



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi –Tébessa

faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

département de biologie appliqué

Mémoire de MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie Appliquée

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté en vue Thème :

Etude de l'effet de trois molécules nitrées synthétiques sur les différentes structures de l'œil et *in vitro*

Présenté par :

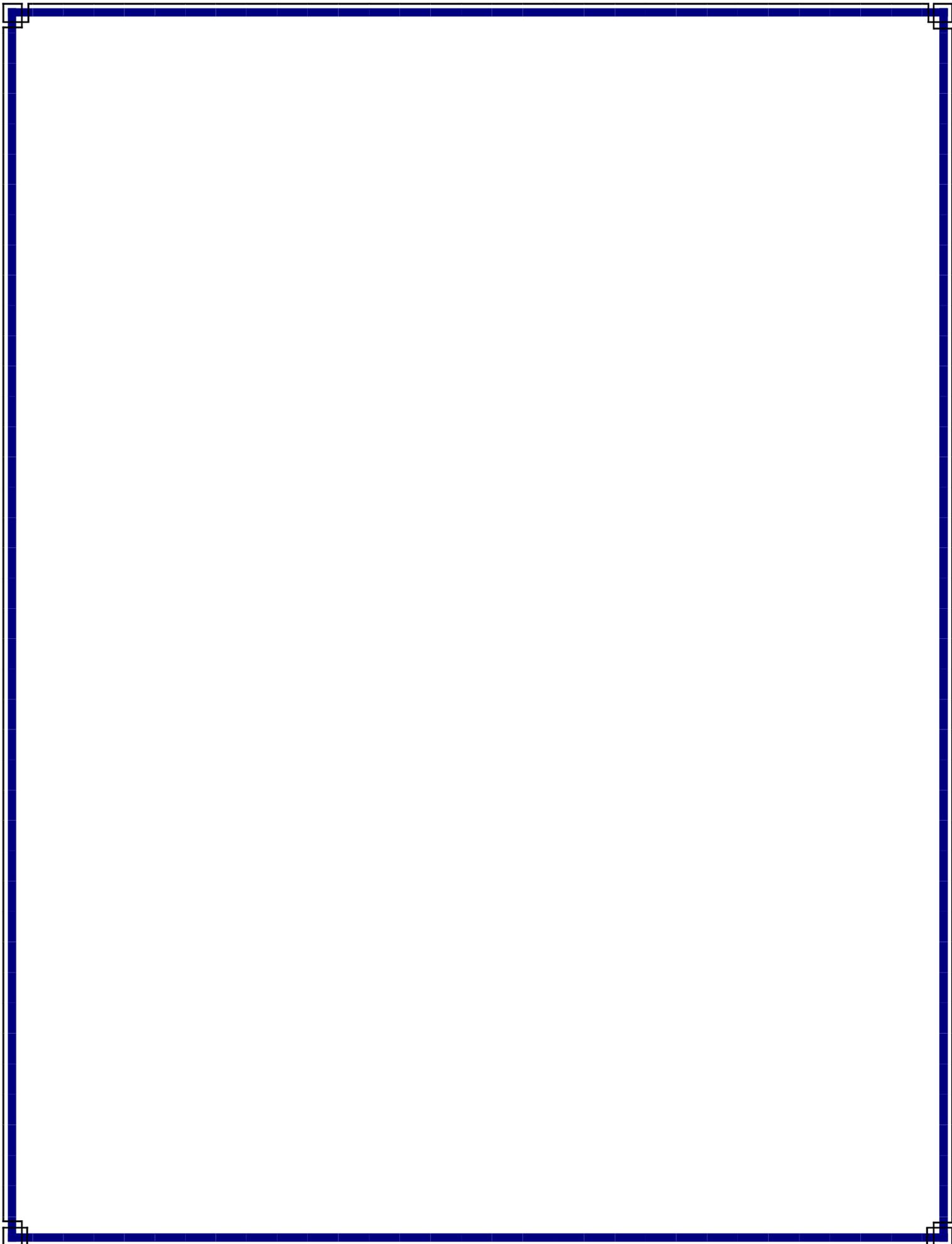
SAKHRI AHLEM

AOULMI LEILA

Devant le jury :

Dr. GOUDJIL T	MAA	Université de Tébessa	Présidente
Mme. BELGUENNDOUZ K	MAA	Université de Tébessa	Rapporteuse
Mme. AMAMRA. R	MCA	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance : 19 juin 2019



ملخص

النيترو ايميدازول هي فئة من المركبات الكيميائية ذات حلقة ايميدازول نشطة ، وتمتلك مشتقات النيترو ايميدازول العديد من الأنشطة البيولوجية التي تختلف تبعاً لطبيعة البدائل وموقع مجموعة النيترو ، تهدف الدراسات الحالية إلى تحديد آثار هذه المشتقات على مجموعة بنية العين والكلية عيون الأرنب والكلى التي تم الحصول عليها على الفور ، تزرع لمدة 24 ساعة في وسط مكون من DMEM ، FCS % 10 و DMSO % 0.10 و HEPES 20mM. وتركيزات كل منها (100 ميكروغرام / مل والجنتاميسين والستربتومييسين والبنسلين 100 وحدة دولية / مل). عولجت الثقافات بجزئيات نترات اصطناعية مختلفة عند التركيز (كحول 4-نيتروبنزويل و 1 ميثيل -5-نيترو ايميدازول 25 مم و 5-نيترو ايميدازول 12.5 مم) تثبت بعدها أجزاء العيون و الكلى في الفورمالين ثم تجري عليها دراسة نسيجية .

وقد لوحظ تغيير في جميع الهياكل العينية والكلية للجزئيات النيترات الاصطناعية الثلاثة وبشكل عام تشير نتائجنا ككل إلى أن الجزئيات الثلاثة تحدث تأثيرات ضارة على بنية العين والكلية **الكلمات المفتاحية:** بنية العين والكلية ، جزئيات النيترات ، النيترو ايميدازول

Abstract:

Nitroimidazoles are a class of chemical compounds with an imidazole ring ,nitroimidazole derivatives And nitroimidazoles of the substitute of the nature of substitute and the position of nitro groupe. The reduction of nitroimidazole groupe in summer in the this study presents an overview of the effects of these drugs on ocular and renal structur .

the eyes and rein were recovered immediatel after sacrifice ,then cultured in DMEM supplemented with 10% FCS AND 0,10% DMSO and 20 Mm HEPES. And the respective concentrations of(100 µg /ml and gentamicine (100 µg/ ml et de gentamicine et de streptomycine et de pénicilline 100UI/ml). The culture were treated on synthetic nitrated molecules at a concentration (4-nitrobenzyl alcool and 1-méthyl -5- nitroimidazole 25 mM. and 5-nitroimidazole 12 ,5 mM).after a 24-hour incubation period, the explants ,the explants were fixed in the sheet of paper and were histologically studied .

once you have observed all the ocular and renal structures for the three synthetic nitrated molecules

our resultants as whole are only three effects on ocular and renal structure

Key words : ocular and renal structur ,nitrate synthetic molecules ,nitroimidazole

Résumé

Les nitroimidazoles sont une classe de composés chimiques avec cycle imidazole actif et groupe nitro , Les dérivés nitroimidazoles possèdent de nombreuses activités biologiques qui varient en fonction de la nature des substituants et de la position du groupement nitro La réduction du groupe nitro des nitroimidazole a été impliqué dans la cytotoxicité .La présente études vise a situer l'effets de ces drivés sur structure oculaire et rénale

Les yeux et les reins de lapin ont été récupérés immédiatement après le sacrifice, étaient ensuite mise en culture dans le milieu DMEM supplémenté avec de 10 %SVF et de 0,10% DMSO et de 20mM HEPES. Et concentrations respectives de (100 µg/ ml et de gentamicine et de streptomycine et de pénicilline 100UI/ml). Les culture ont été traités avec différentes molécules nitré synthétiques a concentration (4-nitrobenzyl alcool et 1-méthyl -5-nitroimidazole 25 mM. Et 5-nitroimidazole 12,5 mM).après un temps d'incubation de 24 heures ,les explants ont été fixé dans du Bouin et ont fait l'objet d'une études histologique.

