. **Ashi, A. A. (2015)**. Implantation des échantillonneurs passifs pour le suivi des pesticides dans les milieux aquatiques libanais. 265.
11. **Astiz, M., de Alaniz, M. J. T., & Marra, C. A. (2012)**. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Neurochemistry International, 61(7), 1231-1241.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.09.003>

12. **Averous, M., & Lopez, C. (2004).** La cryptorchidie: le point de vue de l'urologue pédiatre. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 32(9), 813-817.
 13. **Awumbila, B., & Bokuma, E. (1994).** Survey of pesticides used in the control of ectoparasites of farm animals in Ghana | SpringerLink.
<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02241125>
 14. **Aydin, B. (2011).** Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 165-171.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.03.006>.
- B**
15. **Bachmeyer, C., Rohaut, B., Cazier, A., & Turc, Y. (2006).** Scorbut. *La Presse Médicale*, 35(2), 357-358.
 16. **Bai, L., & Zhu, W. G. (2006).** p53 : structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol*, 2(4), 141-153.
 17. **Banerjee, V. Seth, & R. S. Ahmed. (2001).** Pesticide-Induced Oxidative Stress : Perspective and Trends. *Reviews on Environmental Health*, 16(1), 1-40.
<https://doi.org/10.1515/REVEH.2001.16.1.1>
 18. **Baranwal, S., & Alahari, S. K. (2009).** Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 384(1), 6-11.
 19. **Bensaad, K. and Vousden, K. H. (2005).** "Savior and slayer: the two faces of p53." *Nat Med* 11(12): 1278-1279.
 20. **Bessaguet, F., & Desmoulière, A. (2021).** Le foie. *Actualités Pharmaceutiques*, 60(605), 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.02.013>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

21. Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., ... & Lane, D. P. (2005). P53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*, 19(18), 2122-2137.
22. Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to Pyrethroids: *Toxicological Reviews*, 24(2), 93-106.
<https://doi.org/10.2165/00139709-200524020-00003>

C

21. Cabello, G., Galaz, S., Botella, L., Calaf, G., Pacheco, M., Stockert, J. C., Villanueva, A., Cañete, M., & Juarranz, A. (2003). The pesticide malathion induces alterations in actin cytoskeleton and in cell adhesion of cultured breast carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 23(3), 697-704. <https://doi.org/10.3892/ijo.23.3.697>
22. Carr, A., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11), 1211.
23. Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 118-132.
24. Cherin, P., Voronska, E., Fraoucene, N., & de Jaeger, C. (2012). Toxicité aiguë des pesticides chez l'homme. *Médecine & Longévité*, 4(2), 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.mlong.2012.05.003>
25. Chowdary, D. R., Dermody, J. J., Jha, K. K., & Ozer, H. L. (1994). Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Molecular and cellular biology*, 14(3), 1997-2003.
26. Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480.
27. Cocheton, J. J. (1996). Le Scorbut: << La peste des mers >>. *Presse Medicale*, 25(37), 1814-1818.

D

28. Dang, C. V., & Lee, W. M. (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of cerb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 264(30), 18019-18023.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

29. Daruwala, R.; Song, J.; Koh, W.S.; Rumsey, S.C.; Levine, M(1999). Cloning and functional characterization of the human sodiumdependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. FEBS Lett. 460, 480–484.
30. Delattre, J., Beaudoux, J.-L. and Bonnefont-Rousselot, D., Eds. (2007). Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques.
31. Dessouki, A., Hassan, A., Ali, S., Loutfy, N., Tawfic, M., & Ahmed, M. (2012). STM Publishing Alterations in P53 Gene, Testicular and Hepatic Tissues of Albino Rats Due to Profenofos Administration : A Possible Protective Effect of Vitamin C. Journal of Enviromental Immunology and Toxicology, X. <https://doi.org/10.7178/jeit.4>
32. DJEFFAL, A. (2014). Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate «méthomyl» chez le rat Wistar: Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).
33. Dridi, W., Krabchi, K., Gadji, M., Lavoie, J., Bronsard, M., Fetni, R., & Drouin, R. (2006). Activité dominante négative des protéines p53 mutées. M/S: médecine sciences, 22(3), 301-307.
34. Doseděl, M., Jirkovský, E., Macáková, K., Krčmová, L. K., Javorská, L., Pourová, J., ... & OEMONOM. (2021). Vitamin C—sources, physiological role, kinetics, deficiency, use, toxicity, and determination. Nutrients, 13(2), 615.
35. Dufour, M. (2018). Anatomie des organes et viscères. <https://www.elseviermasson.fr/anatomie-des-organes-et-visceres-9782294758720.html>

