

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

M^{elle} BOUTRA Hafida

M^{elle} LOUNI Rahma

Thème

Étude de l'effet *in vitro* du peroxy-nitrite sur la viabilité de la larve hydatique d'*Echinococcus granulosus*

Soutenu le : 01/07/2018

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme BEN AZOUZKL K

MAA

Univ. de Bouira

Présidente

Mme BOUTELDJA Razikia

MAA

Univ. de Bouira

Promotrice

Mme MERIBAI N

MAA

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Nous remercions **ALLAH** le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience durant la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promotrice M^{me} **ZEGHIR-BOUTELDJA, R.** Enseignant–chercheur à l’université Akli Mohand Oulhadj d’avoir accepté de diriger ce travail ainsi que pour l’aide qu’elle nous apporté et pour sa rigueur scientifique et l’intérêt constant qu’elle nous cessé d’accorder à l’orientation et à la réalisation de cette mémoire. Qu’elle trouve ici nos sentiments de gratitude.

Nous tenons à exprimer notre respectueux remerciement à M^{me} **BEN AZZOUZ, K** maitre assistante à l’université Akli Mohand Oulhadj pour l’honneur qu’elle nous fait en acceptant la présidence de jury de notre soutenance

Nous remercions M^{me} **MERIBAI, N** maitre assistant à l’université Akli Mohand Oulhadj d’avoir accepté d’examiner ce modeste travail et participer au jury.

On tient à remercier M^{me} **FRENDI Ouiza** chef de service au laboratoire d’anatomopathologie de l’établissement hospitalier Mohamad Boudiaf de Bouira

A tout le personnel du laboratoire d’anatomopathologie de l’établissement hospitalier Mohamad Boudiaf de Bouira, on cite **Kahina, Razika** et **Chahra** qui on contribué au bon déroulement de notre stage et pour leur soutien et aide.

Notre remerciement s’adressent à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie. Très cordialement.

Dédicaces

Je remercie **ALLAH** le tout puissant qui ma permet d'arriver à ce but et m'avoir donné la force d'aller jusqu'au bout de ce travail.

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde

À Mon père : **Belkacem**

À Ma mère : **Louiza**

Qui n'ont cessé de m'encourager et qui ont toujours donné le meilleur d'eux même pour me voir réussir, merci pour votre amour incommensurable.

J'espère que vous êtes fières de moi. Que dieu vous protège et vous garde à nos cotés.

À ma sœur **Khadidja**

À ma sœur **Yamina** et son marie **Lakhdar**

À mes chères frères : **Lhadj, Mohamed, Rachid, Mesaoude, Saad, Adel, Ismail**

Aux anges de ma famille.

Je dédie ce travail :

À **Fateh** et **Brahime**

À mon binôme **Rahma**

À tout mes amis et mes collègues

À tout le personnel administratif et technique.

HAFIDA

Dédicaces

Louange à **DIEU** qui m'a donnée la force d'accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail à

Mon premier amour restant pour toujours mes parents:

Mon père **Boualem** qui pense toujours a ma réussite.

Ma douce et très chère mère **fatimazouhra**« qui a contribué tous ces efforts
pour que je sois heureuse»

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers
vous

A mon seul et cher frère **Fouaz** et sa femme **Ibtissam**

A mon cher binôme **Hafida**

À mes chères sœurs qui m'ont soutenue tout au long de mes études :

Chaima

Asma et son marie **Hakim**

Je les adresse mes vrais sentiments Sans oublier les petites de ma famille

Mohamed et **Hadil**

A tous qui ma donnée le soutien

Toute mes amies et mes collègues de bouira promotion biochimie2017-2018

Et en fin je dédie ce travail à tout qui m'ont aimé.

RAHMA

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
µl	Microlitre
µm	Micromètre
ε	Coefficient d'extinction molaire
A	Absorbance
ADN	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
C	Concentration
Ca⁺⁺	Calcium
cm	Centimètre
CO₂	Dioxyde de carbone
DMEM	Milieu minimum essentiel d'Eagle
DO	Densité optique
<i>E. granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
ELISA	Enzyme linked immuno sorbant assay
G	Génotype
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HCl	Acide chlorhydrique
HD	Hôte définitif
HI	Hôte intermédiaire
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
KH₂PO₄	Monopotassium Phosphat
L	Longueur du trajet
LPS	Lipopolysaccharides
M	Molaire
Max	Maximum
mg	Milligramme
mm	Millimètre
N₂O₃	Trioxyde d'azote
Na cl	Chlorure de sodium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NaHCO₃	L'hydrogénocarbonate de sodium

Liste des abréviations

NaNO₂	Nitrite de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
nm	Nanomètre
NO	Monoxyde d'azote
NO⁺	Nitrosonium
NO₂⁻	Nitrite
NO₃⁻	Nitrate
NOS	NO synthases
NOSi	NO synthases inducible
O₂	Oxygène
O₂⁻	Ion superoxyde
OMS	Organisation mondiale de santé
ONOO⁻	Peroxynitrite
PAIR	Ponction-aspiration-injection réaspiration
TGF-β	Tumorgrowth factor β
Th	T helper
TNF-γ	Interféron gamma
U.V	Ultraviolet

Liste de figures

Figure 01 : Stade adulte d'*Echinococcus granulosus*.

Figure 02: Morphologie générale de l'œuf d'*Echinococcus granulosus*.

Figure 03: Schéma de la morphologie générale du kyste hydatique.

Figure 04 : Cycle évolutif d'*Echinococcus granulosus*.

Figure 05 : Mécanisme de biosynthèse de NO.

Figure 06: Protocole de synthèse du peroxy-nitrite par la méthode du « quench flow ».

Figure 07: La démarche expérimentale.

Figure 08 : Image d'un poumon infecté par un kyste hydatique(A), réalisation des coupes macroscopiques (B).

Figure 09 : Image de la mise en culture des pièces de membrane dans le milieu DMEM.

Figure 10 : Image de la fixation des pièces dans le formaldéhyde.

Figure 11: Automate de déshydratation (Leica).

Figure 12 : Inclusion en paraffine.

Figure 13 : Réalisation des coupes histologiques.

Figure 14 : Etalement, collage et séchage.

Figure 15 : Déparaffinage et Coloration.

Figure 16: Le montage.

Figure 17 : Observation des coupes histologiques au moyen d'un microscope optique.

Figure 18 : Solution de peroxy-nitrite de couleur jaune produite par la méthode de «Quenche Flow ».

Figure 19 : mise en évidence de la réaction de nitration des groupements phénoliques de la phénophtaléine par le peroxy-nitrite.

Figure 20 : Hydatidose pulmonaire d'origine bovine.

Figure 21 : Effet *in vitro* du peroxy-nitrite sur la couche laminaire présentant un brunissement en présence de différentes concentrations croissantes de peroxy-nitrite après 48 heures d'incubation à 37°C.

Liste de figures

Figure 22: Coupe histologiques d'une biopsie d'un poumon sain d'un bovin observé au microscope optique après coloration à l'hématoxyline éosine GX10.

Figure 23 : Tissu pulmonaire affecté par la larve hydatique observé au microscope optique après coloration à l'hématoxyline éosine GX10.

Figure 24 : Effet cytotoxiques du peroxy-nitrite vis-à-vis du tissu pulmonaire à une concentration de 10 μM GX 4.

Figure 25 : Effets cytotoxiques du peroxy-nitrite vis-à-vis du tissu pulmonaire à une concentration de 20 μM GX 10.

Figure 26 : Effets cytotoxiques du peroxy-nitrite vis-à-vis du tissu pulmonaire à une concentration de 30 μM observé au microscope optique GX10.

Figure 27 : Effet du peroxy-nitrite sur la membrane laminaire mise en culture dans du DMEM incubée pendant 48 heure à 37°C dans une atmosphère humide saturé avec du CO_2 et concentration de 40 μM observé au microscope optique après coloration à l'hématoxyline éosine GX10.

Figure 28 : Effets cytotoxiques du peroxy-nitrite avec altération des tissus pulmonaires et la destruction cellulaire à différents concentration GX10.

Liste des tableaux

Tableau 01: Les trois principales isoformes des N O synthases.

Tableau 02 : Appareillages et équipements.

Tableau 03 : Etapes de déshydratation.

Tableau 04 : principales étapes de coloration à l'Hémalun-Eosine (HE).

Sommaire

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Revue bibliographique

Chapitre I : L'échinococcose kystique

I.1. Définition.....03

I.2. La classification d'*E. granulosus*.....03

I.3. Les souches d'*Echinococcus granulosus*.....03

I.3.1. La souche G1 Chien-Mouton.....04

I.3.2. La souche G4 chien-cheval.....04

I.3.3. La souche G5 chien-bœuf.....04

I.3.4. La souche G6 chien-dromadaire.....04

I.3.5. La souche G7 chien-porc et inclus la variante G9.....04

I.3.6. La souche G8 chien-cervidés, chien-homme.....05

I.3.7. La souche G10.....05

I.3.8. La souche lion.....05

Sommaire

I.4. Description morphologique d' <i>Echinococcus granulosus</i>	05
I.4.1. <i>la forme adulte</i>	05
I.4.2. <i>l'œuf</i>	06
I.4.3. <i>la larve ou hydatide</i>	07
I.5. La morphologie des kystes.....	07
I.5.1. <i>L'adventice</i>	07
I.5.2. <i>La cuticule</i>	07
I.5.3. <i>La membrane proligère</i>	07
I.6. Le cycle de parasite.....	08
I.7. Les caractéristiques cliniques de l'hydatidose.....	09
I.7.1. <i>Les symptômes de l'hydatidose</i>	09
I.7.2. <i>Les localisations du kyste hydatique</i>	10
I.7.2.1. <i>La localisation hépatique</i>	10
I.7.2.2. <i>La localisation pulmonaire</i>	10
I.7.2.3. <i>Les localisations rares</i>	10
I.8. Diagnostic de l'échinococcose kystique.....	10
I.9. Réponse immune de l'hôte.....	11
I.10. Traitement de l'Echinococcose kystique.....	12

Sommaire

I.11. Prophylaxie.....	12
Chapitre II : Le monoxyde d'azote	13
II.1. Définition de monoxyde d'azote.....	13
II.2. Propriétés physicochimiques de monoxyde d'azote.....	13
II.3. La biosynthèse de NO.....	14
II.4. Les isoformes de la NOS.....	15
II.5. Métabolisme et mécanisme d'action cellulaire de NO.....	16
I.6. les effets de NO.....	17
II.7. NO et système immunitaire.....	18
II.8. La cytotoxicité du monoxyde d'azote.....	18

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthode

III.1. Matériel.....	19
III.1.1. Matériel biologique.....	19
<i>III.1.1.1. Kystes hydatiques.....</i>	19
<i>III.1.1.2. Les biopsies.....</i>	19
<i>III.1.1.3. Le milieu de culture.....</i>	19
III.1.2. Matériel non biologique.....	20

Sommaire

<i>III.1.2.1. Appareillages et équipements</i>	20
<i>III.1.2.2. Accessoires et verreries</i>	20
<i>III.1.2.3. Réactifs</i>	21
III.2. Méthode.....	21
III.2.1. Synthèse du peroxy-nitrite par la méthode du «quench flow».....	21
III.2.2. Obtention des membranes kystiques d' <i>Echinococcus granulosus</i>	24
III.2.3. La mise en culture des pièces de membrane.....	24
III.2.4. Technique de préparation des coupes histologiques.....	25
<i>III.2.4.1. La fixation des pièces dans le formaldéhyde</i>	25
<i>III.2.4.2. Déshydratation et éclaircissement</i>	26
<i>III.2.4.3. Inclusion en paraffine (enrobage)</i>	27
<i>III.2.4.4. La réalisation des coupes histologiques</i>	28
<i>III.2.4.5. Etalement, collage et séchage</i>	29
<i>III.2.4.6. Déparaffinage et réhydratation</i>	30
<i>III.2.4.7. Coloration et montage</i>	30
<i>III.2.4.8. observation microscopique des coupes histologiques</i>	33
Chapitre IV : Résultats et discussion	
IV.1. Résultats.....	34

Sommaire

IV.1.1. Obtention de la solution du peroxy-nitrite.....	34
<i>IV.1.1.1. Production du peroxy-nitrite de sodium (ONOO_{Na}).....</i>	<i>34</i>
<i>IV.1.1.2. Etude de la réaction de nitration par le peroxy-nitrite.....</i>	<i>34</i>
IV.1.2. Examen macroscopique.....	36
IV.1.3. Etude de l'effet <i>in vitro</i> du peroxy-nitrite sur les membranes du kyste hydatique.....	36
<i>IV.1.3.1. Effet sur la membrane germinative adhérente à la membrane laminaire.....</i>	<i>36</i>
IV.1.4. Etude histologique.....	37
<i>IV.1.4.1. Tissu pulmonaire sain</i>	<i>37</i>
<i>IV.1.4.2. Tissu pulmonaire affecté par la larve hydatique.....</i>	<i>38</i>
<i>IV.1.4.3. Etude des effets cytotoxiques <i>in vitro</i> du peroxy-nitrite.....</i>	<i>39</i>
VI.2. Discussion générale.....	45
Conclusion.....	48

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction

L'échinococcose kystique est une maladie parasitaire répandue sous forme endémique dans différentes régions du monde (**Bakkali, 2017**). Elle résulte du développement tissulaire de la larve hydatique (hydatide) d'un cestode appelé *Echinococcus granulosus*. C'est une anthroponose cosmopolite qui sévit de façon endémique dans les pays du bassin méditerranéen plus particulièrement en Algérie où elle constitue un véritable problème de santé publique, elle sévit en zone d'élevage (ovins, bovins, caprins, porcins, camélidés, équidés) (**Aubry, 2013**).

L'échinococcose kystique est due à la dissémination par voie systémique du parasite dans la majeure partie des cas dans le foie et les poumons (**bakkali, 2017**). Elle est caractérisée par sa persistance chez l'hôte intermédiaire entraînant l'infection chronique.

Plusieurs travaux ont rapporté l'implication du monoxyde d'azote dans les mécanismes anti parasitaires. C'est un biomédiateur synthétisé par les NO synthases (NOS). C'est un messager intracellulaire et un effecteur de nombreuses fonctions biologiques, il a été détecté au cours de plusieurs parasitoses telles que la leishmaniose (**Drapier, 1996**). Ce radical hautement réactif est produit via la NO synthase inductible au cours de la réaction inflammatoire et serait impliqué dans les mécanismes de défense de l'hôte contre *Echinococcus granulosus* au cours de l'hydatidose (**Touil et al., 1998 ; Bouteldja et al., 2013**).

Ainsi, la NOS inductible «iNOS» ou «NOS II» produit de grandes quantités de NO. Ce dernier conduit à la formation des dérivées telles que le nitrite (NO₂), le nitrate (NO₃) et le peroxy-nitrite (ONOO⁻) qui est un puissant oxydant. Il a été rapporté dans ce sens, que le peroxy-nitrite est impliqué dans le processus d'apoptose et de nécrose (**Zeghir-Bouteldja et al., 2009**).

Dans ce contexte, les objectifs de la présente étude porte sur les points suivants :

- Synthèse d'une solution de peroxy-nitrite par la méthode du quench flow.
- Etude de l'effet *in vitro* du peroxy-nitrite sur la viabilité du kyste hydatique.
- Evaluation de l'effet cytotoxique du peroxy-nitrite sur le tissu pulmonaire.

Introduction

Notre travail est réparti en deux parties, une partie bibliographique rappelant quelques généralités sur l'hydatidose et le monoxyde d'azote. La partie expérimentale comprendra le matériel et méthode utilisés pour la réalisation de ce travail, ainsi que les résultats obtenus. Enfin, nous terminerons par une discussion générale.

Chapitre I : l'échinococcose kystique

I.1. Définition

L'hydatidose est une maladie parasitaire répandue sous forme endémique dans différentes régions du monde (**bakkali et al., 2017**). Elle est causée par une infection par le stade larvaire (métacestodes) des ténias du chien appartenant au genre *Echinococcus* (famille *Taeniidae*) et est également référé comme échinococcose kystique.

I.2. Classification d'*E. granulosus*

Le débat taxonomique se poursuit encore aujourd'hui au sein d'*E. granulosus*. Ce dernier présente une grande diversité (**Zeghir-bouteldja, 2018**). Cependant ce parasite est classé comme suit :

Phylum : Platyhelminthe

Sous-Phylum: Neodermata

Classe: Cestoda

Sous-Classe: Eucestoda

Ordre: Cyclophyllidea

Famille: *Taeniidae*

Genre: *Echinococcus*

Les trois grandes formes morphologiques d'échinococcose sont cliniquement reconnues : l'échinococcose kystique causée par *E granulosus*, l'échinococcose alvéolaire causée par *E multilocularis*, et l'échinococcose polykystique causée par *Echinococcus vogeli* ou *Echinococcus oligarthrus* (**craig., 2007**).

I.3. Les souches d'*Echinococcus granulosus*

Le genre *Echinococcus granulosus* présente une grande variation de phénotype, ce qui a conduit les chercheurs à établir une nouvelle taxinomie (**Romig et al., 2006; Thompson et McManus, 2002**). Il y a une taxinomie des zoonoses à tendance épidémiologique qui tient compte des modalités de transmission et vient compléter la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) qui est à tendance biologique (**Euzeby, 1997**).