Une altération a été observés dans tout les structures oculaire et rénales pour les trois molécules nitré synthétique

Nos résultats dans leur ensemble indiquent que les trois molécules induisent des effets délétères sur la structure oculaire et rénale

Mots clés :structure oculaire et rénale ,molécules nitrésynthétiques ,nitroimidazole

Remerciement

*Tout d'abord nous remercions « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage de pouvoir terminer ce modeste travail.*

*Nous remercions notre encadreuse « **Mme belgandouz .k** » même si les mots de remerciement sont très petits par rapport à ses efforts*

Pour nous aide et nous oriente -Vraiment Merci-

*Merci pour les membres de jury : la président **DR GOUDJIL .T** pour son aide, son soutient et pour avoir exprimé son entière disponibilité*

*Et l'examineur **Mme Amamra .R***

Tous nos enseignants qui nous ont signées tout au long d e notre parcours : nos enseignants de primaire ; du moyen, du lycée et de l'université.

Merci pour tous les enseignant du notre département « département de biologie appliquée »

Merci pour tous les techniciens et les techniciennes des laboratoires de notre faculté.

Merci pour tous les gens qui nous aident de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents *Sakhri Rachid et Malika*

A mon frère unique *Dr Chaouki* et ma chère sœur Nessrin

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et

Chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

Je vous remercie pour votre encouragement et soutien de morale que

j'ai reçu de votre part.

A mon binôme Leila et toute la famille Aoulmi

.A mes oncles, tantes, cousins et cousines de la famille Sakhri et

Aouchia sans exception.

Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

Affectueuse reconnaissance.

A ma chère tata *Djamila*

A mes amis intimes Maryoma, Siham, Nour,

mayora, Hiba, Sabrina, Nadjwa, Amel, Wahipa, Bouchra, Nessrin

Rania, Khawla, Hala .

A mes camarades de la promotion de la biochimie 2018-2019.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce

Projet soit possible, je vous dis merci.

AHLEM

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents *Aoulmi Badi et Fayzza*

mes frères Mohamed et Djamel et Ali et Hichem et ma sœur Selma

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et

Chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

Je vous remercie pour votre encouragement et soutien de morale que j'ai reçu
de votre part.

A mon binôme Ahlem et toute la famille Sakhri

.A mes oncles, tantes, cousins et cousines de la famille Aoulmi et Ghalossi sans
exception.

Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

Affectueuse reconnaissance.

A mes amis intimes Saja ,jalile, Doha,Nour, Hipa

A mes camarades de la promotion de la biochimique 2018-2019.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce

Projet soit possible, je vous dis merci.

LEILA

Liste des planches

planche N° :	Titre	Page
01	Structure de 1-méthylimidazole	04
02	Structure de 5-nitroimidazole	05
03	Structure de l'alcool benzylique.	06
04	Structure générale de l'œil	15
05	Coupe sagittale au niveau du rein	25
06	Coupe transversale au niveau de la cornée d'un œil sain	33
07	Coupe transversale au niveau de l'iris d'un œil sain	33
08	Coupe transversale au niveau de procès ciliaire d'un œil sain	34
09	Coupe transversale au niveau de cornée d'explant traité avec de 1 méthyle-5-nitroimidazoles	36
10	Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec de 1 méthyle-5-nitroimidazoles	36
11	Coupe transversale au niveau de corps ciliaire d'explant traité avec de 1 méthyl-5-nitroimidazole	37
12	Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol	39
13	Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol	39
14	Coupe transversale au niveau de procès ciliaire d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol	40
15	Coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec des -5-nitroimidazole	42
16	Coupe transversale au niveau de l'iris d'explant traité avec des -5-nitroimidazole	42
17	Coupe transversale au niveau de procès ciliaire d'explant traité avec des -5-nitroimidazole	43
18	Coupe transversale au niveau de sclérotique d'un œil sain	45

19	Coupe transversale au niveau de la choroïde d'un œil sain	45
20	Coupe transversale au niveau de la rétine d'un œil sain	46
21	Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	48
22	Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	48
23	Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	49
24	Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol	51
25	Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol	51
26	Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol	52
27	Coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec des -5-nitroimidazole	54
28	Coupe transversale au niveau de la choroïde d'explant traité avec -5-nitroimidazole	54
29	Coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec des -5-nitroimidazole	55
30	Coupe transversale au niveau du cortex d'un rein sain	57
31	Coupe transversale au niveau du médula d'un rein sain	57
32	Coupe transversale au niveau du médula d'un rein sain	58
33	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	60
34	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	60
35	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	61
36	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	61

37	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	62
38	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	63
39	Coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	63
40	Coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	63
41	Coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	64
42	Coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	64
43	Coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	65
44	Coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec des 1 méthyl-5-nitroimidazole	65
45	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	67
46	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	67
47	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	68
48	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	68
49	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	69
50	Coupe transversale au niveau du cortex rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	69
51	Coupe transversale au niveau du médula rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	70
52	Coupe transversale au niveau du médula rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	70

53	Coupe transversale au niveau du médula rénale d'explant traité avec des 4-nitrobenzyl alcohol	71
54	Coupe transversale au niveau du cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazole	73
55	Coupe transversale au niveau du cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazole	73
56	Coupe transversale au niveau du cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazole	74
57	Coupe transversale au niveau de médula d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazole	74
58	Coupe transversale au niveau du cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazole	75
59	Coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec 5-nitroimidazole	75
60	Coupe transversale au niveau de médula d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazole	76

Liste des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ARN :	Acide Ribonucléique
BHR :	Barriere Hémato-Rétinien
BME :	Eeagle's Basale Médium
CO2 :	Dioxyde De Carbone
CM :	Cellule Microgliale
CPE :	Couche Plexiforme Externe
CPI :	Couche Plexiforme Interne
CGM :	Cellule Gliale De Muller
DMEM :	Dulbecco Modified Eagles Méduim
DMSO :	Diméthyle Sulfoxide
EPR :	Épithélium Pigmentaire De La Rétine
GABA :	Acide Gamma-Aminobutyrique
GMEM :	Glasgow Minimum Essential Medium
HEPES:	Hydroxyétyle Pipérazine Ethan Sulfonique
H+:	Proton
IMDM:	Iscove's Modified Dulbecco Medium
INO2 :	1-méthyl-2nitroimidazole
MEM:	Eeagle's Minimum Essential Medium
N:	Azotes
NO- :	Anion Nitroxyle
NO2:	dioxyde D'Azote
OH° :	Radical Hydroxyl
OH2:	d'hydrogène oxygén
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PH:	Potentiel D'hydrogène

RNO₂: Radicale D'oxyde D'azote

SVF : Sérum de Veau Fœtale

UV: Ultra Violet

Introduction

Introduction

Les composés nitrés sont des molécules portant une fonction nitro NO₂. Il peut s'agir de nitroalcanes ou de nitro-aromatiques. Ces derniers peuvent être de différentes natures et être utilisés dans différents domaines. Ils sont souvent utilisés comme thérapie antibactérienne.