F

37. Fain, O. (2004). Carences en vitamine C. La Revue de médecine interne, 25(12), 872880.
38. FAO. (1992). FAO Organisation de l'Alimentation et de l'Agriculture.
39. Farmer, D., Hill, I., & Maund, S. (1995). A comparison of the fate and effects of two pyrethroid insecticides (lambda-cyhalothrin and cypermethrin) in pond mesocosms | SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00116342>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

40. **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
41. **Fetoui, H., Garoui, E. M., & Zeghal, N. (2009).** Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of ascorbic acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), 189-196.
42. **Frei, B., Birlouez-Aragon, I., & Lykkesfeldt, J. (2012).** Authors' perspective: What is the optimum intake of vitamin C in humans *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(9), 815–829.

G

43. **Gallin, W. J., Sorkin, B. C., Edelman, G. M., & Cunningham, B. A. (1987).** Sequence analysis of a cDNA clone encoding the liver cell adhesion molecule, L-CAM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9), 2808-2812.
44. **Garreau, H., Theau-Clément, M., & Gidenne, T. (2015).** Anatomie, taxonomie, origine, évolution et domestication (p. 14-37).
45. **Gerdes J, Lemke H, Stein H, 1983** Production d'un anticorps monoclonal de souris réactif avec un antigène nucléaire humain associé à la prolifération cellulaire
46. **Green, K. J., Getsios, S., Troyanovsky, S., & Godsel, L. M. (2010).** Intercellulaire junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2), a000125.
47. **Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008).** Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss-and gain-of-function mutations of β -catenin in mice. *Genes & development*, 22(17), 2308-2341.
48. **Goudable J, Favier A (1997):** Radicaux libres oxygénés et antioxydants : *Nutr Clin Métabol*; 11 : 115-20
49. **Gulcin, I. (2012).** "Antioxidant activity of food constituents: an overview." *Arch Toxicol* 86(3): 345-391.
50. **Gumbiner, B. M. (2005).** Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(8), 622-634.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

51. **Guney M, Oral B, Take G, Giray SG, Mungana T. (2007).** Effect of fluoride intoxication on endometrial apoptosis and lipid peroxidation in rats: role of vitamins E and C. *Toxicology*;231:215–23.

H

52. **HAINAUT, P. (1999).** CINQ QUESTIONS ESSENTIELLES SUR LE GÈNE SUPPRESSEUR DE TUMEURS p53. *Revue de l'ACOMEN*, 5.

53. **He, L.-M., Troiano, J., Wang, A., & Goh, K. (2008).** Environmental Chemistry, Ecotoxicity, and Fate of Lambda-Cyhalothrin. In D. M. Whitacre (Éd.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (p. 71-91). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7_3

54. **Hellman, L., & Burns, J. J. (1958).** Metabolism of L-ascorbic acid-1-C14 in man. *Journal of Biological Chemistry*, 230, 923-930.

55. **Hénault-Ethier, L. (2016).** Document d'information : Les pyréthrinoïdes, utilisés à la maison, mais non sans dangers. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2725.0803>

56. **Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S., & Takeichi, M. (1992).** Identification of a neural α -catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*, 70(2), 293-301.

57. **Hollstein, M., Sidransky, B., Vogelstein, & C. C.Harris(1991):** p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.

58. **Hould, R., & Collège d'enseignement général et professionnel. (1984).** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Décarie.

59. **Hosseini Omshi, F. S., Abbasalipourkabir, R., Abbasalipourkabir, M., Nabyan, S., Bashiri, A., & Ghafourikhosroshahi, A. (2018).** Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 29408-29417.

60. **Hupp, T. R., Sparks, A., & Lane, D. P. (1995).** Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell*, 83(2), 237-245.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

J

- 61. Jaeger, C., Voronska, E., Fraoucene, N., & Cherin, P. (2012).** Exposition chronique aux pesticides, santé et longévité. Rôle de notre alimentation. *Médecine & Longévité*, 4(2), 75-92. <https://doi.org/10.1016/j.mlong.2012.05.002>
- 62. Johnston, C. S., Steinberg, F. M., & Rucker, R. B. (2007).** Propriété physicochimique Ascorbic acid. *Handbook of vitamins*, 4, 489-520.