Les récentes études en biologie moléculaire révèlent l'existence de dix (10) souches d'*E. granulosus* (G1 à G10). Il s'agit d'*E. granulosus* au sens strict (G1 à G3), d'*E. equinus*

(G4), d'*E. ortleppi* (G5) et d'*E. canadensis* (G6 à G10) (Ito *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2006 ; Romig *et al.*, 2006). Les souches d'*E. granulosus* ont une morphologie variable ce qui rend difficile leur taxinomie (Moro et Schantz., 2006).

1.3.1. La souche G1 Chien-Mouton

La souche G1, affecte les ruminants, les porcins et l'homme. Les hôtes définitifs sont le chien, le loup, le renard, le chacal et le dingo (Thompson et McManus, 2002). La souche ovine espagnole affecte en plus des ovins, les bovins, les caprins, les porcins, le sanglier et l'homme (Mwambete *et al.*, 2004), alors qu'en Italie la souche G1 affecte le buffle (Capuano *et al.*, 2006). Cette souche prédomine dans le bassin méditerranéen, au Pays de Galles (Romig *et al.*, 2006) et en Amérique du Sud (Kamenetzky *et al.*, 2000). Des études, révèlent que les ovins sont infectés à la fois par la souche ovine G1 et par la souche G3 (Varcasia *et al.*, 2007) Les souches G1 et G3, peuvent également coexister chez le buffle. La localisation chez l'hôte intermédiaire touche surtout le foie et les poumons.

1.3.2. La souche G4 chien-cheval

E. equinus infecte le cheval. Cette souche n'est pas pathogène pour l'homme (Torgerson et Bedke, 2003). La localisation privilégiée chez l'hôte intermédiaire est le foie.

1.3.3. La souche G5 chien-bœuf

Les hôtes définitifs sont le chien et le renard. Cette souche infecte rarement l'homme. La localisation chez l'hôte intermédiaire est surtout pulmonaire (Kamenetzky *et al.*, 2000).

1.3.4. La souche G6 chien-dromadaire

Les hôtes définitifs sont le chacal et le chien. La souche G6 est responsable de l'hydatidose humaine. Le foie et les poumons sont les organes les plus touchés chez les hôtes intermédiaires (Maillard *et al.*, 2007; Kamenetzky *et al.*, 2000).

1.3.5. La souche G7 chien-porc et inclus la variante G9

Elle infecte le porc, les caprins et le sanglier. La localisation principale chez l'hôte intermédiaire est le foie (Varcasia *et al.*, 2007).

I.3.6. La souche G8 chien-cervidés, chien-homme

Les hôtes définitifs sont le loup et le chien. Les hôtes intermédiaires sont les cervidés (renne, élan, cerf) et l'homme. La localisation chez l'hôte intermédiaire est le poumon.

I.3.7. La souche G10

C'est la souche européenne ou souche cervidés (**Romig et al., 2006**).

I.3.8. La souche lion

Les hôtes intermédiaires sont le zèbre, le buffle, l'antilope et probablement la girafe et l'hippopotame (**Thompson et McManus., 2002**). Les caprins et les sangliers peuvent être infectés par les souches G1 et G7 (**Mwambete et al., 2004**).

I.4. Description morphologique d'*Echinococcus granulosus*

Le tænia *Echinococcus granulosus* responsable de l'hydatidose est un cestode qui se présente sous trois formes évolutives:

I.4.1. La forme adulte

C'est un ver plat hermaphrodite mesurant 2-7 mm de long qui vit fixé entre les villosités de l'intestin grêle du chien. Sa longévité varie entre 6 mois et 2 ans. Il comporte 3 parties à savoir une tête, un cou et un corps. La tête ou le scolex est d'aspect piriforme pourvue de 4 ventouses arrondies et d'un rostre saillant qui lui permettent de se fixer sur la paroi intestinale de l'hôte. Le corps est formé de trois à 5 anneaux dont le dernier anneau est grvide contenant jusqu'à 1500 œufs mûrs appelés aussi embryophores (**Figure 01**). Arrivé à maturité, ce dernier anneau se détache du reste du parasite pour être rejeté dans les selles en libérant ses œufs. Un anneau grvide est éliminé toutes les 2 à 5 semaines (**wejih et al., 2017**).

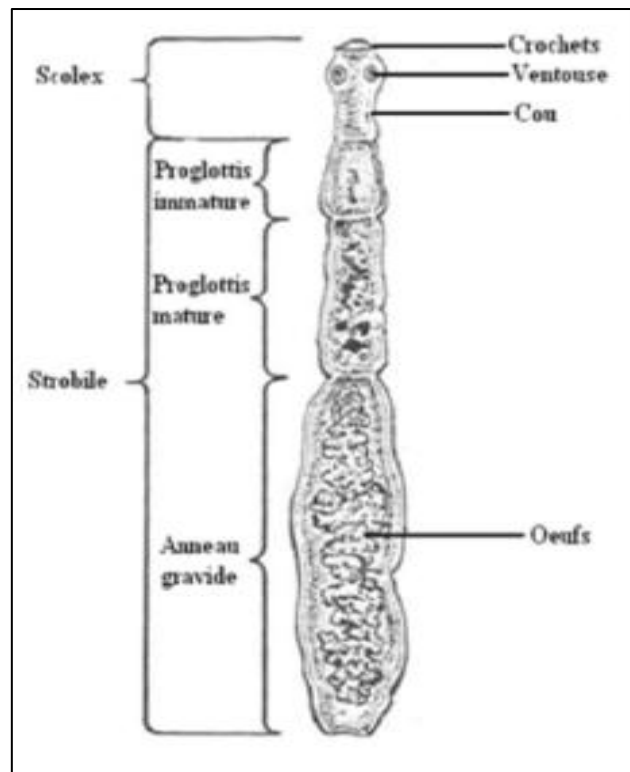


Figure01 : Stade adulte d'*Echinococcus granulosus* (Anofel, 2007).

1.4.2. L'œuf

Les embryophores sont de forme légèrement ovoïde mesurant 30 à 40 μm , non operculés, protégés par une coque épaisse et striée (**Figure02**). L'embryophore contient un embryon hexacanthé à six crochets ou oncosphère. Les embryophores sont résistants dans le milieu extérieur, leur survie dépend des conditions d'humidité et de température (**wejih et al., 2017**).

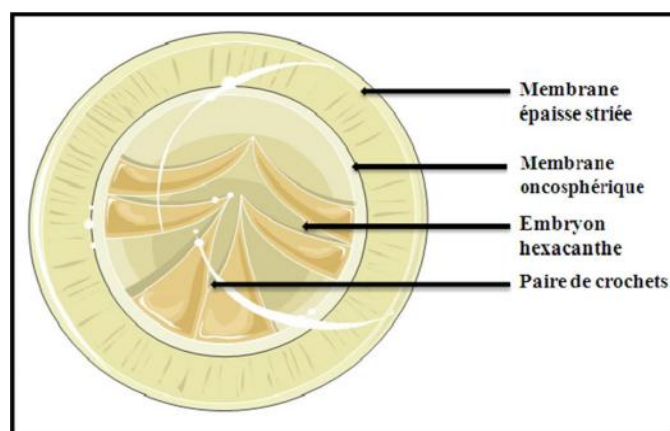


Figure02: Morphologie générale de l'œuf d'*Echinococcus granulosus* (laamrani et al., 2007).

1.4.3. La larve ou hydatide

Une fois fixé dans les viscères de l'hôte intermédiaire ou accidentel, l'embryon hexacanthé perd ses crochets, se vacuolise, développe une vésiculation centrale et prend alors une forme kystique. Sa croissance se fera de façon concentrique à la manière d'une tumeur bénigne. La vitesse de maturation est lente, dépendante de l'espèce hôte et du viscère parasité. Elle varie chez l'être humain de 1 à 30 mm par an (**wejih et al., 2017**).

1.5. La morphologie des kystes

La larve d'*E. granulosus* a un diamètre variable, d'une taille à peine visible à une taille équivalente à un ballon de football. Rempli de liquide sous pression, le kyste a un aspect arrondi ou plus ou moins ovalaire (**Figure 03**), avec parfois des « bosses » dues à la formation de vésicules filles exogènes. De l'extérieur vers l'intérieur, le kyste est formé de plusieurs membranes:

1.5.1. L'adventice

Formée par une couche de cellules du tissu hôte qui sont écrasées par le volume du kyste, n'appartient pas au parasite. Cet adventice comprend du tissu fibreux et des granulomes inflammatoires et giganto-cellulaires.

1.5.2. La cuticule

Dont l'épaisseur varie avec l'âge du kyste, à une consistance élastique, de couleur blanche brillante. Cette membrane anhiste, d'aspect lamellaire, est constituée de cholestérol, de galactose et de protéines, mais est pauvre en glycogène.

1.5.3. La membrane proligère

La membrane germinative tapissant la face interne de la membrane anhiste, elle est très fine de 10 à 25 microns d'épaisseur, comporte de nombreuses cellules chargées de lipides et d'autres de glycogène et est riche en acides aminés. Parfois apparaissent des bourgeons qui prolifèrent pour former les futures vésicules filles, soit à l'intérieur de la cavité (vésicule fille endogène) soit à l'extérieur (vésicule fille exogène), ces dernières pouvant essaimer dans tout l'organisme.

Les kystes peuvent atteindre 25 cm de taille, ils sont remplis d'un liquide hydatique (wejih et al., 2017) qui est limpide (eau de roche) et contient du « sable hydatique », c'est-à-dire des scolex (400 000 par mm³). En cas de fistulisation dans les voies biliaires ou dans les poumons, le liquide devient respectivement brun ou purulent (Bourée et Bisaro., 2007).

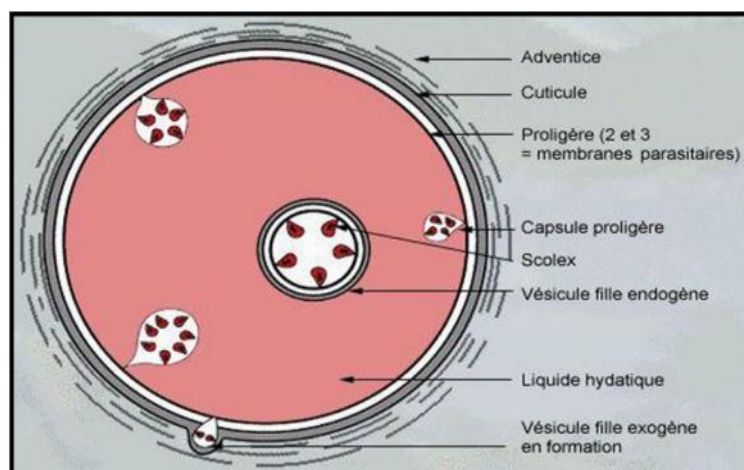


Figure03: Schéma de la morphologie générale du kyste hydatique (Laamrani et al., 2007).

I.6. Le cycle de parasite

Le cycle d'*Echinococcus granulosus* comprend deux hôtes: un hôte définitif (HD) représenté par des carnivores, principalement le chien, et un hôte intermédiaire (HI) correspondant à un herbivore le plus souvent le mouton. Le cycle classique domestique dans les zones rurales d'élevage. Les embryophores éliminés dans le milieu extérieur avec les selles du chien vont souiller le pâturage et sont ingérés par les moutons. Ils pénètrent la paroi digestive et gagnent par la circulation sanguine les viscères, principalement le foie et les poumons, où ils se transforment en larve hydatique. Le cycle est bouclé lorsque le chien dévore les viscères des moutons parasités. L'homme se contamine souvent en ingérant des aliments ou de l'eau contaminée par les embryophores ou après contact avec des chiens parasités. C'est un hôte dit « accidentel » correspondant à une impasse parasitaire (Figure 04), ses viscères n'étant pas accessibles aux chiens (wejih et al., 2017).

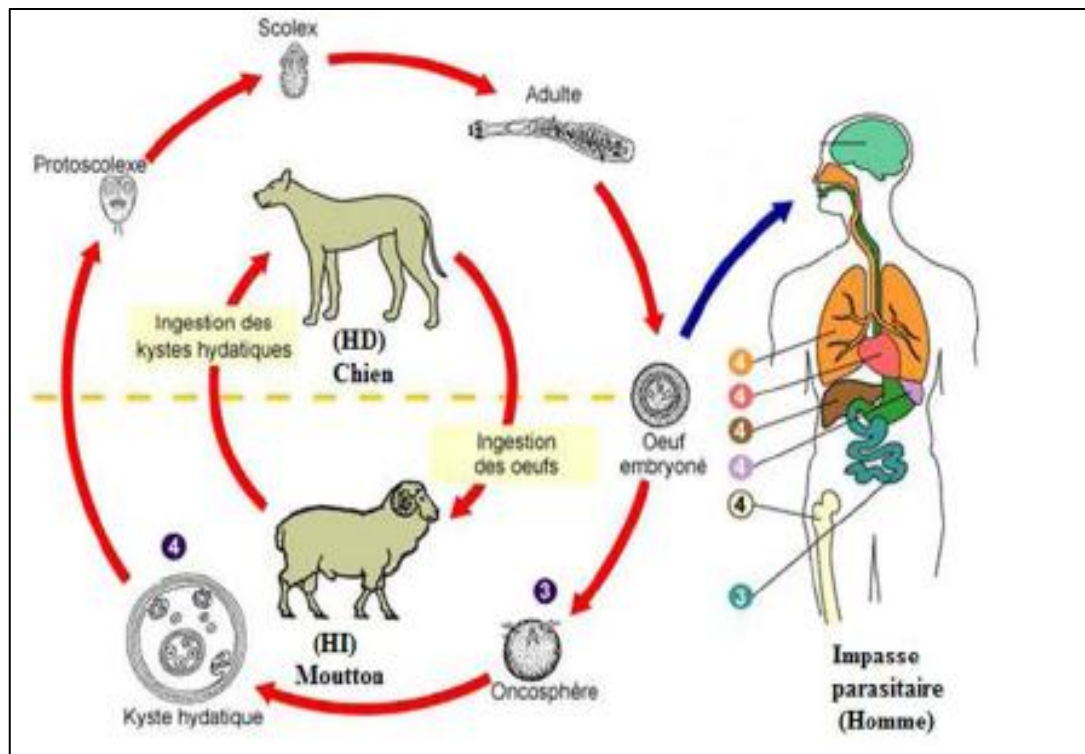


Figure04 : Cycle évolutif d'*Echinococcus granulosus* (Blibek, 2009).

I.7. Les caractéristiques cliniques de l'hydatidose

I.7.1. Les symptômes de l'hydatidose

En raison du caractère silencieux et une évolution lente du kyste hydatique, le diagnostic est établi plusieurs années après l'infestation. En l'absence de signes spécifiques de l'hydatidose, les symptômes apparaissent suite à la compression exercée sur les organes hébergeant le kyste hydatique. Tous les organes peuvent être atteints, mais essentiellement le foie et le poumon (Bourée et Bisaro, 2007).

La diversité des manifestations cliniques du kyste hydatique est liée à :

- Son siège anatomique (sa localisation), sa taille et donc son effet de masse sur les organes adjacents;
- L'état du kyste hydatique;
- Sa rupture spontanée ou traumatique;
- Son extension secondaire;
- La libération d'antigènes parasites responsables d'une réaction d'hypersensibilité systémique (Zeghir-bouteldja, 2018).

I.7.2. Les localisations du kyste hydatique

I.7.2.1. La localisation hépatique

La localisation hépatique est la plus fréquente environ 76% concernant le kyste hydatique. Les symptômes varient selon la situation dans le foie, la taille et le caractère hermétique ou fissuré du kyste. Les symptômes cliniques sont très tardifs (plusieurs années) par rapport à l'installation du scolex dans le foie (**Bourée et Bisaro, 2007**). Elle est le plus souvent symptomatique, révélée par des signes indirects secondaires à des compressions de voisinages telles que : ictère, hypertension, nausées... (**Carmoi et al., 2008**).

I.7.2.2. La localisation pulmonaire

La localisation pulmonaire du kyste hydatique vient au deuxième rang des localisations viscérales après la localisation hépatique (**Yucel et al., 2016**) avec une fréquence de 15%. Elle est primitive ou secondaire, la latence clinique est moins longue (**Eckret et al., 2001; Aubry, 2013**). Le plus souvent asymptomatique, elle peut se révéler par une toux, une douleur thoracique, une hémoptysie (phase primitive) (**Bourée et Bisaro, 2007**).

I.7.2.3. Les localisations rares

D'autres localisations sont possibles mais nettement plus rares, telles que le pancréas, le diaphragme, le petit bassin, le sein, l'orbite (provoquant une exophtalmie), la thyroïde, la langue ou encore le thymus révélées par des douleurs et des troubles (**Bourée et Bisaro, 2007**).

I.8. Diagnostic de l'échinococcose kystique

Le diagnostic définitif pour la plupart des cas de l'échinococcose kystique se fait par des méthodes d'imagerie, tels que la radiologie, l'échographie, la tomographie d'axiale calculée (scanner) et l'imagerie de résonance magnétique.

L'immunodiagnostic est utile non seulement dans le diagnostic mais aussi pour le suivi des patients après chirurgie ou suite à un traitement pharmacologique. La détection de la circulation des antigènes d'*E granulosus* dans le sérum sont moins sensibles que la détection d'anticorps, qui reste la méthode de choix. Les méthodes immunologiques les plus utilisées ELISA, dosage indirect des anticorps anti-hémagglutination, le test d'agglutination de latex, et

le test immunoblot. Le test d'immunofluorescence des anticorps et arc immunoélectrophorèse sont également utilisés. Les antigènes de kyste hydatique tels que le liquide hydatique constituent la source habituelle du matériel antigénique utile dans l'immunodiagnostic. En outre, l'antigène des lipoprotéines B et l'antigène 5 sont les antigènes majoritaires du liquide hydatique. Ils sont largement utilisés dans les tests d'immunodiagnostic d'échinococcose kystique. Le gène codant pour l'antigène 5 a été cloné et il pourrait être lié étroitement aux protéases de la famille de la trypsine (McManus et Zhang, 2003).