Le composé imidazole est un composé fréquemment utilisé en biologie. Il est un composé cyclique à cinq chaînons (aromatique) composé de trois atomes de carbone (C) et de deux atomes d'azotes (N). L'imidazole et ses dérivés sont des composés présents dans bon nombre de molécules d'intérêt biologique (purine, guanosine, adénine, histidine, et autres protéines et hormones associées...), et entrent dans la structure de nombreux principes actifs pharmaceutiques. (Zama, 2015)

Les nitroimidazoles sont des dérivés des imidazoles, sont de structure hétérocyclique possédant un groupement nitro et qui sont utilisés pour combattre les infections à bactérie anaérobie et parasitaire. Les dérivés 5-nitroimidazole représentent une classe de composés d'intérêt pharmacologique bien établie, et sont connus principalement pour leur activité anti-infectieuse. Le premier né et chef de file de cette famille est le Métronidazole (1-méthyl-5-nitroimidazole).

Un autre composé nitré, le 4-nitrobenzyl alcool, dérive de l'alcool benzyl qui est substitué à la position para par un groupe nitro. La molécule mère, le benzyl alcool, est utilisée dans une large variété de formulations cosmétiques et médicinales en tant que composé odorant, conservateur, solvant et comme agent diminuant la viscosité. Dans les produits médicinaux, il est utilisé dans les antibiotiques en intramusculaire, dans les médicaments anti-inflammatoires et neuroleptiques ou dans les médicaments anticancéreux et cardiovasculaires intraveineux mais également de manière topique dans les produits anti-inflammatoires et antifongiques (Xie *et al.*, 2015). L'un des dérivés du benzyl alcool est le 4-nitrobenzyl alcool qui est également utilisé comme agent anticancéreux non mutagène. Parmi les bactéries ciblées par les composés nitrés font partie les bactéries impliquées dans la méthanogenèse chez les bovins, activité qui constitue une perte en énergie pour l'animal. Des études ont montré la grande utilité de ces composés dans la réduction de ces micro-organismes afin de réduire la production de méthane.

Introduction

L'objectif de notre étude est d'évaluer les effets de molécules nitrées synthétiques (4-nitro benzyl alcool ,1méthyl-5-nitroimidazol, 5-nitroimidazol) sur les différentes structures de l'œil et de rein de lapin pour une éventuelle utilisation sans risque chez les bovins.

Notre présente étude a porté sur :

- La culture cellulaire des explants oculaires et rénaux de lapin a été réalisée en présence et absence des trois molécules nitrées synthétiques.
- Une étude histologique des explants.

Synthèse
Bibliographiques

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1. Les molécules nitrées synthétiques

1.1. Généralités sur les imidazoles

L'imidazole ou 1,3-diaza-2,4-cyclopentadiène est un cycle à cinq chaînons qui contient deux atomes d'azote séparé par un atome de carbone. De structure plane, l'imidazole est un composé aromatique qui présente une très grande stabilité thermique, il ne se décompose qu'à partir de 500°C. Parmi les 6 électrons délocalisés, une paire d'électrons est fournie par un atome d'azote et 4 é, comme dans le pyrrole. Dans la mesure où les 6 électrons sont répartis sur 5 atomes, l'hétérocycle est dit « π -excédentaire ».

Ainsi, l'imidazole a un caractère basique assez fort et un caractère acide faible mais plus élevé que ceux du pyrrole, de l'éthanol, et autres 1,3-oxazole et thiazole. (Zama, 2015).

L'imidazole et ses dérivés non substitués en position 1 ont des points de fusion et d'ébullition plus élevés que ceux des dérivés du pyrrole, des oxazoles et thiazoles correspondants. Cela est principalement dû à la formation de ponts «hydrogène» intermoléculaires, liés au caractère amphotère (ou donneur-accepteur) de cet hétérocycle. (Zama, 2015)

En phase solide, ces composés sont associés sous forme de chaînes très structurées qui composent le système « fibreux » dans les cristaux. En biologie, au pH physiologique, l'imidazole fonctionne à la fois comme accepteur et donneur de proton au site actif de toute une variété d'enzymes (Zama, 2015).

1.1.1. Méthylimidazole

Le 1-méthylimidazole ou le N-méthylimidazole est un composé hétérocyclique aromatique de formule $\text{CH}_3\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2$, il s'agit d'un liquides incolore utilisé comme solvant spécialisé, base et précurseur de certains liquides ioniques c'est un hétérocycle azoté fondamental qui, en tant que tel, limite diverses bases nucléotidiques, ainsi que l'histine et l'histamine.

Le 1-méthylimidazole est également le précurseur de la synthèse du monomère méthylimidazole de polyamides pyrrole –imidazole, ces polymères

peuvent se lier sélectivement à des séquences spécifiques d'ADN double brin en s'intercalant dans une séquence dépendante de la séquence de manière dépendant.

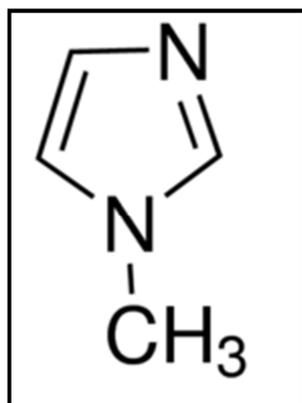


Planche 01 : structure de 1-méthylimidazole.

1.1.2. Les nitroimidazol

Il est bien établi que certains dérivés de nitroimidazol sont des substances bioactives dans différents domaines et que la position du groupement nitro sur le noyau imidazole définit, en général, leur spectre d'action. Un certain nombre d'entre eux sont utilisés pour le traitement des infections causées par les protozoaires et les bactéries anaérobies. (**Jokipii et al., 1981**).

A. Activité biologique des nitroimidazol

Actuellement les nitroimidazoles représentent une série de substances actives dans différents domaines, la position du groupement nitro sur le noyau imidazole définissant leur spectre d'action (**Bahnous, 2007**).

Les nitroimidazoles ont ainsi un large spectre d'action, outre leurs actions antiparasitaires sur *Entamoeba histolytica*, *Giardaintestinalis* et *Trichomonas Vaginales*, les 5-nitroimidazol possèdent une activité antibactérienne originale s'exerçant sur les bactéries anaérobies strictes et ont fait l'objet de nombreux travaux comme composés anticancéreux pour leur activité radio sensibilisante. Les 2-nitroimidazoles ont essentiellement une action sur *Trypanosoma cruzi*, ayant de la maladie de Chagas et peuvent aussi être utilisées en cancérologie (**Bahnous, 2007**).