I

- 63. Id El Mouden, O. (2010).** Quantification des résidus de pesticide sur la tomate et le poivron et l'étude de la dégradation de Difénoconazole sous l'effet de photo-oxydants atmosphériques à l'interface solide/gaz (Doctoral dissertation, Reims).
- 64. Inserm. (2008).** « Cancers-environnement », Collection Expertise collective, Éditions, 2008, ISBN 978-2-85 Inserm598-868-3, 907 pages.
- 65. Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., & Nevins, J. R. (2001).** Role for E2F in Control of Both DNA Replication and Mitotic Functions as Revealed from DNA Microarray Analysis. *Molecular and Cellular Biology*, 21(14), 4684-4699. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4684-4699.2001>

K

- 66. Khaldoun Oularbi, C Richeval, N Lebaili, N Zerrouki-Daoudi, M Baha, N Djennas, D Allorge (2017).** Ameliorative effect of vitamin C against hepatotoxicity induced by emamectin benzoate in rats—H. Consulté 28 juin 2022, à l'adresse <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0960327116661022>
- 67. Kanhar, N. A. (2017).** Vue de la dégradation des pesticides lambda-cyhalothrine à l'aide de Mesorhizobium sp. (S1b) et Bartonella sp. (S2b) Souches isolées d'une culture de coton. <http://pjaec.pk/index.php/pjaec/article/view/322/261>
- 68. Klenner, F. R. (1949).** The treatment of poliomyelitis and other virus diseases with vitamin C. *Southern medicine and surgery*, 111(7), 209-214.
- 69. Ko, L. J., & Prives, C. (1996).** p53: puzzle and paradigm. *Genes & development*, 10(9), 1054-1072.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

70. Kumar, A., Sasmal, D., & Sharma, N. (2015). An insight into deltamethrin induced apoptotic calcium, p53 and oxidative stress signalling pathways. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 7(1), 25-34. <https://doi.org/10.1007/s13530-015-0217-1>

L

71. Lacour, B., & Belon, J.-P. (2016). *Physiologie humaine*. Elsevier Health Sciences France.
72. Liu, Y. Q., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545
73. Luo, W., & Lin, S. C. (2004). Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals*, 13(3), 99-113.
74. Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2019). The pharmacokinetics of vitamin C. *Nutrients* 11 (10).

M

75. Martin, V., & Vicari, F. (2004). Atlas d'anatomie humaine. *Acta Endoscopica*, 34(4), 630-630. <https://doi.org/10.1007/BF03006357>
76. Martini, M. C., & Seiller, M. (1999). Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales Paris. Lavoisier, 563, 24.
77. Maxfield, L., & Crane, J. S. (2018). Vitamin C deficiency.
78. Mège, R. M. (1991). Les molécules d'adhérence cellulaire: molécules morphogénétiques.
79. Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. *Journal of cellular physiology*, 213(2), 286-300.
80. Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
81. Morton, R. A., Ewing, C. M., Watkins, J. J., & Isaacs, W. B. (1995). The E-cadherin cell-cell adhesion pathway in urologic malignancies. *World journal of urology*, 13(6), 364-368.
82. Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F., & Deppert, W.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1995). Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *The EMBO journal*, 14(18), 4442-4449.

83. **Muranli, F. D. G. (2013)**. Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides λ -cyhalothrin and α -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 90(3), 357-363.

N

84. **Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Sérrier, S., Le Bloc'h, J., Siliart, B., & Dumon, H. (2008)**. Métabolisme des lipides hépatiques—*Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*—Wiley Online Library.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>.

O

85. **Okorokov, A. L., Sherman, M. B., Plisson, C., Grinkevich, V., Sigmundsson, K., Selivanova, G., ... & Orlova, E. V. (2006)**. The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *The EMBO Journal*, 25(21), 5191-5200.
86. **OMS. (1991)**. Organisation mondiale de la santé. L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique. Genève : Organisation mondiale de la santé; 1991.
87. **Omshi FS, Abbasalipourkabir R, Abbasalipourkabir M, Nabyan S, Bashiri A, Ghafourikhosroshahi A (2018)**. Effect of vitamin A and vitamin C on attenuation of ivermectin-induced toxicity in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res.*; 25(29): 2940829417.