I.9. Réponse immune de l'hôte

La survie prolongée d'*E. granulosus* à l'état de kyste dans l'organisme indique l'existence de mécanismes lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire humorale et cellulaire. L'établissement du kyste hydatique dépend à la fois de phénomènes immunitaires protecteurs et du parasite. Les molécules libérées localement par le protoscolex et le kyste sont particulièrement sensibles aux macrophages. La réponse immunologique serait plus faible au poumon qu'au foie.

Le chien acquiert un certain degré d'immunité qui limite la réinfestation, l'apparition de nouveaux strobiles et la formation de nouveaux kystes. Les kystes présents ne sont pas détruits.

Chez l'homme, il existe une production d'anticorps qui ne semble pas intervenir dans la défense de l'organisme. L'hydatidose induit une éosinophilie et la production d'un taux élevé d'anticorps, principalement d'IgG de sous-classe 4 et d'IgE. Les cytokines interviennent dans la relation hôte-parasite par une production significative d'interleukines telles que l'IL-4 et, dans une moindre mesure, d'autres cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, et l'interféron-gamma (l'IFN- γ)). Les caractéristiques structurelles du périkyste, le nombre, la taille et la localisation du kyste dans le foie conditionnent la production d'IL-1, d'IL-2 et d'IL-4, alors que la production de *tumor necrosis factor* (TNF- α) est abaissée lors de fistule biliaire.

Les lymphocytes T helper (Th1 et Th2) régulent la réponse immune. La susceptibilité à la maladie est liée à une forte réponse Th2 alors que la réponse de type Th1 est protectrice (Torcal et al., 1996 ; Touil-boukoffa et al., 1998).

I.10. Traitement de l'échinococcose kystique

Le traitement radical de l'hydatidose nécessite l'ablation du kyste, en sachant que la séparation entre l'adventice et la membrane anhiste est très facile. Les techniques varient selon la localisation la taille et le nombre de kystes: périkystectomie totale ou partielle (**Bourée et Bisaro, 2007**).

Une méthode peut être utilisée dans certains cas : ponction-aspiration-injection réaspiration (ou PAIR) consistant à ponctionner un peu de liquide puis à réinjecter du sérum hypertonique qui détruit les scolex et qui est ensuite réaspiré. Après intervention chirurgicale, une surveillance sérologique est indispensable pendant plusieurs mois afin de vérifier la disparition des anticorps. En cas d'hydatidoses multiples, voire inopérables, un traitement médical a été proposé par le mébendazole puis par le flubendazole. Il est réalisé actuellement par l'albendazole (400 à 800 mg/ jour) pendant plusieurs mois ou années, parfois associé au praziquantel. La dose est plus élevée chez les sujets immunodéprimés. Le traitement est d'autant plus efficace que les kystes sont jeunes et petits (**Bourée et Bisaro, 2007**).

Depuis 1996 à ce jour, le 27^{ème} congrès mondial de l'échinococcose a été organisé conjointement avec l'organisation mondiale de la santé (OMS) en Algérie, à l'issue de cette rencontre, le traitement médical (Albendazole) sera préconisé prochainement et autorisé en vente en Algérie (**Zeghir-bouteldja, 2018**).

I.11. Prophylaxie

La lutte contre l'hydatidose ne peut se concevoir sans la mise en place de mesures de contrôle et de prophylaxie adaptées au contexte local ou régional concerné. Elle doit associer des programmes d'éducation sanitaire des populations exposées particulièrement quant au respect des règles d'hygiène alimentaire et à la gestion des viscères parasités, une législation rigoureuse contre l'abattage non contrôlé, la limitation des populations de chiens errants et le dépistage et traitement des chiens parasités. La vaccination du cheptel reste du domaine de la recherche malgré des avancées concrètes (**wejih et al., 2017**).

Chapitre II : le monoxyde d'azote

Plusieurs travaux de recherche rapportent l'importance du rôle du radical NO dans des processus physiologiques très variés. La découverte du premier rôle biologique du monoxyde d'azote (NO) a été initiée par Ferid Murad en 1976. Sa découverte dans le système cardiovasculaire a valu le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1998 aux chercheurs Robert Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad (**Zeghir-bouteldja, 2018**).

II.1. Définition de monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote est un radical libre d'origine endogène (**Eric et al., 1999**), constitué d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène liés par une double liaison.

Dans les conditions normales de température et de pression, se présente sous forme gazeuse (**Nicolas et al., 1998**).

Il est produit par une grande variété de cellules chez les mammifères dont les cellules endothéliales, les cellules neuronales, les cellules musculaires lisses, les macrophage, les polynucléaires neutrophiles, les plaquettes, les fibroblastes et les hépatocytes, (**Éric et al., 1999**). Il est rapidement oxydé en nitrite (**Nicolas et al., 1998**).

II.2. Propriétés physicochimiques de monoxyde d'azote

Le NO est un radical libre et lipophile. Il diffuse librement à travers les membranes cellulaires (**Zeghir-bouteldja, 2018**). Ce dernier est un composé gazeux incolore, inodore, peu soluble dans l'eau, inflammable mais comburant. C'est un composé instable du fait de sa structure électronique (**Girard et al., 1997**). Ainsi il est susceptible de réagir avec de nombreuses protéines et enzymes, notamment via leurs cofacteurs métalliques (nitrosylation) ou leurs résidus cystéine (nitrosation) (**Parent et al., 2013**). Il peut réagir avec les différents radicaux libres, certains acides aminés, certains ions métalliques, comme il peut réagir rapidement avec l'ion super-oxyde O_2^- pour former l'ion peroxyde $ONOO^-$, connu par sa toxicité (**Nicolas et al., 1998**).

Sa demi-vie *in vivo* est d'environ 10 secondes. Sa faible solubilité aqueuse conduit à la formation de nitrites (NO_2^-) et de nitrates (NO_3^-) dont le dosage permet d'évaluer la quantité de NO en solution.

En solution aqueuse, le NO réagit rapidement avec l'oxygène formant le trioxyde d'azote (N₂O₃), rapidement décomposé en ion nitrosonium (NO⁺) et nitrite (Zeghir-bouteldja, 2018).

II.3. La biosynthèse de NO

Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal chimiquement équivalents du groupement guanidine de la L-arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O₂), d'autre part. L'autre produit de synthèse, formé de manière stœchiométrique avec le NO, est la L-citrulline. La réaction de biosynthèse du NO et de la L-citrulline à partir de la L-arginine et de l'O₂ est sous la dépendance d'une famille d'enzymes, les NO synthases (NOS) (Figure 05) (Dinh-xuan et al., 1998).

La réaction L-arginine-NO est NADPH dépendante, nécessite de l'oxygène et de nombreux cofacteurs en particulier des flavines, des thiols et la tétrahydrobioptérine (Girard et al., 1997).

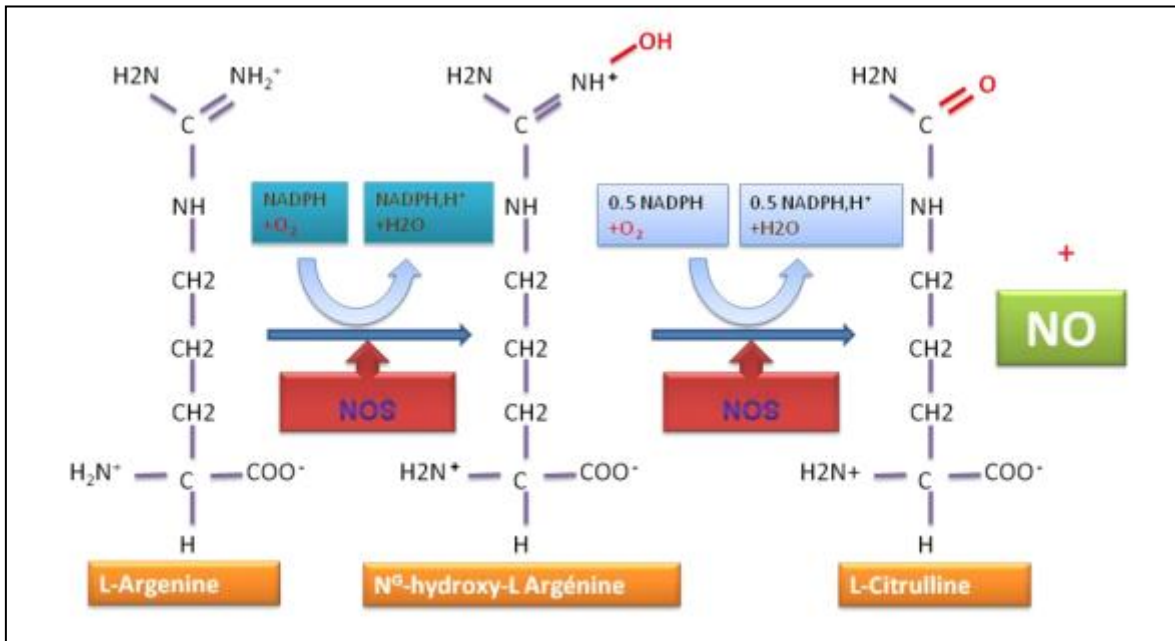


Figure 05: mécanisme de biosynthèse de NO (Wei et al., 2003).

II.4. Les isoformes des NO synthases

Il existe au moins trois isoformes pour lesquelles les ADN complémentaires ont été clonés (**Tableau 01**) (**Dinh-xuan et al., 1998**). Ces trois isoformes codées par trois gènes distincts localisés sur les chromosomes 12, 17 et 7 codant respectivement pour les NOS I, II et III (**Ghafari et Labarde, 2003**), différent entre elles par leurs fonctions et leurs caractéristiques biochimiques. Les isoformes présentes dans les cellules endothéliales (NOS III), d'une part, et les cellules nerveuses (NOS I), d'autre part, appartiennent à la famille de NOS constitutives, tandis que l'isoforme macrophagique (NOS II) appartient à la famille de NOS inductible.

Bien que normalement présente dans la cellule (endothéliale ou neuronale), l'isoforme constitutive de la NOS n'est pas active en l'absence d'une augmentation transitoire du calcium intracellulaire et de l'activation de la calmoduline qui en résulte.

L'activité de la NOS inductible est responsable d'une synthèse du NO beaucoup plus importante par rapport à la production physiologique provenant de l'activité de la NOS constitutive. Cependant, la classification actuelle concernant les NOS constitutive et inductible semble inadéquate dans des cellules qui, comme les cellules épithéliales bronchiques et nasales, expriment de façon quasi permanente la NOS inductible. L'expression constitutive de la NOS inductible serait due à la situation particulière de ces cellules qui sont constamment exposées à des aéro-contaminants et à divers stimulus pro-inflammatoires d'origine atmosphérique. Il est probable que l'expression de la NOS inductible puisse, dans ce cas, être bénéfique dans la mesure où le NO ainsi produit participe à la défense immunitaire non spécifique des voies aériennes (**Dinh-xuan et al., 1998**).

Tableau 01 : Les trois principales isoformes des N O synthases (**Dinh-xuan et al., 1998**).

Isoformes	Neuronale (NOS 1)	Inductible (NOS 2)	Endothéliale (NOS 3)
Activité	Constitutive	Inductible	Constitutive
Localisation chromosomique du gène	12q24.2	17cen-q12	7q35-36
Masse moléculaire de la protéine	150 kDa	130 kDa	135 kDa
Fonction du produit NO	Neurotransmission	Bactéricidie Tumoricidie	Vasodilatation
Cofacteurs Ca ⁺⁺ / Calmoduline	Dépendante	Indépendante	Dépendante
Effecteurs membranaires	Acides aminés neuroexcitateurs	LPS, IL-TNF α , etc.	Acétylcholine, Bradykinine, etc.

II.5. Métabolisme et mécanisme d'action cellulaire de NO

L'activité de la NOS inductible (NOS_i) est réglée au niveau transcriptionnel. Les cytokines sont de puissants inducteurs de NOS_i dans divers types cellulaires, alors que les glucocorticoïdes, les interleukines 4 et 10 et le facteur β de croissance tumorale (TGF-P) inhibent la production de NO. Dans la plupart des cellules, et en particulier dans les ostéoblastes humains, l'association de plusieurs cytokines active NOS_i plus intensément que ne le ferait séparément chaque peptide (**Barlet et al., 1999**).

Le NO active la guanylate cyclase soluble de la cellule musculaire lisse et augmente la concentration intracellulaire d'un second messenger, le guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (**Thebaud et Mercier, 1997**). Le GMPc, en activant une protéine-kinase, stimule

l'AMPc calcium-dépendant. Il en résulte une sortie de calcium à travers le sarcolemme du muscle vasculaire lisse (**Moutafis, 1996**).

NO peut également réagir avec des radicaux libres tels que le radical superoxyde et provoquer la formation d'éléments dont la toxicité contribue aux dommages cellulaires caractéristiques de la réponse inflammatoire. De plus, les interactions NO-radicaux libres participent vraisemblablement au contrôle de l'activité oséoclastique. En effet, le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène stimulent la résorption osseuse et, pendant celle-ci, les ostéoclastes produisent du peroxyde d'hydrogène (**Barlet et al., 1999**).

I.6. Les effets de NO

Les effets de NO sont variables, dans un même tissu, le NO peut être protecteur ou cytotoxique (**Berard, 1997**). La production de NO a des effets bénéfiques puis qu'il est impliqué dans la réponse immunitaire à une agression microbienne, les processus inflammatoires, le choc septique, la mort neuronale au cours de l'ischémie, certains mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire, de l'érection (**Griper et Lemaire, 1995**). Le NO a un effet cytotatique non spécifique sur les bactéries, les cellules tumorales et les parasites.

Cependant la stimulation de la production de NO peut également entraîner des effets délétères tels que la mort neuronale par l'effet cytotoxique provoquer par la production intense de NO. Dans le système immunitaire comme dans le neurone, selon la quantité produite, le NO va rester un messager intracellulaire ou diffuser (devenant messager intercellulaire) ou provoquer la mort de la cellule productrice (**Berard, 1997**).

Le monoxyde d'azote, joue un rôle soit proapoptotique, soit anti-apoptotique dans de nombreux types cellulaires (**Kolb, 2001**). Les effets pro-apoptotique du NO font intervenir sa possibilité de réagir avec l'anion superoxyde O_2^- pour générer du peroxynitrite $ONOO^-$ ont également été impliquées (**Blibek, 2009**).

II.7. NO et système immunitaire

Les cellules dans lesquelles la NO synthase de type II peut être induite par des cytokines et des micro-organismes émettent de façon continue et soutenue du monoxyde d'azote (**Griper et Lemaire, 1995**). Le NO produit par les NOS II, joue par conséquent un rôle important dans la régulation, l'initiation et le développement des mécanismes de défense immunitaire de l'hôte (**Dugas et al., 1998**). Le flux de NO ainsi produit exerce dans la cellule émettrice et dans son environnement une action antivirale, antibactérienne et antiparasitaire.

Au voisinage de la cellule productrice, ce flux est suffisant pour bloquer la prolifération de cellules tumorales mais aussi de lymphocytes T activés (**Gripel et Lemaire, 1995**).

II.8. La cytotoxicité de monoxyde d'azote

Le peroxy-nitrite (ONOO^-) est un oxydant biologique puissant, formé à partir d'une réaction de diffusion limitée extrêmement rapide entre deux radicaux libres l'anion superoxyde (O_2^-) et le monoxyde d'azote (NO). Ce dernier est largement connu comme un important messager intercellulaire dans les systèmes cardiovasculaire et nerveux ou dans les réactions immunologiques. Le peroxy-nitrite induit plusieurs effets cytotoxiques incluant la peroxydation lipidique, la nitration des protéines et leur oxydation, l'altération oxydative de l'ADN, l'activation des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire ainsi que l'inactivation de nombreuses enzymes. Il en résulte un dysfonctionnement dans différents processus cellulaires et l'induction de la mort cellulaire par apoptose et nécrose, selon les taux de peroxy-nitrite (**Lahmar-Belguendouz et al., 2013**).

La cytotoxicité du NO est en majeure partie due à l'inhibition d'enzymes impliquées soit dans la respiration mitochondriale soit dans la réplication de l'ADN. Compte tenu des relations existant entre les processus inflammatoires et le radical NO, il semble donc nécessaire de quantifier la production du NO dans les voies aériennes des sujets ayant une inflammation bronchique aiguë et / ou chronique (**Dinh-xuan et al., 1998**).

Notre travail a porté sur l'étude histologique des fragments pulmonaires de bovin atteints d'échinococcose kystique dont le but est d'étudier l'effet du peroxy-nitrite sur la viabilité de l'hydatide et les différents changements physiopathologiques sur un organe infecté par la larve hydatique. Par une observation microscopique après réalisation des coupes histologiques et coloration.

III.1. Matériel

Pour la réalisation de cette étude, nous avons eu à utiliser, d'une part, le matériel ayant servi pour les activités menées aux abattoirs (Réalisation des prélèvements), et d'autre part, le matériel nécessaire pour la réalisation des coupes histologiques effectuées au sein du laboratoire d'anatomopathologie de l'établissement hospitalier Mohamed Boudiaf de la wilaya de Bouira, et de biochimie au niveau des laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre (FSNVST) de l'université Akli Mohand Oulhadj (UAMOB) De la wilaya de Bouira

III.1.1. Matériel biologique

III.1.1.1. Kystes hydatiques

Les kystes hydatiques pulmonaires ont été obtenus à partir des bovins atteints l'échinococcose hydatique au niveau de l'abattoir d'Ain Bassam. Les kystes hydatiques sont collectés dans des conditions stériles rincés à l'eau physiologique et conservés à +4°C.