B. Les 5-nitroimidazol et leur mode d'action

Les 5-nitroimidazoles sont des hétérocycliques, structure constituée d'un noyau à base d'imidazole avec un groupe nitroNO₂, en position 5. Les 5 nitroimidazoles bien établi de produits pharmaceutiques (**Bahnous, 2007**).

Bien que le mode d'action ne soit pas encore bien connu, différentes hypothèses font intervenir:

- Soit la réduction mono électronique:



- Soit une attaque radicalaire:



En fait, qu'il s'agisse d'un protozoaire ou d'une bactérie anaérobie, les 5-nitroimidazoles pénètrent à travers la paroi cellulaire, ils entrent en compétition comme accepteurs d'électrons avec des protéines transporteuses d'électrons telle la ferrédoxine. En séquestrant les électrons, ils empêcheraient la libération d'hydrogène au cours de la réaction pyruvate-phosphoroclastique réaction essentielle pour le métabolisme du pyruvate et la production d'énergie chez les microorganismes. Les produits de réduction qui en résultent, se fixent sur l'ADN inhibant sa synthèse. L'action s'explique de la même façon par réduction du 5-nitroimidazole par la réduction qui induit alors sa liaison à l'ADN de la cellule sous condition d'hypoxie ou d'anoxie. Réduction du métronidazole (I) en acétamides et en acide N-(2-hydroxyéthyl) oxomique (V). Trois composés intermédiaires pouvaient se former (**Bahnous, 2007**) :

* 5-nitroso (II).

* 5-(N-hydroxy) amino (III).

* 5-amino (IV).

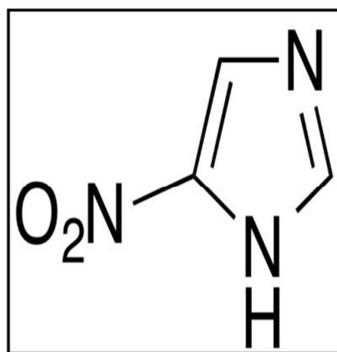


Planche 02 : structure de 5-nitroimidazole.

1.2. L'alcool benzylique

L'alcool benzylique est un type d'alcool, de formule semi-développée c'est un $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$. Liquide incolore, inflammable et irritant et n'est pas soluble dans l'eau,

que l'on trouve naturellement dans certaines plantes mais qui peut aussi être synthétisé, L'alcool benzylique est un ingrédient utilisé dans les pharmaceutiques, les cosmétiques et les produits ménagers, il est populaire en raison de ses propriétés antibactériennes et antifongiques, il peut causer une dermatite de contact allergique sévère dans un pourcentage significatif de la population.

L'alcool benzylique a une faible toxicité aiguë il s'oxyde rapidement chez les individus en bonne santé en acide benzoïque, il est toxique pour les nouveau nés L'alcool nitrobenzylique sont des hétérocyclique, structure constitué d'alcool benzyliques avec groupement nitro NO₂.

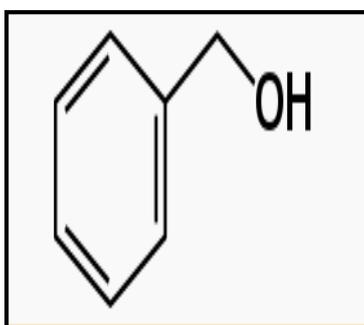


Planche 03 : structure de l'alcool benzylique.

I.2. La culture cellulaire

La culture cellulaire est un procédé qui permet aux cellules de se reproduire en dehors de leur milieu de vie naturel ou de l'organisme dont elles proviennent. Technique utilisée pour faire croître et se multiplier des cellules en dehors de l'organisme d'origine « *ex vivo* ». Ces cultures sont réalisées dans le cadre de recherches ou comportent une finalité thérapeutique. Les techniques de fécondation *in vitro* (ou de procréation médicalement assistés) en sont un exemple. Des cultures de cellules de la peau sont aussi utilisées pour réaliser des greffes.

2.1. Origine et obtention des cellules

On distingue 2 types de cellules dans l'organisme :

- **les cellules circulantes** : (sang, lymphe, ascite, épanchement pleural)

Les cellules libres, ou circulantes, sont obtenues par centrifugation après prélèvement par des techniques de type ponction, prise de sang...

- **les cellules cohésives** : (prélèvement tissulaire).

Les cellules en cohésion sont obtenues grâce à 2 grands procédés : les méthodes de dissection ou les méthodes enzymatiques. (Adolphe, 1988).

- La culture de cellules obtenues à partir d'organe ou de tissu est appelée primoculture ou culture primaire.

2.1.1. Etablissement de la culture à partir d'un tissu solide

A. Méthode de dissection mécanique

Cette méthode facilement réalisable et n'entraînant pas de dommage cellulaire, est la technique de choix pour les fragments de petites tailles. Le tissu primaire est découpé en fragments à l'aide de pinces, puis incorporés dans un flacon de culture contenant le milieu nutritif. Les cellules vont alors migrer à partir des explants puis se multiplier.

B. Méthode enzymatique

Cette méthode repose sur la digestion enzymatique de la trame protéique entourant les cellules, permettant ainsi leur libération. Ainsi sont classiquement utilisées des enzymes protéolytiques telles que la trypsine, la collagénase, la hyaluronidase, l'élastase, la dispase ou encore la papaïne. Il est important lors de la réalisation de cette technique, d'adapter la concentration des enzymes à la nature du tissu traité de façon à obtenir la meilleure dissociation possible sans atteinte des membranes cellulaires (**Macleod et Langdon, 2004**).

2.1.2. Etablissement de la culture à partir d'une suspension cellulaire

Comme cela a été précisé précédemment, l'établissement d'une culture à partir d'un échantillon liquidien sera plus facile à réaliser qu'à partir d'un tissu solide, du fait de l'état déjà en suspension des cellules.

Après récolte, le prélèvement est centrifugé pendant 20 minutes à 3000 g à 4 °C, afin de récupérer le culot cellulaire qui est ensuite remis en suspension dans une solution tampon de PBS.

Si, parmi les cellules, beaucoup d'érythrocytes et de débris cellulaires sont présents, il est utile de réaliser un gradient de Ficoll. Le principe de celui-ci repose sur la différence de densité qu'il existe entre les globules rouges et les autres cellules : 10 ml du milieu de culture contenant les cellules sont placés sur 10 ml de Ficoll, puis le tout est centrifugé à 1000 g pendant 20 à 30 minutes. Les érythrocytes étant plus

denses que le Ficoll, ces derniers vont sédimenter au fond du tube, tandis que les cellules tumorales resteront à la jonction milieu/Ficoll.

Les cellules sont ainsi récupérées à l'interface à l'aide d'une pipette, puis remise en suspension dans une solution tampon PBS. Une troisième centrifugation est alors réalisée à 600 g pendant 5 minutes pour finalement récupérer les cellules et les remettre définitivement en culture dans un milieu de culture complet (**Dupon, 1989**).