P

88. **Parreau, S., Palat, S., Cypierre, A., Ly, K. H., Lapébie, F. X., Gondran, G., ... & Fauchais, A. (2015)**. Scorbut, la maladie des corsaires toujours d'actualité. *La Revue de Médecine Interne*, 36(Supplement 2).
89. **Patil, S. M., Kadam, V. J., & Ghosh, R. (2009)**. In vitro antioxidant activity of methanolic extract of stem bark of *Gmelina arborea* Roxb.(Verbenaceae). *International Journal of PharmTech Research*, 1(4), 1480-1484

R

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

90. Rabes HM (1977). Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. *Ciba Found Symp*:31–53. [PubMed: 248005]

91. Roche, M., Dufour, C., Mora, N., and Dangles, O. (2005). Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry, *Organic and Biomolecular Chemistry* 3, 423-430.

S

92. Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., & Gerdes, J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. | *Journal of Cell Biology* | Rockefeller University Press.

<https://rupress.org/jcb/article/123/3/513/28839/The-cell-proliferation-associated-antigen-of>.

93. Settari, A., Khaldoun, H., Tarzaali, D., & Mekhaldi, F. (2021). AMELIORATIVE EFFECT OF VITAMINS A, E, D & C ON AMPLIGO A SYNTHETIC INSECTICIDE INDUCING TOXICITY ON RABBIT ADRENAL GLAND.

94. Sharpe, R., & Skakkebaek, N. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet*, 341(8857), 1392-1396. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90953-E](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E).

95. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., & Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175-189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>.

96. Silbernagl, S., & Despopoulos, A. (2004). Atlas de poche de physiologie. Flammarion médecine-sciences.

97. Stamatova-Yovcheva, K., Dimitrov, R., Kostov, D., & Yovchev, D. (2012). ANATOMICAL MACROMORPHOLOGICAL FEATURES OF THE LIVER IN DOMESTIC RABBIT (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*). *TRAKIA JOURNAL OF SCIENCES*, 10(2), 6.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

98. **Stavridi, E. S., Huyen, Y., Sheston, E. A., & Halazonetis, T. D. (2005).** The threedimensional structure of p53. In *The p53 Tumor Suppressor Pathway and Cancer* (pp. 25-52). Springer, Boston, MA.
99. **Stevens, A., & Lowe, J. S. (2006).** *Histologie humaine 3ème édition*. Elsevier-masson. <https://www.librairie-gallimard.com/livre/9782842997519-histologie-humaine-alanstevens-james-steven-low>.
100. **Stoyanova, S., Georgieva, E., Velcheva, I., Yancheva, V. et Atanasova, P. (2012).** Effets de l'insecticide « Actara 25 WG » sur la glyconéogenèse dans le foie de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of BioScience & Biotechnology*, 1 (3).
101. **Sule, RO, Condon, L. et Gomes, AV (2022).** Une caractéristique commune aux pesticides : le stress oxydatif — le rôle du stress oxydatif dans la toxicité induite par les pesticides. *Médecine oxydative et longévité cellulaire*, 2022.
102. **Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018).** Ki-67 : More than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175-186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>.

I

103. **Testud, F., Garnier, R., & Delemotte, B. (2001).** Insecticides organophosphorés, carbamates anticholinestérasiques et pyréthrinoïdes de synthèse. In : Testud F, Garnier R, Delemotte B, editors. *Toxicologie humaine des produits phytosanitaires*. Paris : ESKA; 2001. P. 67-116.
104. **Testud, F., & Grillet, J.-P. (2007).** Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. *EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement*, 2, 1-24. [https://doi.org/10.1016/S1155-1925\(07\)71836-0](https://doi.org/10.1016/S1155-1925(07)71836-0).
105. **Thatheyus, A. J., & Gnana Selvam, A. D. (2013).** Synthetic Pyrethroids : Toxicity and Biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 1(3), 33-36. <https://doi.org/10.12691/aees-1-3-2>.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

106. **Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., ... & Zheng, G. (2011).** E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
107. **Toledo, F., Bluteau, O., & Simeonova, I. (2007).** Réactivation de p53 dans les tumeurs: une stratégie antitumorale prometteuse. *médecine/sciences*, 23(6-7), 565-567.
108. **Tordoir, W., Maroni, M., & He, F. (1994).** Special issue : Health surveillance of pesticide workers [A manual for occupational health professionals - preface] [WEB SITE].
https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/3064070.

Y

109. **Vestweber, D., & Kemler, R. (1984).** Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. *Cell differentiation*, 15(2-4), 269-273.
110. **Vousden, K. H., & Lu, X. (2002).** Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 594-604.
111. **Vogelstein, B. and Levine AJ (2000).** *Surfing the p53 network. Nature*, 408, 307-310.