III.1.1.2. Les biopsies

Les biopsies sont prélevées à partir des poumons de bovins atteints l'hydatidose et sont fixées dans du formaldéhyde 4%.

III.1.1.3. Le milieu de culture

Le milieu utilisé dans nos expériences est le milieu DMEM enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté à +56°C pendant 30 minutes et complémenté avec 1mg/ml de L-Glutamin, de 300 mg/ml de Tricine pH 7.4 et 2 Mm et d'un mélange d'antibiotiques (40 mg/l de Gentalline et 200.000 unités/l de Péniciline. Il est utilisé pour la culture des membranes kystiques.

III.1.2. Matériel non biologique

III.1.2.1. Appareillages et équipements

Les appareils et l'équipement utilisée au cours de notre expérimentation est résumé dans le tableau 02.

Tableau 02: Appareillages et équipements

Appareillages	Marques
Spectrophotomètre	OPTIZEN 3220UV ®
Autoclave	WiseClave ®
Haut aspirante	KUGEL medical ®
Balance de précision	AR124CN OHAUS® ADVenturer
Haut à flux laminaire	CRuma Fl-2 ®
Haut chimique	Chemcap™®
Etuve à 37°C	Venticell ®
Automate de déshydratation (autotechnicum)	Leica ®
Appareil d'enrobage	Leica EG 1160 ®
Microtome	LEiCARM 2125RT ®
Bain-marie 45°C	Leica HI 1210 ®
Plaquette chauffante à 75°C	Leica HI 1220 ®
Microscope optique	KONUS ®

III.1.2.2. Accessoires et verreries

- Micropipettes à volume variable (20µl, 100µl, 1000µl) ;
- Trousse de dissection ;
- Lame et lamelle ;
- Cuve de spectrophotomètre ;
- Fioles ;
- Bec benzène (alimentation gaz) ;
- Bechers ;
- Eppendorfs ;
- Erlenmeyers.

III.1.2.3. Réactifs

- Formaldéhyde à 4% et 10% ;
- Acide chlorhydrique (HCl) ;
- Chlorure de sodium (NaCl) ;
- Phosphate de potassium (KH_2PO_4) ;
- Hydroxyde de sodium (NaOH) ;
- Nitrite de Na (NaNO_2) ;
- Eau oxygéné (H_2O_2) ;
- Eau physiologique ;
- Eau distillée ;
- Xylène ;
- Alcool absolu ;
- Paraffine ;
- Hématoxyline ;
- Eosine à 10% ;
- Baume de canada : Eukitt.
- l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3)

III.2. Méthodes

La démarche expérimentale suivie au cours de notre travail est résumée dans la **figure 07**.

III.2.1. Synthèse d'une solution de peroxyxynitrite par la méthode du «quench flow»

Cette méthode nécessite une solution d'eau oxygénée (0.6M) dans HCl 0.7M et une deuxième solution de nitrite de sodium (0.6M) (**Annexe 1**). Ces solutions sont pompées et mélangées au niveau d'une jonction (T). La réaction de l'acide nitreux avec le peroxyde d'hydrogène conduit à la formation de l'acide peroxyxynitreux. Une solution aqueuse de soude NaOH (1.5M) est additionnée rapidement (**Figure 06**).

La solution du peroxyxynitrite synthétisée est récupérée dans une fiole sur un mélange de glace et de sel pour conserver la solution qui est plus stable à des températures inférieures à 0°C.

La concentration est déterminée par la loi de Beer Lambert :

$$A = L.C. \epsilon$$

Sachant que : $\lambda_{\max} = 320 \text{ nm}$, le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

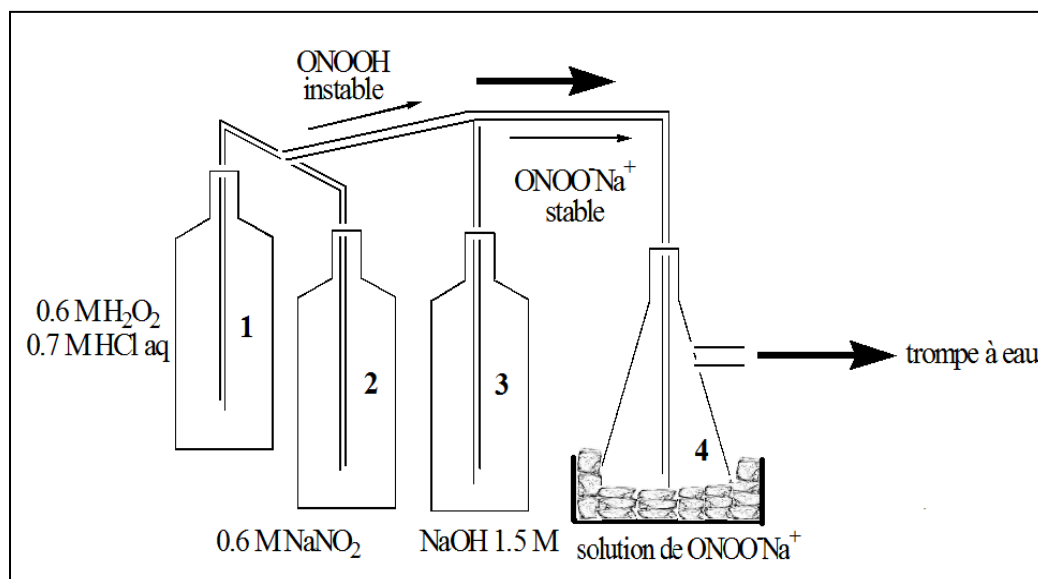


Figure 06: Protocole de synthèse du peroxynitrite par la méthode du « quench flow ».

Afin d'éviter les interférences avec les nitrites, une DO corrigée est déterminée en mesurant l'absorbance de la solution préparée qui est DO_{SOL} et la $DO_{sol+kH_2PO_4}$ qui correspond à la densité optique de la solution du peroxynitrite après addition de 100mM de phosphate de potassium pH 7,4.

$$Do \text{ corrigée} = DO_{SOL} - DO_{sol + kH_2PO_4}$$

La solution du peroxynitrite est filtrée et stockée à -70°C .

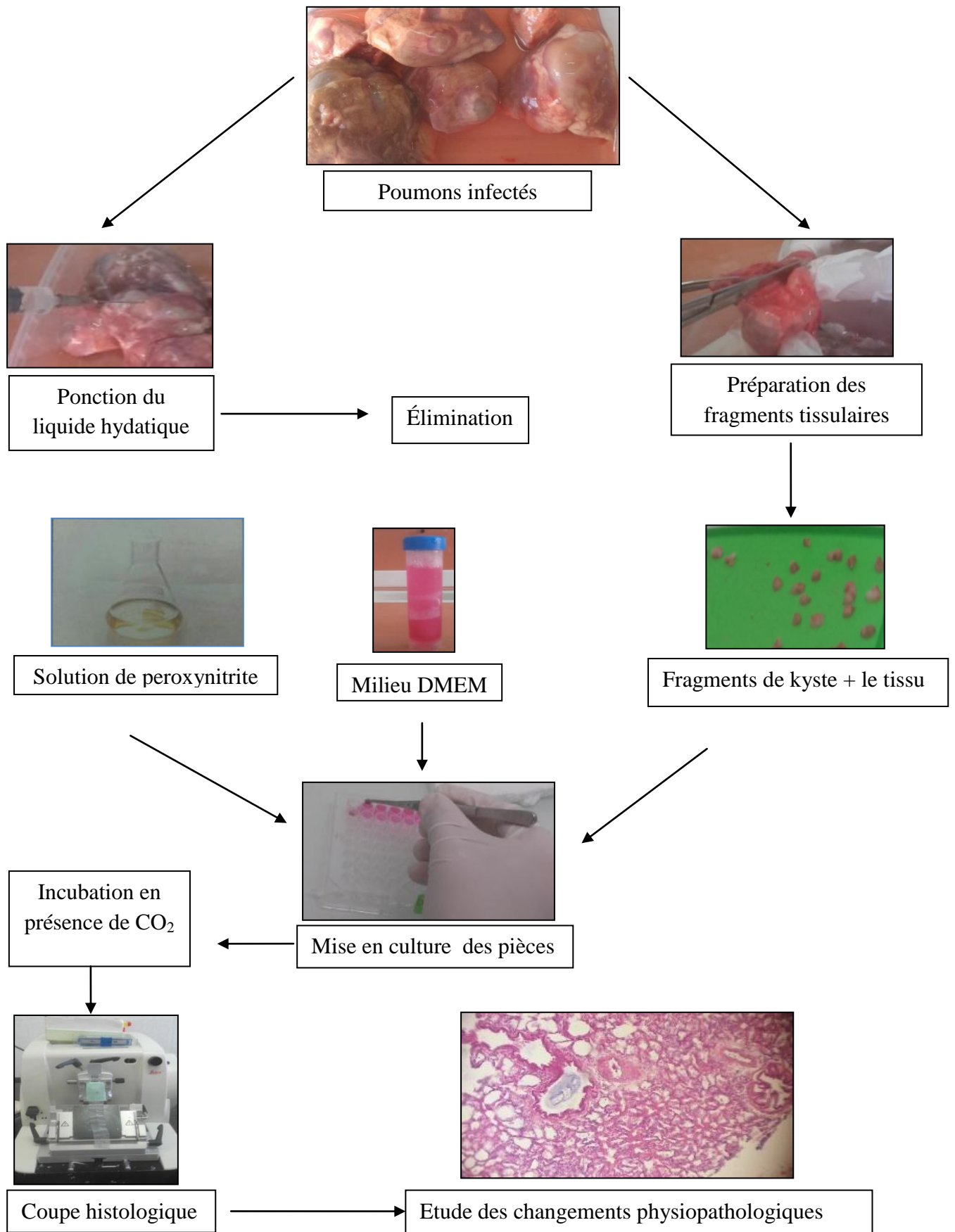


Figure 07: La démarche expérimentale (Photographie originale).

III.2.2. Obtention des membranes kystiques d'*Echinococcus granulosus*

Les tissus qui contiennent les kystes hydatiques ont été rincés avec l'eau physiologique pour éliminer l'excès de sang, elles sont coupées sous haute à flux laminaire en petites fragments de 0.5cm (**figure 08**) qui présentent les pièces de membranes (germinative et laminaire).

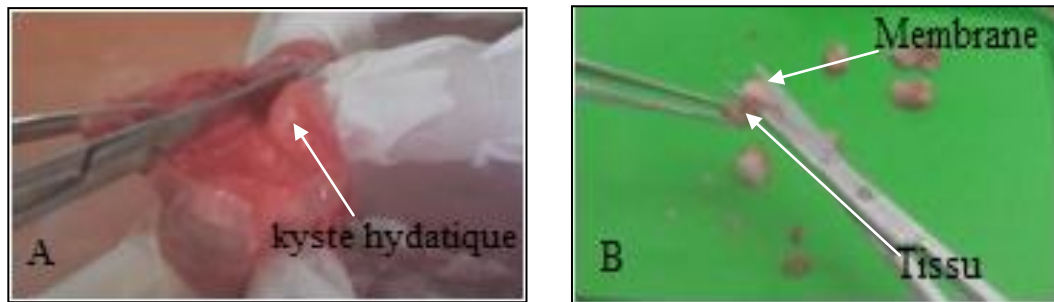


Figure 08 : Image d'un poumon infecté par un kyste hydatique(A), réalisation des coupes macroscopiques (B) (Photographie originale).

III.2.3. La mise en culture des pièces de membrane

Les microplaques ont été remplies avec différents volumes de milieu DMEM (366-395µl) et la solution de peroxy-nitrite (4-30µl), avec deux puits témoins pour faire la comparaison (**Annexe 2**). Les pièces de membranes ont été mises en culture dans les puits (**Figure 09**).

Les cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide saturée avec 5% de CO₂ en présence de différentes concentrations croissante de peroxy-nitrite (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,80µM) pendant 24 heures, 48 heures et 72 heures. Afin de testée l'action des dérivés du NO sur les membranes kystiques.

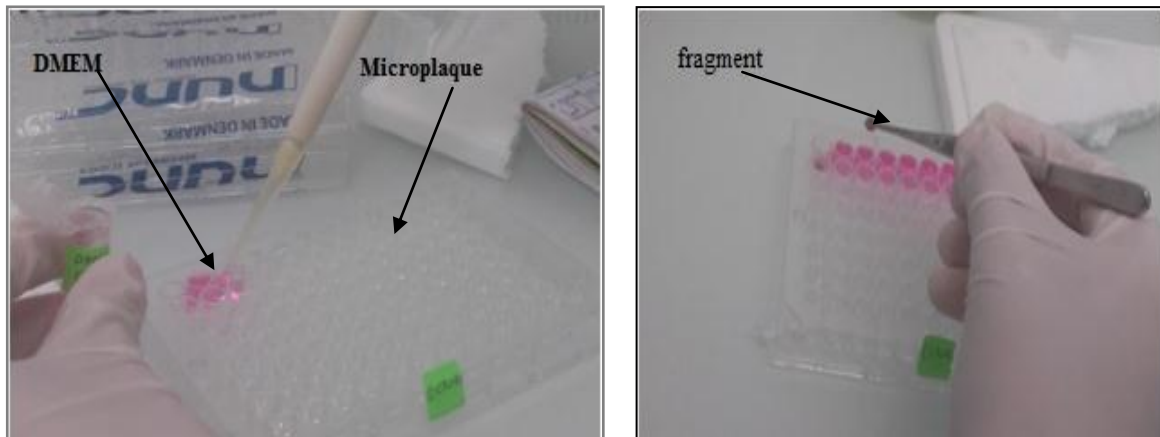


Figure 09 : Image de la mise en culture des pièces de membrane dans le milieu DMEM (Photographie originale).

III.2.4. Technique de préparation des coupes histologiques

La préparation des coupes fines a été réalisée effectuée selon différentes étapes de techniques histologiques (HOULD, 1999). Ces étapes sont les suivantes :

- Réalisation des coupes et éventuellement fixation des prélèvements ;
- Déshydratation ;
- Inclusion en paraffine (Enrobage) ;
- Coupe de bloc de paraffine ;
- Coloration manuelle à l'Hémalun-Eosine ;
- Montage lame et lamelle ;
- Observation en microscope (lecteur et interprétation).

III.2.4.1. La fixation des pièces dans le formaldéhyde

L'étape consiste à mettre les pièces de membranes après la culture dans des flacons contenant 1 ml de formaldéhyde à 4% pendant 24 à 48 heures afin de mieux fixer et conserver les échantillons. Après enregistrement et étiquetage des échantillons, dès leur réception au laboratoire d'anatomopathologie de l'établissement hospitalier Mohamad Boudiaf de Bouira. Sous haute aspirante, les fragments sont placés dans des cassettes en plastique, qui comportent les numéros d'identification pour chaque prélèvement. Ces cassettes ont été placées dans un bain remplis de formaldéhyde à 10% puis sont lavées à l'eau courante pour

éliminer l'excès du formaldéhyde (**Figure 10**). Ces échantillons feront l'objet d'étude histologique.

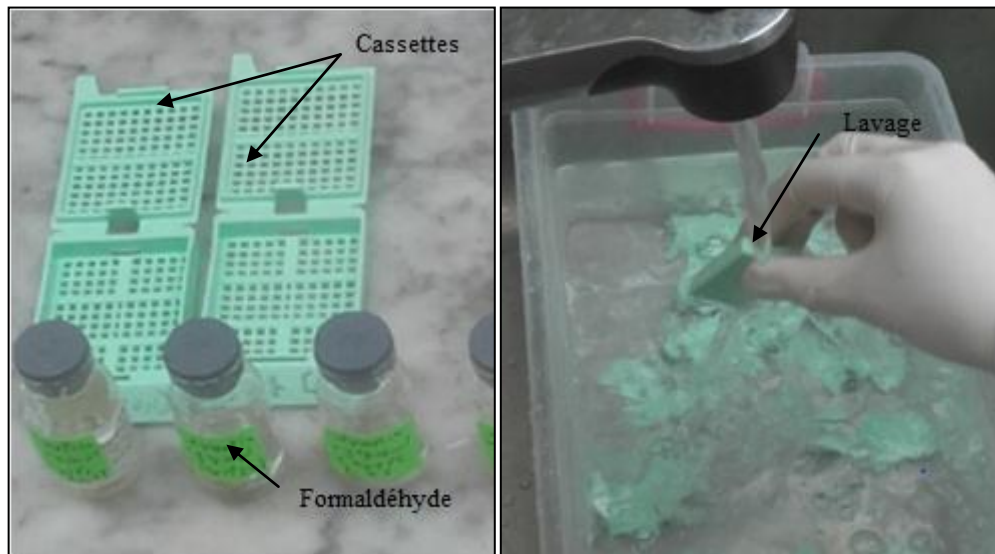


Figure10: Image de la fixation des pièces dans le formaldéhyde (photographie originale).

III.2.4.2. Déshydratation et éclaircissement

La déshydratation est une opération qui permet d'éliminer l'eau contenue dans le tissu, l'opération doit être progressive pour que la substitution n'entraîne pas de déformation des tissus. Elle comporte une série de bain d'alcool avec des concentrations d'ordre croissant qui se déroulent dans un appareil à circulation automatique (Lieca®) (**Figure 11**) et qui assure une agitation continue des paniers contenant les cassettes. Il s'agit d'un appareil à bain multiples. Disposé en cercle, le panier contenant les tissus est suspendu à un système mobile qui le transporte d'un bain à l'autre selon un programme prédéterminé. Le système de transport est construit de telle manière que le panier subisse une agitation pendant toute l'opération qui dure 22 heures (**Tableau 03**).