2.2. Méthodes de culture

2.2.1. Méthode de culture stationnaire ou en monocouche

Cette méthode de culture repose sur la propriété des cellules à avoir une affinité particulière pour un type de substrat, leur permettant ainsi d'y adhérer et de s'y développer. Il existe plusieurs types de support permettant la croissance cellulaire : le plus souvent en polystyrène, ils peuvent être également recouverts de diverses substances physiologiques favorisant le développement des cellules. Pour permettre une croissance et une différenciation cellulaires, la plupart des cellules cancéreuses ont en effet besoin d'interagir avec un substrat. (**Langdon, 2004**) Le plastique le plus courant est le polystyrène, mais le polycarbonate, le polytétrafluoroéthylène, ou encore le polyvinyle sont également couramment utilisés.

L'utilisation d'un tel substrat nécessite un traitement chimique ou radioactif pour produire une charge de surface et ainsi faciliter la prolifération cellulaire. De plus si l'adhésion cellulaire se fait difficilement, le substrat peut être soit recouvert de composants de la matrice-extracellulaire comme la fibronectine, le collagène, ou encore la laminine, soit recouvert de sérum ou de milieu conditionné par des cellules productrices de matrice-extracellulaire.

D'autres systèmes plus complexes de matrice de collagène en trois dimensions permettent d'obtenir une différenciation morphologique et biochimique des cellules plus complète, contrairement aux matrices de substrat en seulement deux dimensions. (**Langdon, 2004**).

Dans ces systèmes tridimensionnels, les cellules sont incorporées dans du gel d'agarose ou de collagène, permettant ainsi de recréer le plus fidèlement possible les

conditions tissulaires *in vivo*, et le maintien des fonctions différenciées. (**Adolphe, 1988**)

Les récipients utilisés peuvent être de différents types : flacons et boîtes de Pétri, tube de Leighton, microplaques, boîtes contenant des micro puits de différents diamètres et microporteurs. Les microporteurs sont des microbilles en plastique recouvertes ou non d'un substrat physiologique placées dans des récipients de type Erlen sur lesquels poussent les cellules. Elles sont soumises à une agitation modérée et permanente de façon à être en suspension dans le milieu de culture. En alliant à la fois le principe de culture stationnaire au principe de culture en suspension, ce système permet une augmentation de la surface et donc du rendement cellulaire, mais aussi un meilleur maintien des fonctions différenciées (**Adolphe, 1988**).

- Les trois systèmes différents de culture en monocouche

Les systèmes clos où les flacons sont placés dans des étuves classiques de type bactériologique. Si aucun renouvellement du milieu n'est effectué, on observe un appauvrissement des facteurs nutritifs avec modification du pH et de l'environnement gazeux, particulièrement néfastes (**Adolphe, 1988**) pour la culture surtout si le tampon utilisé est le tampon bicarbonate.

Les systèmes semi-clos constitués de boîtes de Pétri ou microplaques placées dans des étuves permettant un renouvellement permanent de l'atmosphère gazeuse (95% air, 5% CO₂). Ce système permet une meilleure régulation du pH et de l'environnement gazeux.

Les systèmes ouverts ou de perfusion : chambre de culture de type Pomerat, Rose ou Sykes et Moore. Ces systèmes ne sont utilisables que pour un petit nombre de cellules et pour des études nécessitant une observation en microscopie photonique.

2. 2.2. Méthode de culture en suspension.

Au sein de ces cultures, les cellules ne sont pas adhérentes à un support mais sont en suspension dans un milieu qui est en constante agitation, évitant ainsi que les cellules ne se déposent et se développent sur le récipient.

Ce système est principalement utilisé dans le cas de l'industrie cellulaire en masse, notamment dans la virologie ou la biotechnologie, avec la production de substances biologiques par les cellules en culture et la possibilité de cultiver des cellules en plus grande quantité. (**Adolphe, 1988**)

2.3. Conditions physico-chimiques

La culture en bioréacteur nécessite le maintien des cellules dans des conditions optimales équivalentes à celles *in vivo*. Il est donc nécessaire d'assurer le suivi et la régulation de certains paramètres opératoires présentés ci-dessous.

2.3.1. Température

La température du milieu de culture doit être régulée de façon précise. La température optimale de croissance des cellules animales est de 37°C, mais la croissance reste satisfaisante pour des températures comprises entre 36,5 °C et 38°C (**Ducommun et al., 2002**).

2.3.2. pH

Les cellules animales tolèrent de faibles variations de pH et doivent, par conséquent, être cultivées dans un milieu de culture dont le pH est compris entre 6,8 et 7,8 ; la valeur de pH optimale pour la croissance étant voisine de 7,2. Le milieu de culture est généralement tamponné par du bicarbonate de sodium. Au cours de la culture, les cellules peuvent produire de l'acide lactique en quantité importante. Le milieu de culture est alors maintenu à un pH proche de la neutralité par ajout de soude. La régulation du pH est essentielle car un pH inférieur à 7 peut provoquer une mort cellulaire importante (**Goergen et al., 1993**)

2.3.3. Oxygène dissous

L'oxygène est un élément essentiel pour la croissance des cellules animales. En effet sa consommation est généralement comprise entre 0,05 et 0,5 m mol O₂/h/10⁹ cellules. (**Ruffieux et al., 1998**).

2.4. Les composition de milieux de culture

2.4.1. Composants de base des milieux de culture

Il existe des éléments essentiels qui seront retrouvés dans la plus grande majorité des milieux de bases et qui sont indispensables pour la survie des cellules.tel que :

A. Les constituants minéraux :

En fonction de leur nature, les ions inorganiques peuvent intervenir dans le maintien du pH et l'osmolarité du milieu, le transfert de molécules à travers les membranes et comme cofacteurs enzymatiques. Ces ions sont notamment le calcium, le magnésium, le phosphate, le potassium et le sodium. Les ions métalliques (Fer, Magnésium, Cuivre, Zinc...) sont apportés à l'état de traces par le milieu de culture, car ils sont essentiels à la croissance cellulaire, participent au site actif de certaines enzymes et interviennent dans les réactions de la chaîne respiratoire. Ces ions sont indispensables et constituent la base des solutions salines telles que les solutions de Hanks ou encore d'Earle.

B. Les substances énergétiques

Elles sont la principale source en carbone des cellules cultivées, et sont ainsi garants également des synthèses métaboliques améliorant ainsi la survie cellulaire en culture. **(Froger et Adolphe, 1988)**.

Le principal glucide utilisé pour le métabolisme cellulaire énergétique est le D-glucose à dose de 1 g/L dans le milieu cellulaire, ce qui correspond environ à la concentration sanguine physiologique.

En outre, d'autres substances énergétiques peuvent être utilisées en remplacement comme le mannose, le galactose ou encore le fructose qui possèdent les mêmes propriétés énergétiques que le glucose. **(Froger et Adolphe, 1988)**

C. Les acides aminés :

Les acides aminés régulent à la fois les systèmes enzymatiques mais aussi le cycle cellulaire en jouant sur la synthèse des acides nucléiques tels que l'ADN ou les ARN. **(Froger et Adolphe, 1988)** .ils s'agit Tyrosine, Arginine, Histamine et L-glutamine l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. Les concentrations en acides aminés sont variables en fonction du milieu de culture considéré.