W

112. **Washington, D.C.: National Academy Press. Institute-of-Medicine. (2000).** Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoides.
113. **Wintergerst, E. S., Maggini, S., & Hornig, D. H. (2006).** Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 50(2), 85-94.
114. **Waugh, A., Grant, A., Cosserat, J., & Scott, J. (2011).** Anatomie et physiologie normales et pathologiques. Elsevier Health Sciences.

Y

115. **Yanagawa, S. I., Matsuda, Y., Lee, J. S., Matsubayashi, H., Sese, S., Kadowaki, T., & Ishimoto, A. (2002).** Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *The EMBO journal*, 21(7), 1733-1742.

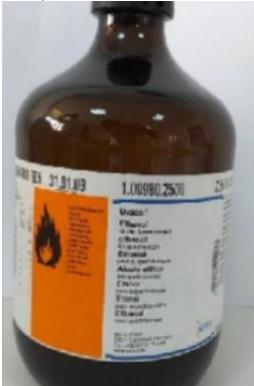
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

116. Yavuz, T., Delibas, N., Yildirim, B., Altuntas, I., Candır, O., Cora, A., ... & Kutsal, A. (2004). Lésion de la paroi vasculaire chez le rat induite par le méthidathion et effet améliorant des vitamines E et C. *Archives of toxicology*, 78 (11), 655-659.
117. Yélamos, F., Díez, F., Martín, C., Blanco, J. L., García, M. J., Lardelli, A., & Peña, J. F. (1992). [Acute organophosphate insecticide poisonings in the province of Almería. A study of 187 cases]. *Medicina clinica*, 98(18), 681-684.
118. Yoshikawa, T., Yamamoto, Y., & Naito, Y. (2000). Free radicals in chemistry, Biology and Medicine, Ed. Oica International.
119. Yoshino, I., Kase, S., Yano, T., Sugio, K., & Sugimachi, K. (2002). Expression status of E-cadherin and α -, β -, and γ -catenins in thymoma. *The Annals of Thoracic Surgery*, 73(3), 933-937. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)03434-8](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)03434-8).

Z

120. Zoumenou, B., Aïna, M. P., Agbohessi, P., Toko, I. I., & Scippo, M.-L. (2015). Effets toxicologiques et méthodes d'analyse de la lambda-cyhalothrine et de l'acétamipride utilisés dans la protection phytosanitaire du cotonnier au Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(4), 2184-2199. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v9i4.38>.

ANNEXES

Annexe 1 : Réactifs de la technique d'histologie et d'IHC.**Éthanol**

Formule chimique : C_2H_5OH

Nom chimique : Alcool éthylique

Propriétés physico-chimiques :

- Apparence liquide incolore d'odeur caractéristique
- Facilement inflammable et volatil
- Miscible à l'eau et non miscible à la paraffine
- Provoque un fort durcissement du tissu

Xylène

Formule chimique : C_8H_{10}

Nom chimique : diméthylbenzène , un hydrocarbure benzénique (composé aromatique)

Propriétés physico-chimiques :

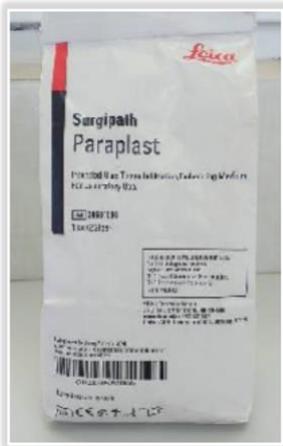
- Liquide incolore
- Miscible à la fois à l'eau et à la paraffine
- Inflammable, très toxique et irritant pour les yeux (manipulation avec prudence en assurant une bonne ventilation "hotte spéciale")

Formol liquide à 37%

Formule chimique : CH_2O

Propriétés physico-chimiques :

- Liquide incolore
- Inflammable et provoque de graves brûlures
- Cancérigène
- Irritant pour les yeux



Paraffine

Formule chimique :

Propriétés physico-chimiques :

- Point de fusion 45 à 60°C
- Non miscible à l'eau
- Soluble dans les hydrocarbures benzéiques (exemple : le xylène)

Coloration H&E :