Figure 11:Automate de déshydratation (Leica®) (photographie originale).

Tableau 3 : Etapes de déshydratation.

Etapes	Opération	Bains	Durée
1	Fixation	Formol 10%	Quelques minutes
2	Poste-lavage	Eau courante	passage
3	Déshydratation	Alcool à 50 %	2 heures
4		Alcool à 70%	2 heures
5		Alcool à 90%	2 heures
6		Alcool à 100%	2 heures
7		Alcool à 100%	2 heures
8		Alcool à 100%	2 heures
9		Alcool à 100%	2 heures
10	Eclaircissement	Xylène	2 heures
11		Xylène	2 heures
12	Imprégnation	Paraffine	1 heure 30 minutes
13		Paraffine	1 heure 30 minutes

III.2.4.3. Inclusion en paraffine (enrobage)

Les échantillons déshydratés sont inclus dans la paraffine dans des moules en inox. Cette étape permet une solidification de l'échantillon par leur polymérisation. On place les molécules d'eau initiales, par la paraffine qui est liquide à 60°C et dure à la température ambiante. Elle est soluble dans les solvants cités précédemment donc cela permettra sa

pénétration dans les tissus. Les moules sont laissés pour refroidir sur une plaque de refroidissement (**Figure 12**) et ensuite les blocs sont démoulées, on obtient un bloc qui pourra être correctement coupé. Ces blocs servent aussi de moyen de stockage des échantillons.

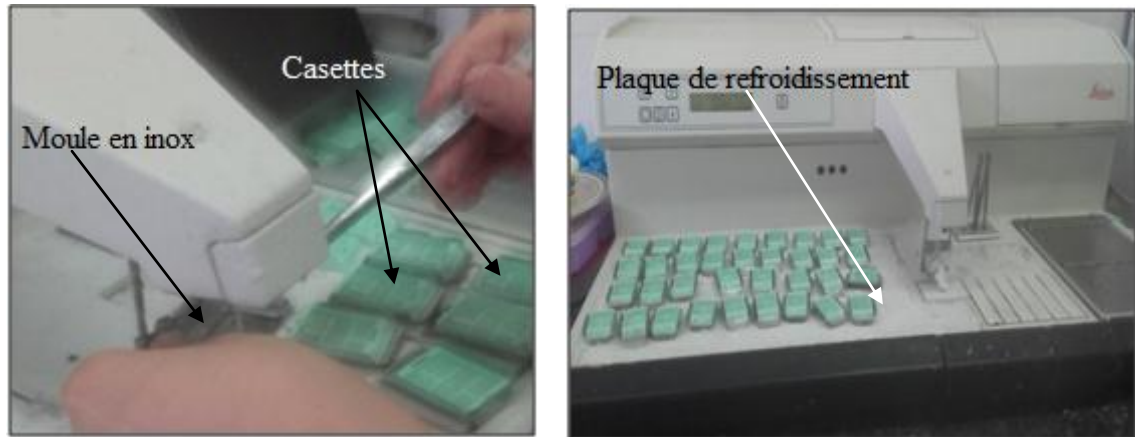


Figure12 : Inclusion en paraffine (photographie originale).

III.2.4.4. La réalisation des coupes histologiques

Les coupes histologiques se font à l'aide d'un appareil, microtome (Leica®). Les blocs sont placés selon la position de la lame du microtome. Le procédé débute par un dégrossissement à partir de 20 à 50 μm puis faire réduire progressivement l'épaisseur jusqu'à atteindre 3 μm . En fin on obtiendra un ruban (**Figure 13**).

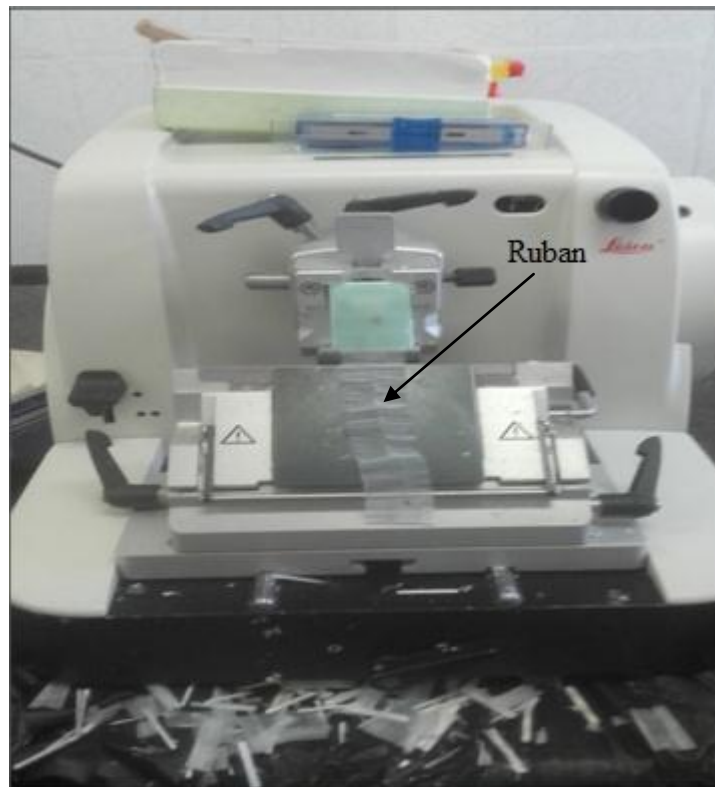


Figure13: Réalisation des coupes histologiques (photographie originale).

III.2.4.5. Etalement, collage et séchage

Après avoir réalisé les coupes, elles sont mises dans un bain marie à une température de 45°C qui permet d'effectuer un bon étalement des coupes, sans replis, sur les lames porte objet. Ensuite, les lames sont séchées et collées pendant 15 min sur une plaque chauffante à 75°C (**Figure 14**).



Figure14: Etalement, collage et séchage (photographie originale).

III.2.4.6. Déparaffinage et réhydratation

Il s'agit du passage des lames dans deux bains de xylène pendant 15 min pour chacun, puis un passage dans des bains d'alcool avec des concentrations décroissantes 100%, 90%, 70% pendant 3 min pour chaque bain, après en rince dans un bain d'eau (**Figure 15**).

III.2.4.7. Coloration et montage

Les lames sont colorées à l'hématoxyline pendant 50 sec puis rincer avec de l'eau courante jusqu'à la disparition de couleur. Plonger les lames 1 min et 40 sec dans un bain d'éosine, rincer avec de l'eau distillée pendant 1 min. les lames sont réhydratées par passage dans des bains d'alcool avec des concentrations 90%, 100% pendant 1 min pour chacun, enfin en les mettre dans un bain de xylène (**Tableau 4**).

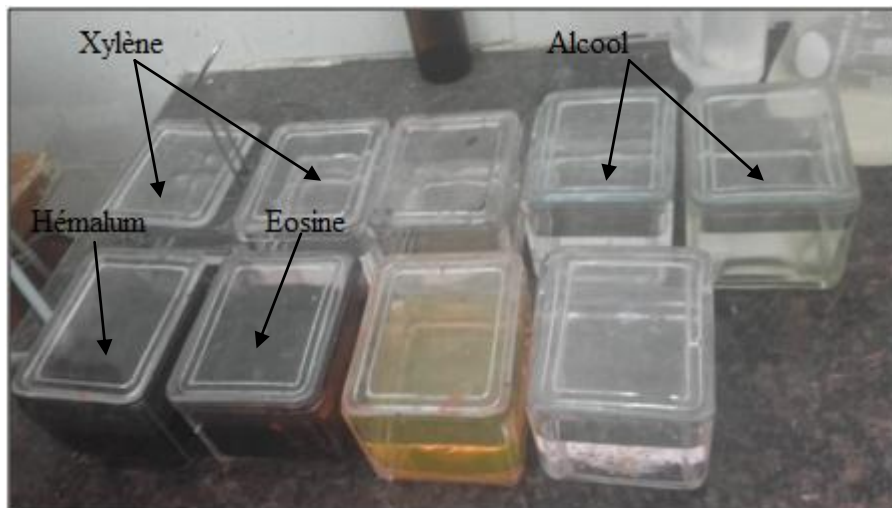


Figure15 : Déparaffinage et Coloration (photographie originale).

Le montage se fait classiquement entre lame et lamelle. Il consiste à déposer une goutte de colle (Eukit) sur une lamelle couvre-objet. Ensuite, les lames sont retirées du dernier bain de toluène et sont rapidement recouvertes par la lamelle. Les lames ainsi recouvertes de lamelle sont retournées ensuite rapidement tout en évitant d'inclure des bulles d'air entre les lames et les lamelles. L'ensemble est laissé à température ambiante afin de permettre la fixation des lamelles sur les lames (**Figure 16**).



Figure16 : Le montage (photographie originale).

Les lames sont donc prêtes pour être observées au microscope en vue d'un lecteur et d'une interprétation.

Tableau 04 : principales étapes de coloration à l'Hémalun-Eosine (HE).

Etapes			Milieu	Durée
01	Etapes de préparation à la coloration	Déparaffinage	Xylène	15Minutes
02			Xylène	15Minutes
03		Hydratation	Alcool à 100%	3 min
04			Alcool à 90%	3 min
05			Alcool à 70%	3 min
06			Eau courante	Passage
07	Etape de coloration proprement dit	Coloration	Hémalium	50secondes
08			Eau courante	Passage
09			Eosine	1minute et 40seconde
10			Eau distillée	1 min
11	Etape de préparation au montage	Déshydratation	Alcool 90%	1min
12			Alcool 100%	1min
13		Eclaircissement	Xylène	Passage

III.2.4.8. observation microscopique des coupes histologiques

L'observation des coupes vise essentiellement à décrire les changements microscopiques par une étude comparative avec des tissus sains témoins. L'interprétation des données recueillies permet d'établir un diagnostic histologique.

Les lames sont examinées au microscope optique (KONUS®) (**Figure 17**). Elles sont tout d'abord observées aux faibles grossissements (objectif 4) pour apprécier l'architecture des tissus pulmonaires, puis aux forts grossissements (objectifs 10) pour observer les détails du tissu examiné, permettant ainsi d'identifier les changements sur les coupes histologiques examinées.



Figure 17 : Observation des coupes histologiques au moyen d'un microscope optique (photographie originale).

IV.1. Résultats

IV.1.1. Obtention de la solution du peroxyinitrite

IV.1.1.1. Production du peroxyinitrite de sodium ($ONOO\text{Na}$)

Au cours de notre étude nous avons obtenu une solution de peroxyinitrite qui répond aux caractéristiques physicochimiques de la solution du peroxyinitrite synthétisée par la méthode du Quench flow. Ainsi nous avons obtenu une solution de couleur jaunâtre d'un pH alcalin (pH12) (**figure 18**).

La réaction de nitration par le peroxyinitrite a été testé sur les groupements phénoliques de la phénophtaléine permettent de mettre en évidence la réaction de nitration de la tyrosine *in vivo*.



Figure 18 : Solution de peroxyinitrite de couleur jaune produite par la méthode de «QuenchFlow » (photo originale).

Cette solution est rapidement congelée pour éviter la décomposition du peroxyinitrite en d'autres intermédiaires. Le peroxyinitrite à une demi- vie de 1.9 s à un pH neutre.

La concentration de la solution du peroxyinitrite tient compte de la dilution considérée pour le test dans du NaOH (0.3 M).

IV.1.1.2. Etude de la réaction de nitration par le peroxyinitrite

L'utilisation de la phénophtaléine, indicateur très largement utilisé dans les dosages acido-basiques, sa zone de virage de l'incolore au rose étant comprise entre pH 8.2 à 10 a permis de démontrer la capacité du peroxyinitrite à nitrater les composants phénoliques à pH neutre.

L'addition de quelques gouttes de phénophtaléine à 1% préparée dans l'Ethanol à la solution de peroxy-nitrite (de couleur jaune, pH alcalin) a entraîné le virage de la coloration vers le rose indiquant la forme déprotonée de l'indicateur (**Annexe 3**).

L'addition de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) donne une coloration jaune. La nitration est visualisée à pH 8,2 par la présentation de la coloration jaune. Dans ces conditions, le peroxy-nitrite se décompose en quelques secondes, l'apparition de la couleur jaune n'indique pas qu'il s'agit du peroxy-nitrite, sa persistance montre que l'indicateur a été nitraté (**Figure 19**).

La concentration du CO_2 à travers la mesure du HCO_3^- nous oriente sur la mesure de la nitration des phénols.



Solution de phénophtaléine.



Solution de peroxy-nitrite.



Apparition de couleur rose après addition de la phénophtaléine à 1 %.



Apparition de couleur jaune après addition de l'hydrogénocarbonate de sodium (NaCO_3)

Figure 19 : Mise en évidence de la réaction de nitration des groupements phénoliques de la phénophtaléine par le peroxy-nitrite (Photo originale).

IV.1.2. Examen macroscopique du poumon infesté de kystes hydatiques

L'observation des poumons infestés par le kyste hydatique à l'œil nu a montré que sa taille ainsi que sa forme sont modifiées et déformées en fonction du nombre et de la dimension des kystes (un seul kyste ou polykystique) (**Figure 20**). Ces organes présentent une hypertrophie. À la surface de l'organe, apparaissent plusieurs lésions à contour blanchâtre présentant une kyste rempli de liquide hydatique dans le cas d'un kyste superficiel, alors que d'autres étaient adhérents aux parenchymes pulmonaire et leur détection ne se fait que par palpation.

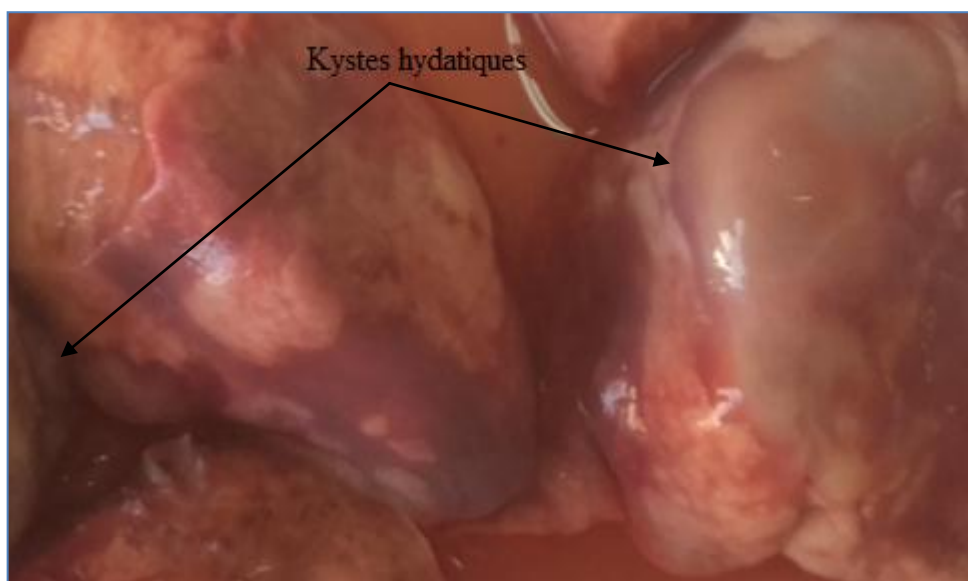


Figure 20 : Hydatidose pulmonaire d'origine bovine (photographie originale).

IV.1.3. Etude de l'effet *in vitro* du peroxy-nitrite sur les membranes du kyste hydatique

IV.1.3.1. Effet sur la membrane germinative adhérente à la membrane laminaire

Les premières modifications liées à l'action cytotoxique du peroxy-nitrite apparaissent progressivement après 36 heures d'incubation. Elles sont caractérisées par la perte de l'aspect lamellaire de la couche laminaire et un brunissement progressif traduisant un effet dégénératif sur la membrane (**Figure 21**).

L'étude *in vitro* de la cytotoxicité du peroxy-nitrite sur des pièces de membranes hydatiques (membrane germinative adhérente à la membrane laminaire) a montré un effet dégénératif du peroxy-nitrite à une concentration de 40 μM observé après incubation des cultures à 37°C dans une atmosphère humide saturée avec du CO_2 . L'intensité de l'action cytotoxique est caractérisée par un noircissement lié à l'altération de la membrane

germinative. Ces observations montrent que l'action cytotoxique dépend de la concentration en peroxy-nitrite et du temps d'exposition.

De plus, nous avons également observé des débris de la membrane germinative dans le milieu de culture indiquant des altérations affectant les membranes kystiques conduisant ainsi au détachement de la membrane germinative et de la couche laminaire.