D. Les vitamines et autres substances :

Les vitamines sont des molécules organiques requises en faible quantité, qui ne peuvent pas être synthétisées et doivent donc entrer dans la composition du milieu de culture. Ce sont surtout des vitamines hydrosolubles: l'acide nicotinique et la thiamine, la riboflavine, l'acide pantothénique, la pyridoxine, la biotine, la cobalamine, l'acide folique. Ces vitamines interviennent en tant que coenzymes ou

dans la composition des coenzymes. La vitamine C est également une substance anti-oxydante. Certains auteurs ont montré que les concentrations de certaines vitamines dans les milieux classiques pouvaient être insuffisantes et conduire à la limitation de la croissance cellulaire (**Kurano *et al.*, 1990**). De plus, la concentration d'une vitamine dans un milieu de culture est susceptible de modifier la vitesse de croissance cellulaire ainsi que la productivité.

D'autres molécules peuvent être rajoutées au milieu de culture comme des hormones, des précurseurs d'acides nucléiques ou encore des substances lipidiques. L'utilité de ces ajouts est discutable en sachant que le sérum contient lui-même les hormones et les lipides nécessaires à la croissance cellulaire, et que certaines molécules peuvent être synthétisées par les cellules elles même en présence des éléments primaire du milieu de culture : par exemple les précurseurs d'acides nucléiques peuvent être synthétisés en présence d'acide folique. (**Froger et Adolphe, 1988**)

2.4.2. L'utilisation des facteurs de croissance

In vivo, les facteurs de croissance jouent un rôle primordial dans le développement cellulaire, depuis l'embryogenèse jusqu'à la sénescence, par le biais de sécrétions autocrines ou paracrines. C'est en s'inspirant de ces conclusions, qu'ils ont été amenés à être utilisés en culture cellulaire et ont permis ainsi, via leur fonction de second messenger, une optimisation des Cultures. (**Courtois et Noureux, 1998**)

2.5. Les différents types de milieux.

En distingue deux types de milieux de culture différents :

2.5.1. Les milieux semi-synthétiques

Les milieux semi-synthétiques reposent sur la combinaison d'un milieu de base contenant tous les éléments nutritifs nécessaires, et de l'ajout de sérum à raison de 10% permettant ainsi d'optimiser la croissance cellulaire.

✓ **Les milieux de base**

Les milieux de base utilisés en culture cellulaire contiennent le plus souvent des éléments minéraux, des acides aminés et organiques, des vitamines, un tampon, un indicateur de pH et une source carbonée. Plusieurs milieux de base, élaborés il y a plus de 40 ans, sont disponibles. (**Dupond, 1989**).

- Le milieu de base Eagle (BME : Eagle's Basal Medium), capable de supporter la croissance cellulaire d'un grand nombre de types cellulaires.

- Le milieu MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) avec augmentation du taux d'acides aminés par rapport au milieu BME.

- Le milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium), milieu dérivé du milieu BME, contenant 4 fois plus de vitamines, acides aminés et glucose que la formule originale.

- Le milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium), dérivé du milieu DMEM, et conçu spécialement pour la culture de cellules hématopoïétique ; il est caractérisé par la présence de sélénium, d'acides aminés et de vitamines supplémentaires, de pyruvate de sodium et par l'utilisation d'une solution tampon type HEPES.

- Le milieu GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium), dérivé du milieu BME et conçu pour étudier les facteurs influençant sur la fonctionnalité cellulaire. Il est particulièrement enrichi en vitamines et acides aminés.

Ils sont généralement complétés par l'ajout de divers composants tels que des lipides, des protéines, des acides aminés, des facteurs de croissance, des cytokines, des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) des antifongiques.

✓ **Les sérums**

De sérum de 2 à 20 % du volume. On utilise généralement du sérum de veau fœtal. Il apporte des facteurs favorisant la multiplication cellulaire : facteurs de croissance, protéines d'adhésion, protéines de transport, oligo-éléments. Il augmente les capacités des tampons et possède une action protectrice sur les cellules en agitation. Il contient des inhibiteurs de protéases (inactive la trypsine utilisées lors de repiquage).

2.5.2. Les milieux définis

De composition parfaitement connues et suffisant à eux-mêmes. les contiennent les mêmes constituants que les milieux semi-synthétique mais tout est quantifié. Ces milieux, bien adaptés à la culture cellulaire, peuvent être adaptés à la production, cependant ils sont chers car tous les constituants sont hautement purifiés. (**Dupon, 1989**)

I. 3. Structure de l'œil :

L'œil ou globe oculaire est l'organe du sens de la vision, il est directement relié au cerveau par le nerf optique. C'est un organe pair assurant une vision stéréoscopique. Il possède une vascularisation, une innervation et un appareil oculomoteur spécifique. (Gualino., 2009). Il est un organe délicat qui est protégée par plusieurs structures telles que les sourcils, les paupières, les cils et les muscles extra-oculaires.(Agarwal *et al.*, 2002).Des processus physiologiques et psychologiques mettant en œuvre la vision nous permettent de nous représenter les formes, les couleurs, la distance, le relief...., Les illusions d'optique montrent bien que l'œil n'est pas le seul responsable de la perception de l'image.

3. 1. Histologie de l'œil :

Appartenant au système nerveux central, l'œil est relativement bien isolé du reste de l'organisme grâce à ses barrières hémato-rétiniennes. Il peut être décomposé en deux parties (Figure 04) : le segment antérieur (SA) composé de la cornée, l'humeur aqueuse, l'iris, les corps ciliaire et du cristallin ; et le segment postérieur (SP), composé du vitré, de la rétine, de la choroïde et de la sclère. Le segment antérieur est constitué d'éléments optiques permettant de focaliser les rayons lumineux sur la rétine et de collecter les images du monde extérieur.(Caroline, 2011).

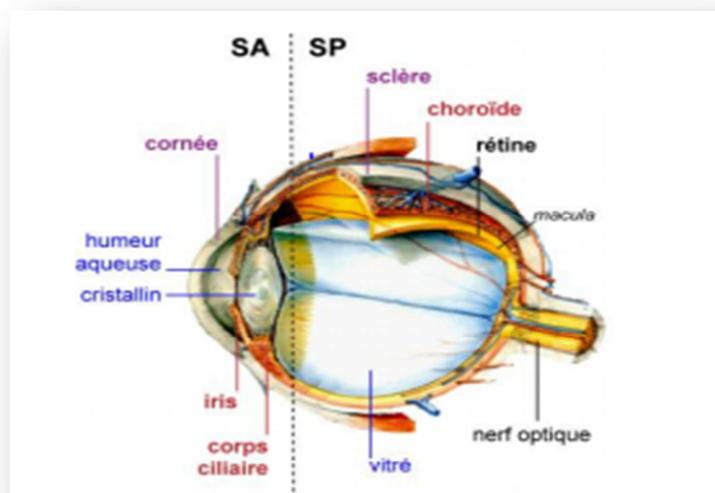


Planche 04 : Structure général de l'œil. (Caroline, 2011).

3.2. Segment postérieur de l'œil

3.2.1. La rétine

La tunique plus interne de l'œil, la rétine, est la partie sensorielle de l'œil, constituée de l'épithélium pigmentaire rétinien et de la rétine neurosensorielle. Au centre de l'axe optique se trouve la macula lutea, au centre de laquelle sont située la fovéa, la zone rétinienne la plus sensible. C'est un tissu sensible et fragile. Elle a comme épaisseur 1/10 à 4/10 de mm. Elle est très vascularisée : important réseau de veines et artères.