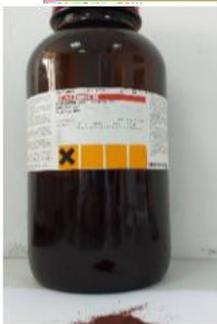


Hémateine

Formule chimique : $C_{16}H_{14}O_6$

Propriétés physico-chimiques :

- Composé de : hématoxyline , éthanol (100%) , alun de potasse et eau distillée
- Liquide inflammable et Irritable pour les yeux et la peau



Eosine Y

Formule chimique : $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$

Propriétés physico-chimiques :

- Composé de : éosine (3g) , eau distillée 375 mL , alcool éthylique 125 mL et acide acétique glacial (2 gouttes.)
- Irritant pour les yeux

Préparation des réactifs :

1. Alcool acide : - Alcool éthylique à 70% : 1 L

- Acide chlorhydrique concentré : 5ml

2. Eau ammoniacale : - Eau distillée : 1 L

- Ammoniaque : 2ml

3. **Éosine** : - Éosine ; solution aqueuse à 3% : 100 mL

- Alcool éthylique à 95% : 125 mL

- Eau distillée : 375 mL

- Acide acétique glacial : 2 gouttes

Réactifs des colorations spéciales

I. Trichrome de Masson



Ponceau de xylene

Formule chimique :



Propriétés physico-chimiques :

colorant azoïque rouge
soluble dans l'eau

Vert lumière

Formule chimique



Propriétés physico-chimiques :

-Soluble dans l'eau

Acide acétiqueFormule chimique : CH_3COOH
appelé ainsi acide éthanoïque.

Propriétés physico-chimique :

- Liquide incolore et inlammable
- Appartient à la famille des carboxyliques

Acide phosphomolybdiqueFormule chimique : $12\text{MoO}_3\text{H}_3\text{PO}_4$

Propriétés physico-chimiques :

- Forme solide jaune-vert
- Soluble dans l'eau et l'éthanol
- Composé de : 12 molécules de tri-oxyde molybdène MoO_3 et d'acide phosphorique H_3PO_4
- Irritable et corrossif

Fuschine acideFormule chimique : $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$

Propriétés physico-chimiques :

colorant rouge violacé
aspect liquide
Inodore

Préparation des réactifs :

Solution de Fuschine-ponceau : 50ml d'une solution aqueuse à 1 de fuschine acide + 100ml d'une solution de 1 de ponceau de xylene dans l'eau acétique à 1% solution de vert lumière : vert lumière 1g + eau distillée 100 ml + acide acétique 1ml.



Acide périodique

Formule chimique : H_5IO_6

Propriétés physico-chimiques :

- Apparence solide cristallin
- Inflammable en contact avec les matières organiques ou combustibles

Réactif de Schiff

Propriétés physico-chimiques:

- Spécifique aux aldéhydes
- Une coloration magenta ou pourpre apparaît donc si la réaction est positive.

Annexe 2 : Appareillage



Etuve (*Binder*)



Appareille d'inclusion (*Leica*)



Bain marie (*Leica*)



Microtome (*Leica*)



Microscope optique



Automate d'IHC Benchmark Leica
(VENTANA)



Anticorps prêt à l'emploi
(VENTANA)

Avantages de l'instrument BenchMark ULTRA

- Entièrement automatisé
- Marquages IHC et ISH standardisés
- Optimisation du flux de travail avec ses 35 positions de réactifs et 30 à lames indépendants pièce à pièce (One-piece-flow) qui leur offre un accès continu. Il élimine la nécessité de regrouper les échantillons et rend possible d'ajouter des lames dans n'importe quel tiroir disponible tout au long de la journée, et ce, sans perturber les processus de coloration en cours.
- Chauffage individuel des lames, le Liquid Coverslip LCS (barrière de protection du milieu réactionnel liquide) et les Vortex Mix (mélangeurs à air) garantissent des conditions de coloration optimales
- Accès à une variété de kits de détection sensibles et à un large éventail de tests prêts à l'emploi.

ANNEXE 3 : Classification des vitamines

Il existe deux grands types de vitamines :

- les vitamines liposolubles (A, D, E, K) sont stockées au niveau du tissu adipeux (D, E) et en quantité importante dans le foie (A) ; elles peuvent donc s'accumuler dans l'organisme et entraîner un risque potentiel en cas de surdosage.
- les vitamines hydrosolubles des groupes B (B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8, B9 et B12) et C peuvent être stockées, mais les risques de surdosage sont moindres car elles sont éliminées dans les urines.