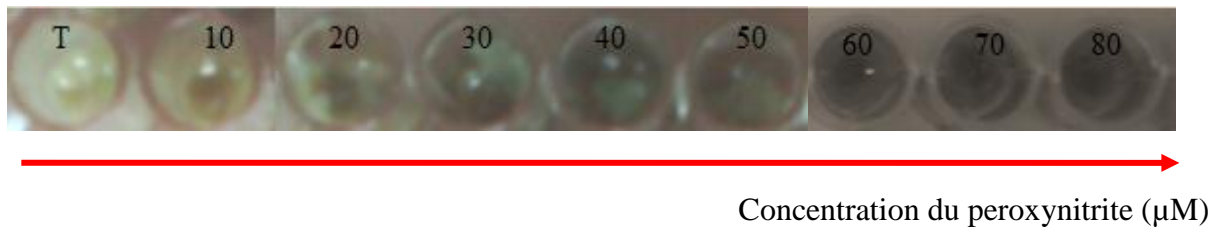
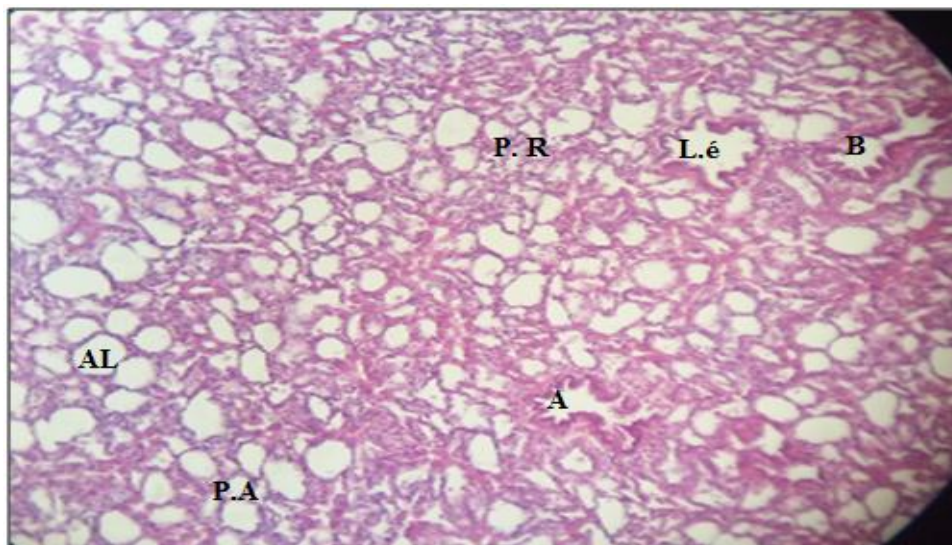


Figure 21 : Effet *in vitro* du peroxy-nitrite sur la couche laminaire présentant un brunissement en présence de différentes concentrations croissantes de peroxy-nitrite après 48 heures d'incubation à 37°C. **T:** Culture témoin.

IV.1.4. Etude histologique

IV.1.4.1. Tissu pulmonaire sain

L'observation microscopique des coupes histologiques du tissu pulmonaire sain (**Figure 22**) ont montré un parenchyme caractérisé par la présence d'alvéoles sous forme de cavités plus ou moins polygonales de diamètre variable.



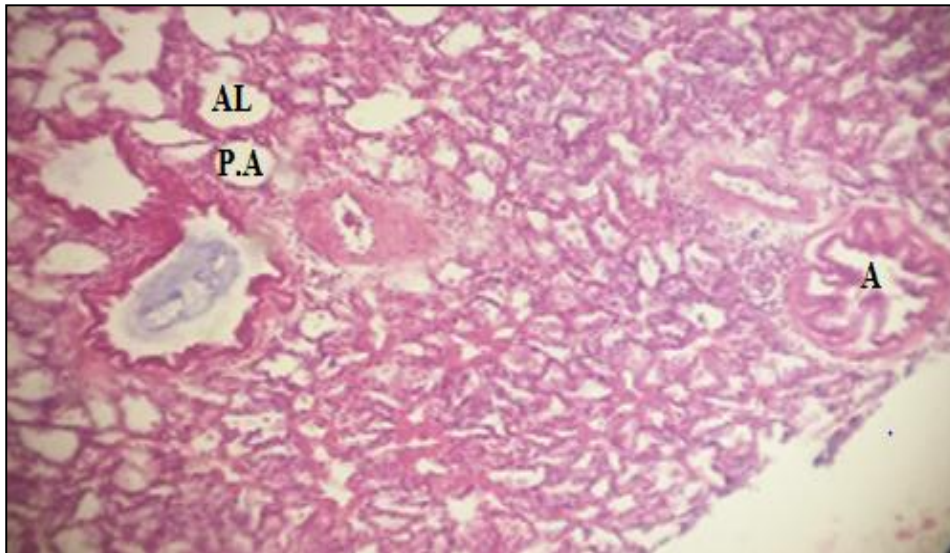


Figure 22: Coupe histologiques d'une biopsie d'un poumon sain d'un bovin observé au microscope optique après coloration à l'hématoxyline éosine GX10.

A : Artère ; **B :** Branche ; **AL :** Alvéole ; **L. é :** Lumière étoilé ; **P. R :** Parenchyme Remanié ; **P. A :** Paroi alvéolaire.

IV.1.4.2. Tissu pulmonaire affecté par la larve hydatique

Les observations microscopiques des coupes histologiques ont montré une altération du tissu pulmonaire avoisinant le kyste hydatique caractérisée par l'instauration d'une réaction inflammatoire dans la zone péri-kystique.

La présence de la larve hydatique a provoqué une compression du parenchyme pulmonaire traduit par la réduction de l'espace alvéolaire (**Figure 23**).

L'observation microscopique de la larve hydatique est constituée de deux couches, une membrane interne germinale cellulaire très riche en noyaux et une couche externe laminaire stratifiée constituée de plusieurs lamelles concentriques, ces deux couches sont accolées l'une à l'autre.

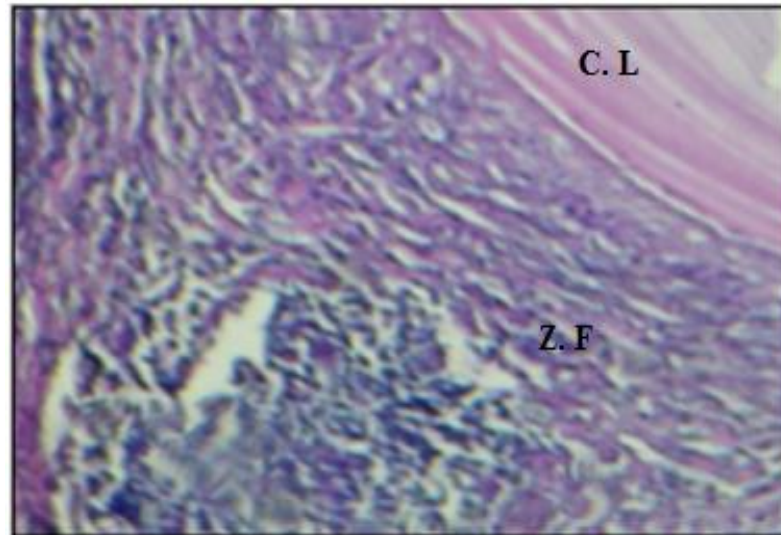


Figure 23 : Tissu pulmonaire affecté par la larve hydatique observé au microscope optique après coloration à l'hématoxyline éosine GX10.

C. L : Couche laminaire

Z. F : Zone fibreuse

IV.1.4.3. Etude des effets cytotoxiques *in vitro* du peroxy-nitrite

- Aune concentration de 10 μ M

Nous avons observé un effet direct du peroxy-nitrite sur l'intégrité des membranes kystiques (**Figure 24**) caractérisé par une altération des tissus traduit par une perte de la structure lamellaire de la couche laminaire avec une modification d'espace intra-alvéolaire.

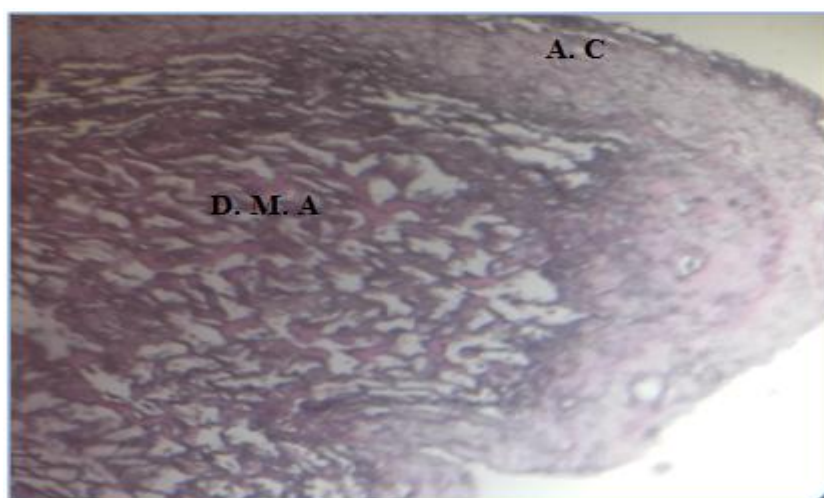


Figure 24 : Effet cytotoxiques du peroxy-nitrite vis-à-vis du tissu pulmonaire à une concentration de 10 μ M (photo originale) GX 4.

A.C : Altération complète

D. M. A : Destruction de mur alvéolaire

-A une concentration de 20 μ M

L'effet du peroxy-nitrite a montré une altération complète de l'aspect lamellaire de la couche laminaire associé à une altération du tissu pulmonaire (**Figure 25**) après 48 heures d'incubation suggérant le déclenchement d'un processus d'apoptose.

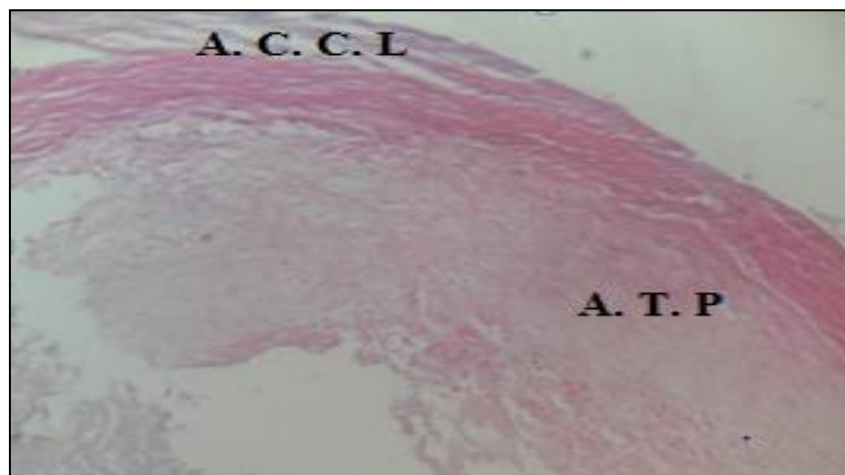


Figure 25 : Effets cytotoxiques du peroxy-nitrite vis-à-vis du tissu pulmonaire à une concentration de 20 μ M (photo originale) GX 10.

A.C.L : Altération complète de la couche laminaire ; **A.T.P** : Altération du tissu pulmonaire.

-A une concentration de 30 μ M

L'observation microscopique a montré une destruction du mur alvéolaire, la réduction de l'espace alvéolaire, destruction de la structure du tissu pulmonaire (**voir les figures ci-dessous**).

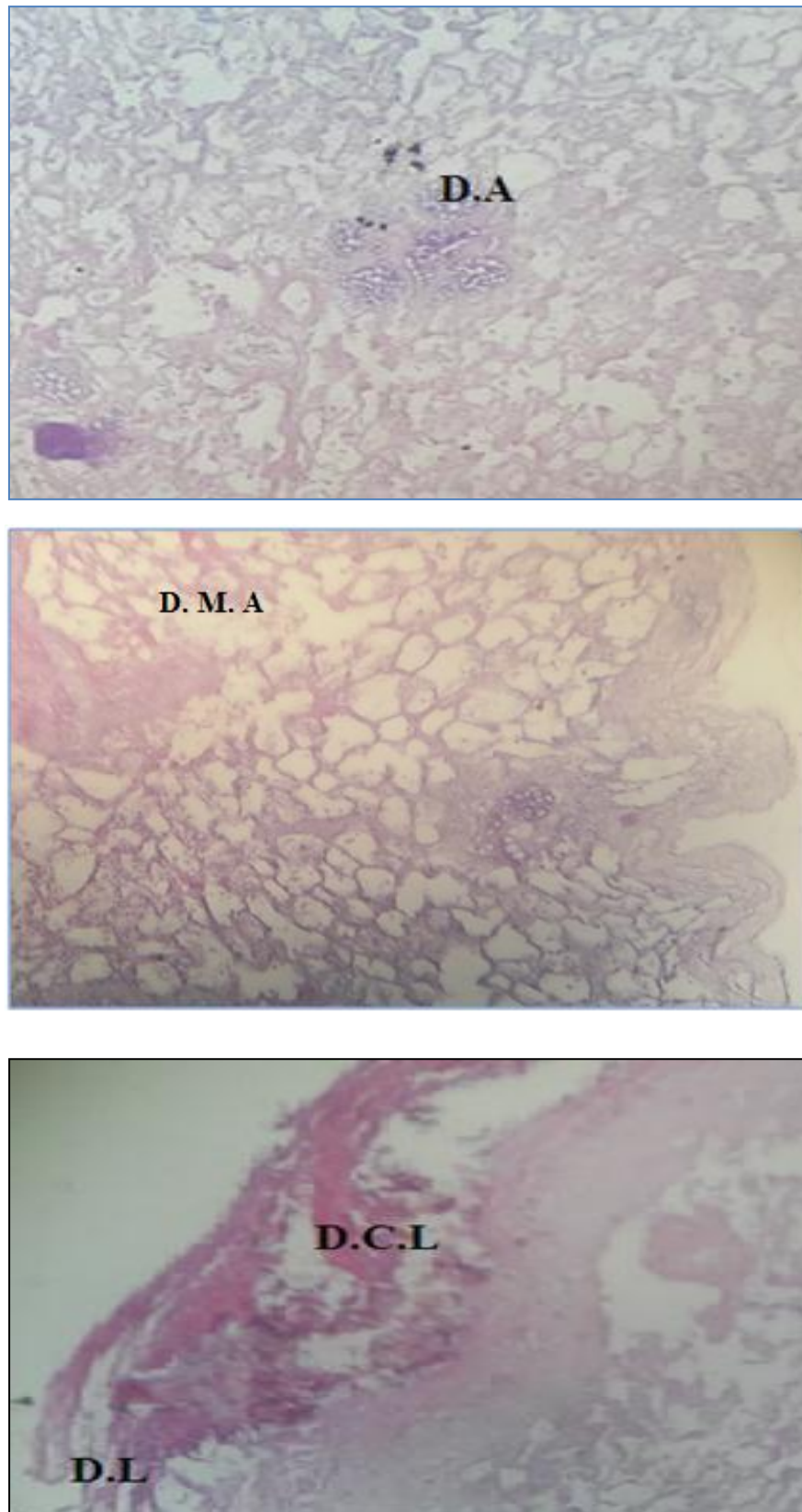


Figure 26 : Effets cytotoxiques du peroxynitrite vis-à-vis du tissu pulmonaire à une concentration de 30 μ M observé au microscope optique GX10.

D.L : Détachement des lamelles; **D.C.L** : Destruction de la couche laminaire;

D.A : Destruction des artères; **D.M.A** : Destruction du mur alvéolaire.

-A une concentration de 40 μ M

Structure dense de l'aspect lamellaire (**Figure 27**) indiquant une perturbation des lamelles(GX40) en présence de 40 μ M du peroxyinitrite.