Elle est composée de centaines de millions de cellules. Le rôle de ces cellules est capital. Elles permettent de voir les détails, les lumières, les couleurs, les formes et les mouvements. La lumière qui pénètre dans l'œil doit traverser la rétine pour atteindre la couche sensible des cellules. Ce sont ces cellules qui captent l'influx nerveux et le transmettent au cerveau pour le décoder et former une image.

A. Histologie de la rétine

a- L'épithélium pigmentaire de la rétine

L'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) est une monocouche de cellules hexagonales très différenciées, reposant sur une membrane basale, la membrane de Bruch. L'EPR participe avec la membrane de Bruch et la choriocapillaire sous-jacente à la constitution de la barrière hémato-rétinienne (BHR) qui permet le transport sélectif des nutriments à partir de la circulation générale vers la rétine. Cette barrière est assurée grâce aux complexes jonctionnels apicaux (jonctions serrées) des cellules de l'EPR qui forment un filtre sélectif au passage des métabolites à partir de la choroïde. Dans la région externe de la rétine, les cellules de l'EPR sont en contact direct avec les segments externes des photorécepteurs dont elles assurent la phagocytose et participent ainsi à leur renouvellement. Le cytoplasme des cellules de l'EPR contient la mélanine (dans des vésicules appelées mélanosomes) qui joue un rôle de filtre contre les rayons UV et la lumière du spectre visible.

b- Les cellules neuronales**La rétine neuronale**

La rétine neurale est organisée en 3 couches de neurones , les photorécepteurs (ou couche nucléaire externe (CNE), les neurones secondaires ou intermédiaires (ou couche nucléaire interne (CNI), et la couche des cellules ganglionnaires (CCG), séparées par 2 couches synaptiques, les couches plexiformes interne (CPI) et externe (CPE).

1. Les photorécepteurs

Il s'agit de neurones hautement spécialisés responsables de la conversion de l'information lumineuse en information nerveuse par le phénomène de la phototransduction. (Naima ,2012)

Il existe deux types de photorécepteurs possédant une morphologie et des fonctions relativement différentes : les bâtonnets et les cônes. Ces deux types de photorécepteurs possèdent chacun une partie distale spécialement dédiée à la capture de la lumière et composée de segments externes et internes et connectée au corps cellulaire.

- Les bâtonnets

Ils sont responsables de la vision nocturne (vision scotopique). Ces photorécepteurs sont également responsables de la perception de la forme des objets. Ils captent la lumière par l'intermédiaire de la rhodopsine et sont caractérisées morphologiquement par un segment externe long et cylindrique en forme de bâtonnet.

-Les cônes

Ils sont responsables de la vision diurne (vision photopique) et de la vision des couleurs. Les cônes se caractérisent morphologiquement par un noyau plus gros que celui des bâtonnets ainsi qu'un segment externe plus court et plus large en forme de cône.

2. Les neurones intermédiaires

Ce sont les cellules neuronales qui traitent directement (les cellules bipolaires) ou indirectement (les cellules horizontales et amacrines) l'information transmise par les photorécepteurs. Toutes ces cellules ont leur corps cellulaire situé au niveau de la couche nucléaire interne. (Naima ,2012)

- Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires sont responsables de la transmission de l'information nerveuse provenant des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires et amacrines, et sont classées en fonction du type de photorécepteurs avec lesquelles elles sont en contact. Ainsi, les dendrites d'une cellule bipolaire à bâtonnets peuvent entrer en contact avec les synapses de près de soixante-dix bâtonnets, alors que leurs axones se prolongent vers la partie la plus interne de la couche plexiforme interne (CPI) où ils entrent en contact avec les dendrites des cellules ganglionnaires ainsi qu'avec les prolongements des cellules amacrines.

-Les cellules horizontales

Les cellules horizontales participent à la modulation de l'information lumineuse transmise par les photorécepteurs, par le phénomène d'inhibition latérale suite à la libération d'acides aminés inhibiteurs, et en particulier l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Les cellules horizontales possèdent une arborisation dendritique très étendue, mais uniquement dans la couche plexiforme externe (CPE).

-Les cellules amacrines

La grande majorité des cellules amacrines sont situées dans la partie proximale de la neurone nucléaire interne (CNI) bien que certaines cellules amacrines dites déplacées soient retrouvées dans la couche des cellules ganglionnaires (CCG). Cependant si leur fonction commune est de moduler les signaux dans la couche plexiforme interne (CPI), jusqu'à cinquante types différents ont pu être différenciés, en fonction de leurs morphologies et caractéristiques neurochimiques. L'un des points communs de ces cellules est celui de ne pas posséder d'axone

et de contenir des acides aminés inhibiteurs, notamment la glycine et le GABA .

-Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires collectent les informations visuelles qui ont traversé l'ensemble de la rétine, et les transmettent au cerveau via le nerf optique formé par leurs axones. Leurs corps cellulaires projettent leurs dendrites dans la CPI où elles forment des synapses avec les cellules bipolaires et les cellules amacrines. (Naima ,2012)

3. Les cellules de soutien de la rétine

- Les cellules gliales

Il existe 3 principaux types de cellules gliales dans la rétine, les cellules gliales de Müller, les astrocytes, et les cellules microgliales.

-Les cellules gliales de Müller

Les cellules gliales de Müller (CGM) sont les principales cellules gliales de la rétine. Les CGM, du fait de leur disposition radiale de part et d'autre de la rétine neurale, jouent un rôle primordial dans l'homéostasie rétinienne, assurant à la fois un soutien morphologique et physiologique pour l'ensemble des cellules de la rétine.

- Les astrocytes

Les astrocytes sont principalement présents dans la couche des cellules ganglionnaires. Leurs prolongements, en contact avec les vaisseaux sanguins et les cellules ganglionnaires, leur confèrent des rôles divers. Ainsi, les astrocytes forment un réseau jouant un rôle de soutien et de maintien des structures rétinienne.

-Les cellules Microgliales

Les cellules micro gliales (CM), en faible nombre dans la rétine, sont retrouvées principalement au niveau de la CCG, mais aussi au niveau de la CNI, de la CPI et de la CPE chez l'adulte. Ces cellules résidentes, qui possèdent un rôle de sentinelle dans le système nerveux central et la rétine, sont nécessaires à

l'homéostasie neuronale et à la défense immunitaire innée. Ces cellules phagocytaires très mobiles peuvent être retrouvées activées en diverses structures de la rétine.

3.2.2. La choroïde

La choroïde appartient à la tunique intermédiaire de l'œil, « l'uvée ». Pigmentée par des mélanocytes, cette membrane est fortement vascularisée, permettant ainsi l'apport de nutriments et d'oxygène aux photorécepteurs de la rétine. Elle s'épaissit dans le segment antérieur pour former l'iris et les corps ciliaires.

Chez la plupart des mammifères, excepté par exemple les humains, les porcs et les lapins, derrière la rétine, se trouve également le tapetum lucidum. Cette couche réfléchissante agit comme un amplificateur de lumière qui est important pour les animaux particulièrement actifs la nuit.