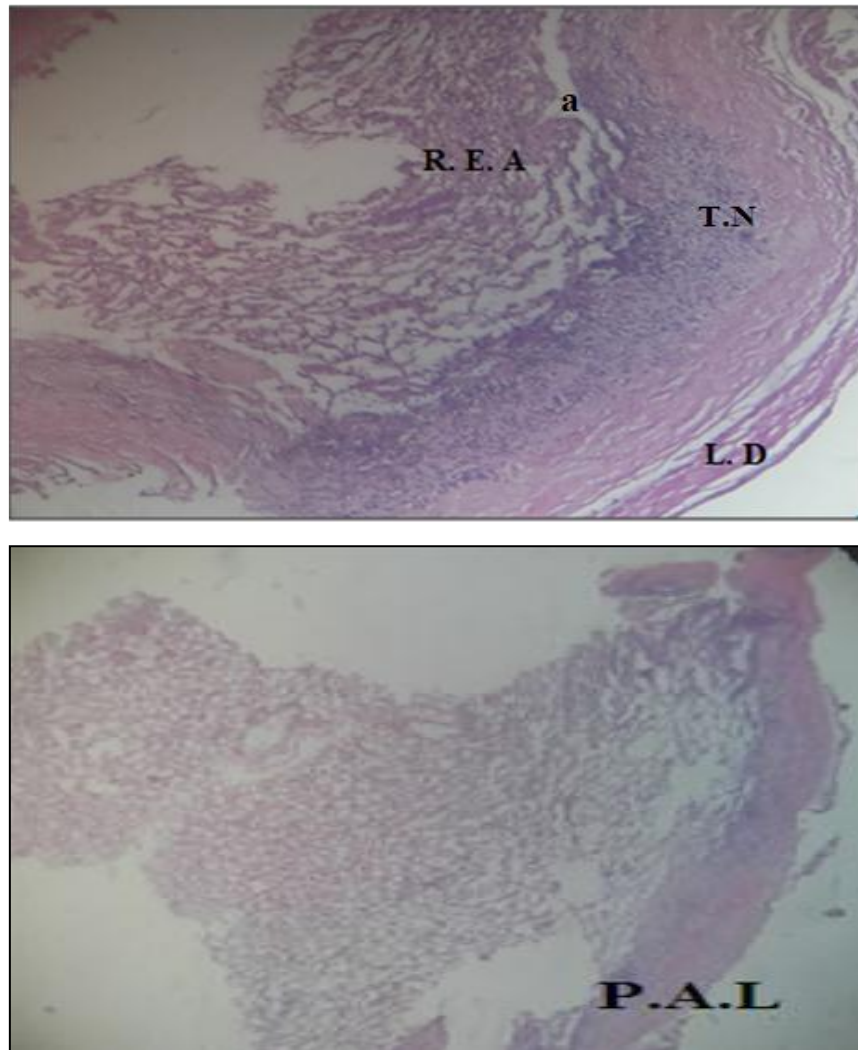


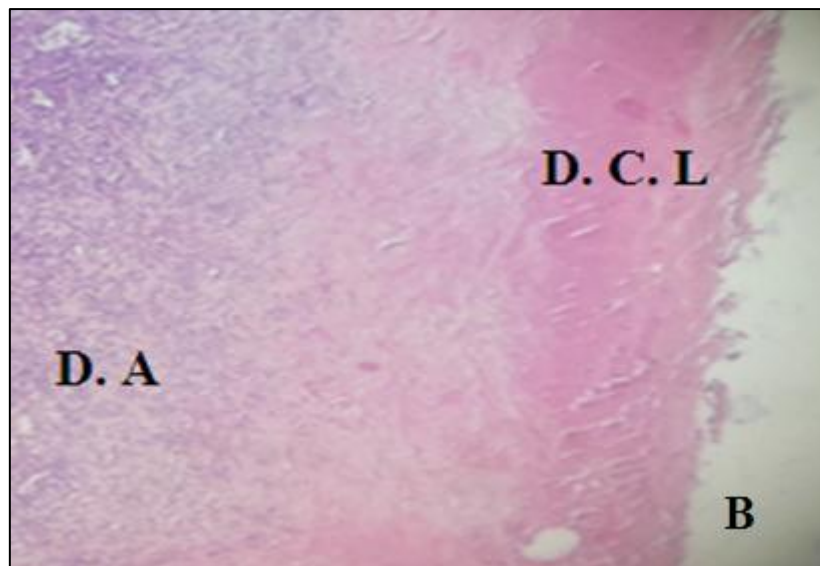
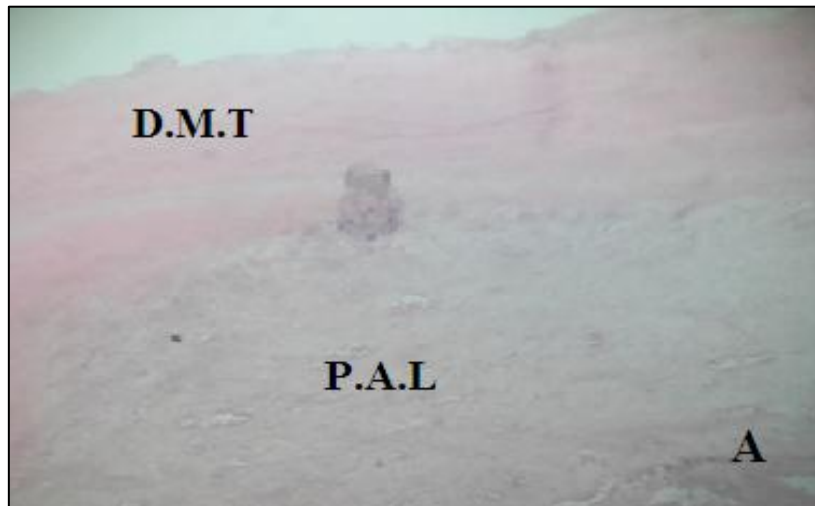
Figure27 : Effet du peroxyinitrite sur la membrane laminaire mise en culture dans du DMEM incubée pendant 48 heure à 37°C dans une atmosphère humide saturé avec du CO₂ et concentration de 40 μ M observé au microscope optique après coloration à l'héματοxyline éosine GX10.

R. E. A : Rétrécissement de l'espace alvéolaire ; **L. D** : lamelle détaché ; **T.N**: Tissu nécrosé ;

a : Rétrécissement de l'espace alvéolaire; **P.A.L** : Perte de l'aspect lamellaire.

-A une concentration de 50 μM , 60 μM , 70 μM , 80 μM

L'Altération de la couche laminaire (**Figure 28**) indique que le peroxyinitrite est hautement cytotoxique ce qui confirme leur rôle dans l'action antihydrique.



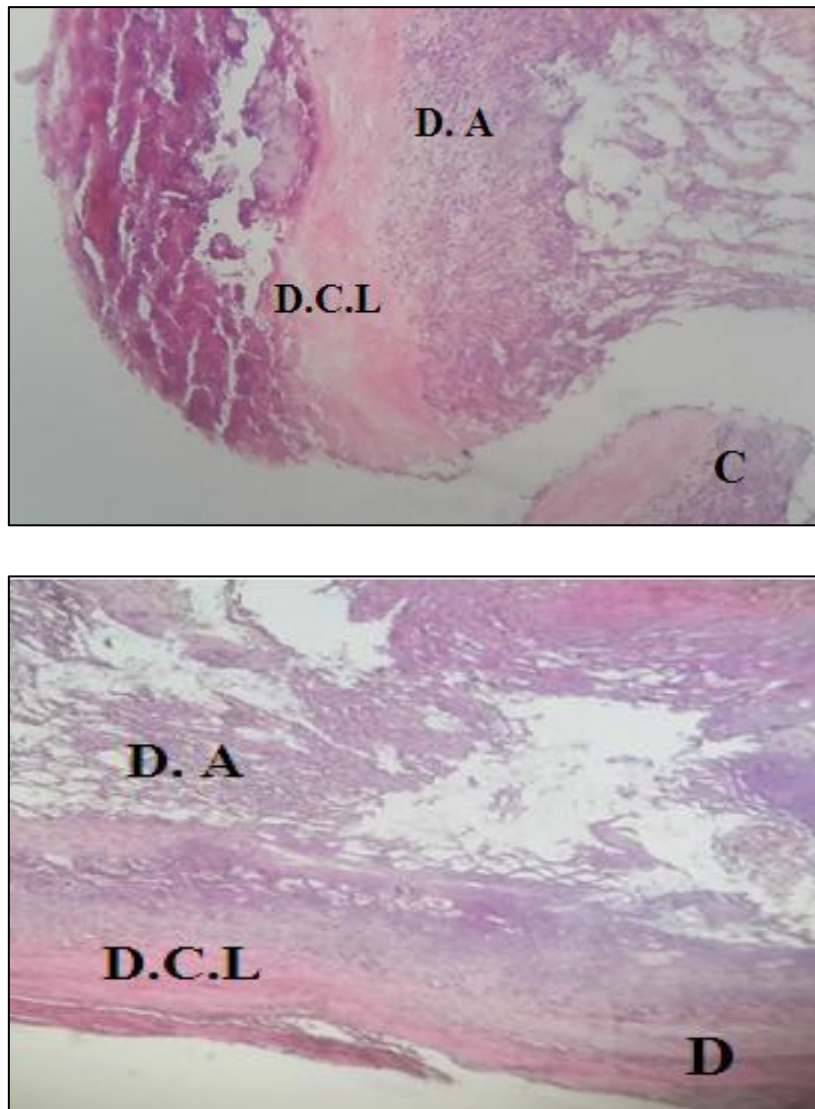


Figure 28 : Effets cytotoxiques du peroxynitrite avec altération des tissus pulmonaires et la destruction cellulaire à différents concentration GX10.

A : Concentration de 50 μM

B : Concentration de 60 μM

C : Concentration de 70 μM

D : Concentration de 80 μM

D.M.T: Destruction marquée du tissu ; **P.A.L** : Perte de l'aspect lamellaire

D.C.L : Destruction de la couche laminaire ; **D.A** : Destruction des artères

VI.2. Discussion générale

L'effet cytotoxique du peroxy-nitrite a été rapporté dans plusieurs pathologies et maladies dégénératives, cette propriété lui permet d'être une cible potentielle dans l'action antihydatique comme agent scolicide. En effet son action scolicide a été montrée dans les travaux réalisés par Boutelja et *al.*, 2009. L'effet cytotoxique du peroxy-nitrite sur la membrane laminaire du kyste hydatique à 40 μM témoigne de l'efficacité du NO *in vitro* déclenchant également le détachement de cette membrane de la membrane germinative qui représente une source de nutriments essentiels au développement des protoscolices.

L'effet cytotoxique du peroxy-nitrite a été évalué sur des fragments tissulaires du poumon, l'étude histologique a montré la réduction de l'espace alvéolaire rappelant l'impact de la réaction inflammatoire sur le tissu pulmonaire avoisinant le kyste hydatique. Des destructions progressives des tissus pulmonaires ont été observées avec l'augmentation de la concentration de cet anion.

Rappelons que le peroxy-nitrite est une molécule qui est formée au cours d'un processus inflammatoire en présence d'une concentration équimolaire de l'anion superoxyde. Le peroxy-nitrite constitue un puissant oxydant dérivé du NO. En effet, les travaux de Touil-Boukoffa et *al.*, (1998) ont montré l'implication de ce radical dans la réponse immunitaire vis-à-vis du kyste hydatique.

La production induite de NO nécessite un contrôle parce qu'il peut être délétère pour l'hôte par son action cytotoxique. Le peroxy-nitrite est un oxydant hautement réactif produit par la combinaison de superoxyde (O_2^-) et de NO (**Beckman et al., 1990 ; Pryor et Squadrito, 1995**). La formation du peroxy-nitrite a été rapportée dans plusieurs processus inflammatoires et semble entraîner des dommages tissulaires, notamment au cours de l'inflammation chronique du tractus gastro-intestinal (**McCafferty, 2000**).

L'effet cytotoxique du peroxy-nitrite a été démontré pour les cellules lymphoblastiques (**Li et al., 2002 ; Yamamoto et al., 2002**). Les cellules endothéliales de l'aorte humaine (**Foresti et al., 1999**), les ostéoblastes (**Reiff et al., 2001**), kératinocytes (**Szabo et al., 1999**) les monocytes cardiaques (**Arstall et al., 1999**). Des concentrations de moins de 20 mM de peroxy-nitrite induisent l'apoptose des lymphocytes (**Virag et al., 1998**). À forte concentration de peroxy-nitrite, la mort cellulaire provient par le processus de nécrose caractérisée par la perturbation de l'intégrité de la membrane plasmique (**Virag et al., 1998**).

La production de NO a été révélée dans le cadre de parasitoses à développement intracellulaire telles que *plasmodium falciparum* (Anstey et al., 1996) ; *Leishmania donovani* ; *Leishmania major*. En effet, la quantité de NO produite augmente parallèlement à une hausse de l'activité anti-parasitaire. D'autres parasitoses notamment celles causées par *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* sont également associées à l'expression de la NOS2 (Nussler et al., 1994 ; Riches et al., 1998 ; Das et al., 2001).

Cependant, plusieurs agents scoliciques tels que l'eau oxygénée H₂O₂ à 20 volume et le glucose hypotonique sont utilisés en chirurgie mais ils ne sont pas efficaces car la survenue d'échinococcoses secondaires a été souvent observée après chirurgie. Dans ce contexte, nous avons tenté de chercher d'autres agents tels que le peroxy-nitrite qui est impliqué dans l'action anti-hydatique.

Par ailleurs, le S-nitroso-N penicillamine (donneur de NO) entraîne la destruction de Leishmanies (Salvati et al., 2000). Le NO détruit Schistosome *in vitro* et *in vivo* (Moncada et al., 1997 ; Colasanti et al., 2000). Les kystes hydatiques de murins à *Echinococcus granulosus* sont détruits par le NO produit par les macrophages péritonéaux.

Des études *in vitro* ont confirmé l'effet cytotoxique du peroxy-nitrite pour les parasites. De plus, il a été rapporté que cet anion réduirait la viabilité de *Fasciola hepatica* maintenu *in vitro* dans la bile (Sadeghi-Hashjin et Naem, 2001).

L'action cytotoxique de peroxy-nitrite a été également observée pour les parasites à multiplication intracellulaire. Il a été rapporté que le peroxy-nitrite est cytotoxique vis-à-vis de la forme amastigote de *Leishmania amazonensis* en culture (obtenus à partir de la forme promastigote). A l'inverse, le NO est cytotatique, le peroxy-nitrite est un effecteur produit par les macrophages important dans la destruction de *Leishmania in vivo* (Linerars et al., 2001).

L'action antiparasitaire a été également observée *in vitro* pour *trypanosoma cruzi* (Figueiredo et Souto-Padron, 1999).

L'intérêt de l'utilisation des dérivés de NO tel que le peroxy-nitrite de sodium présente une certaine efficacité dans une perspective préconisant la cytotoxicité de ces métabolites dans un contexte antiparasitaire développé dans un but thérapeutique. Cette suggestion est appuyée par la forte production endogène de NO au cours de l'hydatidose.

Cette étude ouvre des perspectives à long terme pour une thérapie par des donneurs de NO qui contribuent à l'atteinte de la viabilité de l'hydatide et permettre probablement sa résorption.

Conclusion

Cette étude constitue une contribution à la mise en évidence de l'implication du monoxyde d'azote dans la lutte anti-hydatique. En effet, nos résultats soulignent le rôle effecteur direct du monoxyde d'azote dans la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, le monoxyde d'azote particulièrement son dérivé le peroxy-nitrite a montré une action toxique vis-à-vis de l'hydatide en affectant l'intégrité de ses membranes.

L'étude histopathologique du tissu pulmonaire affecté par le kyste hydatique a montré un processus inflammatoire indiquant une réponse immunitaire intense entraînant des altérations au niveau des tissus pulmonaires avoisinant le kyste hydatique.

Le peroxy-nitrite à une concentration de 10 μ M a montré une altération de la couche laminaire mais il n'a pas induit de cytotoxicité sur le tissu pulmonaire. Cependant à partir d'une concentration de 20 μ M, le peroxy-nitrite a montré des altérations aussi bien au niveau des membranes kystiques que le tissu pulmonaire et dont l'intensité des altérations est dépendante de la concentration de cet anion suggérant un processus d'apoptose.

Le peroxy-nitrite pourrait ouvrir des perspectives quant à l'utilisation d'agents scolicides car il a induit une toxicité *in vitro* comme agent scolicide.

A regard global de nos résultats, notre étude sera une ouverture vers le développement de nouveaux agents scolicides pouvant être utilisés dans les techniques préconisées dans le traitement chirurgical de la parasitose afin de prévenir les récurrences et d'empêcher la survenue d'échinococcose secondaire due à la dissémination de vésicules ou de protoscolex.

En perspective, il serait important

- D'explorer la voie de la NOSII qui en faveur de l'élimination du parasite.
- De tester d'autres molécules sur la viabilité du kyste hydatique.
- De mettre en évidence sa production *in situ* par la recherche de marqueurs.
- Identifier les protéines cible du peroxy-nitrite.

Référence bibliographique

A

Anstey, N. M., Weiberg, D., Hassalany, M.Y., Mwaikambo, E.D., Manayanga, D., Midukoni, M.A., Arnelle, R.D., Hottis, D., Mc Donald, M.L. and Granger, D.L. (1996). Nitric oxide in tanzanian children Malaria: Inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/ NOS2 expression. *J.Exp. Med.*, **184**, 557-567.

Arstall, M.A., Sawyer, D.B., Fukazawa, R., Kelley, R.A. (1999). Cytokine- mediated apoptosis in cardiac myocytes : The role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ. Res.*, **85**, 829-840.

Aubry P. (2013). Hydatidose ou Kyste hydatique. *Médecine tropicale*, 01-04.

B

Bakkali, A., I. Jaabari, et al. (2017). "[Cardiac hydatid cyst about 17 operated cases]." *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*.

Barlet, j. p., Gaumet-Meunier, N., Horcajada-Moltenj, M.N. (1999). *Exercice physique, carence estrogénique, monoxyde d'azote et remodelage osseux*. *Science & Sports* ; 14 : 292-300.

Berard, E. (1997). *Métabolisme et régulation du monoxyde d'azote : un médiateur de contrôle difficile*. *Arch Pédiatr*; 4:1004-1011.

Blibek, Karim. (2009). *Etude de la modulation de la NO synthèse 2 par l'extrait des pépins de raisin au cours de l'hydatidose humaine : impact sur la production de monoxyde d'azote*. Mémoire d'ingénieur d'Etat en Biologie. Algérie, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, ,79.

Bourée, P. and F. Bisaro. (2007). "Hydatidose : aspects épidémiologique et diagnostique." *Antibiotiques*9(4): 237-245.

C

Capuano, F., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Perugini, A.G., Veneziano, V., Garippa, G., Genchi, C., Musella, V., Cringoli, G. (2006). "Cystic echinococcosis in water buffaloes: Epidemiological survey and molecular evidence of ovine (G1) and buffalo (G3) strains". *Veterinary Parasitology*, **137**: 262-268.

Référence bibliographique

Colasanti, M., and Suzuki, H. (2000). The dual personality of NO. *Trends pharmacol. Sci.*, **21**, 249-252.

Craig, P. S., D. P. McManus, et al. (2007). "Prevention and control of cystic echinococcosis. *The Lancet Infectious Diseases* **7** (6): 385-394.

D

Das, I., Datta, N., Bandyopadhyay, S. And Das, P.K. (2001). Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of NO and a favourable T cell response. *J. Immunol.*, **166**(6), 4020-4028.

Dinh-Xuan, A.T., Barouxis, C., NguyễnThiVân., Nguyễn-Huulân.,Texereau, J.(1998).*Monoxyded'azote (NO) et asthme.* Rev.fr. Allergol., 38, 3.

Dugas, N., Palacios-Calander, M., Dugas, B., Riveros-Moreno, V., Delfraissy, J.F., Kolb, J.P., Moncada S. (1998).Regulation by endogenous interleukin-10 of the expression of nitric oxyde synthase induced after ligation of CD23 in human macrophages. *Cytokine* ; 10 : 680-689.

E

Eckret J.,Gemmel M.A.,Meslin F.X.,PawlowskiZ.S. (2001).WHO/OIE Manual on Echinococcosis in human and animals: a public health problem of global concern,Paris: International Office of Epizootics, The Word Organization for animal health. Paris, n°261,20-71

Eric Vuillemin, NaryVeal, Vincent Croquet, Christophe Pilette, Olivier Douay, Paul Calés.Monoxyde d'azote et maladies du foie : rôle délétère ou hépato protecteur,.Elsevier masson. (En ligne). v3n°8-9 ? P892. Disponible sur : <http://www.em consulte. com/ en/ article/ 98283>. (Consulter le 16/05/18)

Euzeby J. (1997). « La spécificité parasitaire et ses incidences sur l'étiologie et l'épidémiologie des parasitoses humaines d'origine zoonosiques ». 152p

F

Référence bibliographie

Figueiredo, I.F and Souto-Padron, T. (1999), *Trypanosoma cruzi* membranes permeability toward peroxynitrite. *Memorias do instituto Ovaldo Cruz*, 94.

Foresti, R., Sarathchandra, P., Clark, J.E. Green, C.J., Motterlini, R. (1999), peroxynitrite induces heam oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a Link to apoptosis. *Biochem. J.*, 339(3), 729-736.

G

GhafariY. Et Labarde G. (2003).Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, DESS IST.

Girard, C., Bastien, O., Estanove, S., Lehot, JJ.(1997).*Monoxyde d'azote inhalé en anesthésie-réanimation*. *Am FrAllesthRCanirn*: 16:3036.

I

Ito, A. Wandra, T., Sato, M.O., Mamuti W, Xia N, Sako Y et al. (2006).“Towards the international collaboration for detection, surveillance and control of taeniasis/ cysticercosis and echinococcosis in Asia and the Pacific”. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **37**: 82-90.

J

Jenkins, D. J., McKinley, A., Duolong, H.E., Bradshaw, H., Craig, P.S. (2006). “Detection of echinococcus granulosus coproantigens in feaces from naturally infected rural domestic dogs in south eastern Australia”. *Aust Vet J*, **27**(2), 205-209.

K

Kamenetzky L., Gutierrez, A.M., Canova, S. G, Haag, K.L., Guarnera, E. A., Parra, A., Garcia, G.E., Rosenzvit, M. C. (2000).“Several strains of Echinococcusgranulosus infect livestock and human in Argentina”. *Infection Genetic and Evolution*, **2**: 129-136.

Kolb, J.P. (2001).*Rôle pro- et anti-apoptotique du monoxyde d'azote, NO*. *Life Sciences*, 324 413–424.

Référence bibliographie

L

Laamrani et al. (2007). Lutte contre l'hydatidose/ echinococcose. Publication, p 11.

Li, C.Q., Trudel, L.J., Wogan, G.N. (2002), Genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells exposed to peroxynitrite generated from SIN-1. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 527-535.

Linares, E., Giorgio, S., Mortara, R.A., Santos, C.X., Yamada, A.T., Augusto, O. (2001) Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic. Biol. Med.*, **30(11)**, 1234-1242.

M

Maillard, S., Benchikh-Elfegoun, M. C., Knapp, J., Bart, J. M., Koskei, P., Gottstein, B., Piarroux, R. (2007). "Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in three African countries". *Parasitol Res*, 100: 495-503.

McCafferty, D. (2000), Peroxynitrite and inflammatory bowel disease. *Gut.*, **46**, 436-439.

McManus, D. P., W. Zhang, et al. (2003). "Echinococcosis." *The Lancet* 362(9392): 1295-1304.

Moncada, S., Higgs, A. and Furchott, R. (1997), international union of pharmacology nomenclature in nitric oxide. *Research. Pharmacol.Rev.*, **49**, 137-142.

Moro, P.L., Schantz, P.M. (2006). "Echinococcosis: historical landmarks and progress in research and control". *Ann Trop Med Parasitol*, **100**: 703-714.

Moutafis, M. (1996) *Le monoxyde d'azote : Aspects fondamentaux et perspectives thérapeutiques*. *RevMèdInterne*, 17:779-782.

Mwambete, K. D., Ponce-Gordo, F., Cuesta-Bandera, C. (2004). "Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*". *Acta Tropica*, **91**: 87-93.

N

Nicolas Sennequier Sandrine Vadon-Le Goff. (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Medecine science*. (en ligne)..vol.14,n° 11, P.1185-

Référence bibliographie

1195. Disponible sur : [http://www. Google.dz/url ?sa=t&rct=j &q= &esrc= s&source= web&cd=1ved=0ahUKEWiKvKqez5](http://www.Google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1ved=0ahUKEWiKvKqez5).

Nussler, A.K., Eling, W. And Kreamsne, P.J. (1994), patients with *Plasmodium falciparum* malaria and *Plasmodium vivax* malaria show increased nitrite and nitrate plasma levels. *J. Infect. Dis.*, **169**, 18-19.

P

Parent, M., F. Dupuis, et al. (2013). "[Which future in cardiovascular therapy for nitric oxide and its derivatives?]." *Ann Pharm Fr* **71** (2): 84-94.

Pryor, W.a., et Squadrito, G.I. (1995), An invented review: The chemistry of peroxynitrite : a product from the reaction of nitric oxide with superoxyde. *AM.J. Physiol.lung. Mole.Physiol.*, **12 (268)**, 699-722

R

Reiff, D.A., Kelpke, S., Rue, L., Thompson, J.A. (2001), Acidic fibroblast growth factor attenuates the cytotoxic effects of peroxynitrite in primary human osteoblast precursors. *J. Trauma.*, **50**, 433-438.

Romig, T., Dinkel, A., Mackenstedt, U. (2006). "The present situation of echinococcosis in Europe". *Parasitology International*, **55**, 187-191

S

Sadeghi-Hashjin, G., Naem, S. (2001), Parasitocidal effects of peroxynitrite on ovine liver flukes in vitro. *Journal of helminthology.*, **75(1)**, 73-76.

Salvati, L., Mattu, M., Colsanti, M., Scalone, A., Venturini, G., Gradoni, L., and Ascenzi, P. (2001), NO donors inhibit *Leishmani infantum* cyeteine protease zctivity. *Biochim.Biophys.Act.*, **1545**, 357-366.

T

Référence bibliographique

Thebaud, B., Mercier, J C.(1997).*Le monoxyde d'azote inhalé : un traitement plus physiologique de l'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né.* Arch Pddiatr: 4:988-1003.

Thompson R.C., McManus D.P. (2002). "Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*". *TRENDS in Parasitology*, **18**(10) : 452-457.

TorcalJ,Navarro-ZorraquinoM, LozanoR, LarradL,Salinas JC, Ferrer J et al.(1996). Immune response and in vivo production of cytokines in patients with liver hydatidosis. *Clin Exp Immunol*; 106: 317-322

Torgerson, P.R., Budke, C.M. (2003). "Echinococcosis – an international public health challenge". *Research in VeterinaryScience*, 74 : 191-202.

V

Varcasia, A., Canu, S., Kogkos, A., Pipia, A.P., Scala, A., Garippa, G., Seimenis, A. (2007) *Parasitology Res*, 104(4): 1135-1139.

Virag, R., Huhmer, A., Bigelow, D., Schoneich, C. (1996), The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by peroxynitrite. *Free Rad. Res.*, **24**, 243-259.

W

Wei C-C, Crane B.R., Stuehr D.J. (2003).*Tetrahydrobiopterin radical enzymologie.* Chem. Rev., 103, 2365-2383.

Wejih, D., N. Ramzi, et al. (2017). "Le kyste hydatique du foie." *Revue Francophone des Laboratoires* **2017** (491): 31

Y

Yamamoto, T., Maruyama, W., Kato, Y., Yi, H., Shamoto-nagai, M., Tanaka, M., Sato, Y., Naoi, M. (2002).selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite : involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *JNeural transm.* 109, 1-13.

Yucel. Akkas, Tevfik. Kaplan, Neslihan. Gulay Peri, and Bulent. Kocer.The Hydatid Cysts Have Unusual Localisation and Dissemination Ways in the Chest Cavity?. *Case Rep*

Référence bibliographie

Sur. (en ligne). 2016.2016.7092494. disponiblesur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828547/>.(consulterle 20/04/2017)

Z

Zeghir-Bouteldja, R. (2018). Étude des effets du monoxyde d'azote *in vivo*, *in vitro* et *in situ* au cours des localisations fréquentes et rares de l'hydatidose: Apport de l'analyse protéomique du liquide hydatique.Th.doc.:Sciences de la Nature et de la vie ,BAB EZZOUAR,université de BAB EZZOUAR., 114.

Zeghir-Bouteldja, R., Amri, M., Ait Aissa, S., Bouaziz, S., Mezioug, D., Touil-Boukoffa, C. (2009). In vitro study of nitric oxide metabolites effects on human hydatid of *Echinococcus granulosus*. J. Parasitol. Res.64919, 1-7

Annexes

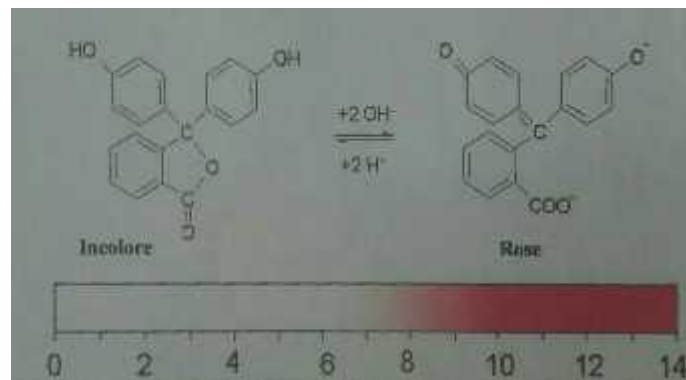
Annexe 1 : Préparation des solutions de laboratoire

Solution d'eau oxygénée H_2O_2 (0.6M).....0.408g/20ml d'eau distillée
Solution d'acide chlorhydrique HCl (0.7M).....0.511g/20ml d'eau distillée
Solution de nitrite de sodium NaNO_2 (0.6M).....0.828g/20ml d'eau distillée
Solution aqueuse de soude NaOH (1.5M).....1.2g/20ml d'eau distillée

Annexe 2 : Tableau de dilution

	Concentration initiale de peroxyinitrite							
	10	20	30	40	50	60	70	80
V_{DMEM} (μl)	395,84	391,67	387,5	383,34	379,17	375	370,84	366,67
V_{ONOO^-} (μl)	4,16	8,33	12,5	16,66	20,83	25	29,16	33,33

Annexe 3 : virage de la couleur de la phénophtaléine (zone de virage : pH 8,2 -10)



Glossaire

Apoptose : (ou mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire.

Cosmopolite : Un organisme cosmopolite se dit d'une espèce, végétale ou animal, à distribution géographique très vaste et répandue dans quasiment le monde entier.

Giganto-cellulaire : L'artérite giganto-cellulaire (ou maladie de Horton) fait partie du groupe des vascularites systémiques. Elle affecte les vaisseaux sanguins de gros et moyen calibres, en particulier les vaisseaux de la tête, dont les artères temporales.

Hermaphrodite : Est un personnage de la mythologie grecque. Son nom a été utilisé pour créer le terme hermaphrodisme, qui désigne ce qui réunit les caractéristiques des deux sexes.

Immunodéprimée : On dit d'une personne qu'elle est immunodéprimée lorsque son système immunitaire n'est plus capable de faire face correctement à des microbes. Les personnes immunodéprimées vont être incapables de gérer normalement des micro-organismes qui, en temps normal, ne présentent aucun danger.

Métacestode: méta du grec. meta, « après au-delà de » qui indique le changement, la postériorité, la supériorité, le dépassement.

Un cestode est un endoparasite dans le tube digestif des vertébrés, y compris les poissons, les oiseaux et les mammifères, le corps étant constitué d'une série de segments appelés proglottides ou proglottis. Ils n'ont pas de système digestif, comme les ténias. Ils ont des cycles biologiques complexes qui impliquent plusieurs hôtes, y compris les humains.

Nécrose : est une forme de dégât cellulaire qui mène à la mort prématurée et non programmée des cellules dans le tissu vivant.

Nitrosation : Est un processus (réaction organique) de conversion de composés organiques dits « précurseurs » en composés dits « nitroso- », c'est-à-dire dérivés de composés contenant la fonction chimique R-NO (ex : nitrosamines).

Nitrosonium : L'ion nitrosonium est l'oxycation NO^+ , dans lequel l'atome d'azote est lié à un atome d'oxygène par une triple liaison, le cation portant dans son ensemble une charge positive.

Nitrosylation : Est l'incorporation covalente d'une fraction d'oxyde nitrique dans une autre molécule (généralement organique). Ceci est souvent accompli par l'exposition à l'acide nitreux ou à un équivalent efficace (une solution de nitrite de sodium et d'acide chlorhydrique). La nitrosylation aide au mécanisme de réparation de l'ADN et à la régulation des processus cellulaires.

Ostéoclastes : Sont les macrophages des os. Ce sont des cellules multinucléées possédant de quelques noyaux à une cinquantaine de noyaux (syncytium) au niveau de leur pôle apical, d'origine hématopoïétique. Elles ont un diamètre de 50 à 100 μm . Elles sont responsables de la résorption du tissu osseux, par le processus de l'ostéolyse, et participent donc à son renouvellement continu.

Perikystectomie : Est un geste délabrant exposant aux risques de lésions des structures avoisinantes et de saignement de la cavité résiduelle.

Proapoptotique : Bcl-2 est le prototype d'une famille de gènes qui peuvent être soit proapoptotiques – entre autres Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim – ou anti-apoptotiques – parmi lesquels Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Nr13 (ou Nrh - DIVA/BOO).

Stœchiométrie : Du grec ancien (« élément ») et (« mesure »), est un calcul qui permet d'analyser les quantités de réactifs et de produits qui sont en jeu au cours d'une réaction chimique. C'est aussi la proportion des éléments dans une formule chimique. Jeremias Benjamin Richter (1762-1807) fut le premier à énoncer les principes de la stœchiométrie, en 1792. Il écrivait alors :

« La stœchiométrie est la science qui mesure les proportions quantitatives ou rapports de masse dans lesquels les éléments chimiques sont impliqués. »

Zoonoses : Sont des maladies et infections dont les agents se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'homme, et vice-versa. Le terme a été créé au XIX^e siècle, à partir du grec *zôon*, « animal » et *nosos*, « maladie », par Rudolf Virchow.

Abstract

Hydatidosis is a cosmopolitan parasitosis caused by the larval form of a cestode called *Echinococcus granulosus*. It is not only one of the most devastating parasitic diseases in humans, but it is also very difficult and expensive to treat and prevent. The involvement of NO in the antihydatic action has been demonstrated in several in vitro and in vivo studies. In this context. Our work focused on histopathological study which showed the establishment of an inflammatory process. On the other hand, the study of the in vitro effect of peroxy-nitrite synthesized by the Quench flow method. Our results showed a degenerative effect on the lamina propria resulting in progressive browning depending on the peroxy-nitrite concentration. The histological study showed cytotoxic effects of peroxy-nitrite on pulmonary tissue at a concentration of 40 µM. These data could contribute to the development of new effective scolicidal agents that could be used in therapeutic techniques requiring the use of scolicidal agents.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, nitric oxide, peroxy-nitrite.

طفيلية مرض الكيس المائي هو طفيلي عالمي يتسبب في شكل يرقات. إنه ليس
البشر ولكنه أيضا للغاية والوقاية منه. وقد تم اثبات مشاركة
مضاد للكيس العددي العديد . بهذا السيا
المرضية أظهرت عملية التهابية ناحية تأثير البيروكسيد يترت المصنع بطريقة
. أظهرت إليها تأثيرًا تنكسيًا الصفيحي تدريجي
تركيز البيروكسينيتريت. وأظهرت النسيجي للخلايا البيروكسينيتريت الرئوية بتركيز
40 ميكرومول. هذه البيانات يمكنهم تطوير جديدة يمكن استخدامها التقنيات العلاجية

الكلمات المفتاحية: الكيس المائي، أكسيد النيتريت، بيروكسينيتريت.

Résumé

L'hydatidose est une parasitose cosmopolite causée par la forme larvaire d'un cestode appelé *Echinococcus granulosus*. Elle est non seulement l'une des maladies parasitaires les plus dévastatrices chez l'homme, mais elle est également très difficile et coûteuse à traiter et à prévenir. L'implication du NO dans l'action antihydatique a été démontrée dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Dans ce contexte. Notre travail a porté sur étude histopathologique qui a montré l'instauration d'un processus inflammatoire. D'autre part l'étude de l'effet *in vitro* du peroxyde d'azote synthétisée par la méthode du Quench flow. Nos résultats ont montré un effet dégénératif sur la membrane laminaire traduit par un brunissement progressif dépendant de la concentration en peroxyde d'azote. L'étude histologique a montré des effets cytotoxiques du peroxyde d'azote vis-à-vis du tissu pulmonaire à une concentration de 40 µM. Ces données pourraient contribuer au développement de nouveaux agents scolicides efficaces qui pourraient être utilisés dans les techniques thérapeutiques nécessitant l'utilisation d'agent scolicide.

Mots clés : *Echinococcus granulosus*, monoxyde d'azote, le peroxyde d'azote.