3.2.3. La sclère :

La sclère, également appelée sclérotique, correspond au « blanc de l'œil ». Elle constitue la tunique externe du segment postérieur et se prolonge dans le segment antérieur jusqu'à la cornée. Elle enveloppe ainsi les 5/6^e du globe oculaire, assurant sa rigidité et son tonus. Ce tissu de protection à structure tendineuse, particulièrement résistant, permet de contenir la pression intraoculaire tout en protégeant l'œil des agressions mécaniques et thermiques. Son épaisseur varie d'environ 530 µm à la jonction cornéosclérale à environ un millimètre dans sa partie postérieure où il est traversé par le nerf optique

La sclère est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, des trois éléments suivants : la lame épisclérale (Lamina episcleralis), la substance propre de la sclère (Substantia propria sclerae) et la lamina fusca de la sclère (Lamina fuscasclerae).

- **La lame épisclérale :** est séparée de la gaine du bulbe (Vagina bulbi), anciennement "capsule de Tenon", par l'espace episcléral (Spatium episclerale), sauf à certains endroits où elle fusionne avec cette gaine. Constituée de tissu conjonctif lâche, très richement vascularisée, elle représente une structure nourricière pour la sclère, par ailleurs pratiquement avasculaire. (Caroline ,2011)

- **La substance propre de la sclère :** communément appelée "stroma", contient tous les éléments rencontrés dans le tissu conjonctif, en particulier des protéoglycanes et des fibrilles de collagène. A hauteur de l'anneau scléral (Anulus sclerae), ces dernières sont intimement mêlées à celles des tendons des muscles oculomoteurs, assurant à ceux-ci un ancrage solide.

- **La lamina fusca de la sclère :** d'organisation à peu près comparable à celle de la substance propre, est la structure sclérale la plus interne, en continuité avec la lame suprachoroïdienne (Lamina suprachoroidea) de la choroïde (Choroidea). C'est l'homologue de l'arachnoïde (Arachnoidea).

Bien qu'elle soit le lieu d'entrée et de sortie des vaisseaux du bulbe de l'œil, la sclère est très faiblement vascularisée, sauf dans la lame épisclérale. Celle-ci est en effet perfusée par les artères épisclérales (Aa. épisclérales) et contient de nombreuses anastomoses artério-veineuses. La sclère se nourrit essentiellement par imbibition à partir de la choroïde sous-jacente. Son innervation est assurée par les nerfs ciliaires qui donnent en particulier de riches plexus nerveux autour des anastomoses artério-veineuses épisclérales

3.2.4. L'humeur vitrée

Le vitré est une masse gélatineuse, entourée d'une fine membrane : la hyaloïde, qui contient 99% d'eau et représente un volume de 4 mL, soit 80% du volume oculaire.

3.3. Le segment antérieur de l'œil

Le segment antérieur de l'œil est composé de la cornée, de l'humeur aqueuse, de l'iris et du cristallin. On peut également considérer que la partie antérieure de la sclère fait partie de ce segment.

3.3.1. La cornée :

La cornée saine est un tissu transparent et avasculaire, la cornée tire son énergie métabolique du film lacrymal, de la conjonctive et de l'humeur aqueuse. Elle n'est vascularisée qu'au niveau de la jonction cornéosclérale, c'est à dire au niveau des boucles vasculaires du limbe irriguées par les vaisseaux de la conjonctive et de la choroïde. (Caroline, 2011)

La cornée est également fortement innervée, ce qui la rend très sensible au contact. De plus, premier tissu en contact avec l'extérieur, elle constitue une véritable barrière à l'entrée de molécules exogènes dans le globe oculaire. Comme le montre la coupe histologique d'une cornée, ce tissu, composé de trois tissus superposés et séparés par deux membranes, est particulièrement bien organisé.

L'épithélium : est constitué de 5 à 7 couches de cellules (superficielles, intermédiaires et basales) et épais d'environ 50 μm . De par la présence de liaisons fortes entre ses cellules superficielles, il joue un rôle de barrière et permet la dispersion du film lacrymal. Ses cellules s'auto-renouvellent grâce à des cellules souches conservées en périphérie de la cornée. Ce tissu a ainsi la capacité de se renouveler, en seulement 7 jours.

La couche de Bowman : est une membrane d'environ 10 μm d'épaisseur et acellulaire. Elle correspond à une condensation du stroma antérieur, composée essentiellement de protéoglycanes et de collagènes de type I et III. Ces fibrilles de collagène sont entremêlées, contrairement à l'organisation bien ordonnée des fibrilles stromales. Son rôle exact est mal connu mais elle est indispensable à la cicatrisation de l'épithélium. Cette membrane ne peut pas être régénérée en cas de traumatisme.

Le stroma cornéen : (épaisseur d'environ 500 μm) est composé à 80% d'eau, d'une matrice extracellulaire riche en glycosaminoglycanes et de fibrilles de collagène. Ces dernières sont majoritairement constituées de collagène de type I mais aussi de collagènes de type V et VI. Le collagène de type III est présent en faible proportion mais augmente en conditions pathologiques : cicatrisation ou inflammation

Le collagène fibrillaire est formé par assemblage de 6 molécules de tropocollagène. Les fibrilles, dont le diamètre est d'environ 30 nm, régulièrement espacées s'assemblent en lamelles de 1 à 2 μm qui sont distribuées selon un arrangement particulier, conférant à la cornée sa propriété de transparence et sa résistance mécanique. Au centre, le stroma contient plus de 300 lamelles parallèles à la surface et se différenciant successivement l'une par rapport à l'autre par une rotation entre 0° et 90° de leur orientation par rapport à la surface. (**Caroline, 2011**)

Ces derniers ne représentent que 2 à 3 % de son volume. Le rôle essentiel des kératocytes est de préserver la matrice extracellulaire en synthétisant des molécules de tropocollagène et des glycosaminoglycanes. Lors d'une agression, les kératocytes présents proches du site sont activés en fibroblastes et restaurent le stroma altéré.

La membrane de Descemet : est une fine couche d'une dizaine de micromètres, solide et élastique, perméable à l'eau. Elle est riche en différentes molécules : collagènes non de type IV et VIII, fibronectine, laminine et différents protéoglycanes. Histologiquement, la membrane de Descemet se présente sous la forme de deux couches bien stratifiées ayant une ultra-structure différente. La partie antérieure correspond à la membrane embryonnaire et la partie postérieure, amorphe, s'épaissit au cours de la vie.

L'endothélium : est une monocouche de cellules hexagonales, de 4 à 6 μm d'épaisseur et larges de 20 μm , organisées en nids d'abeille avec une densité d'environ 3500 cellules/cm². Contrairement aux cellules basales de l'épithélium chez l'homme, ces dernières n'ont pas la capacité de se régénérer. L'endothélium a un rôle fondamental dans l'entretien de la transparence de la cornée. Pour contrôler son hydratation, il agit comme une pompe à eau, en assurant en permanence des mouvements ioniques entre le stroma et l'humeur aqueuse. Il assure ainsi la fonction de transmission des rayons lumineux de la cornée. Lorsque la densité de cellules endothéliales n'est pas suffisante, ce rôle régulateur n'est plus assuré et un œdème plus ou moins important peut se former. Le manque ou la baisse trop importante du nombre de ces cellules entraîne une perturbation de la régulation entraînant une surhydratation de la cornée, responsable de son gonflement, d'une désorganisation de la structure microscopique et ainsi de la perte de la transparence macroscopique. La plupart des indications pour une greffe de cornée est associée à la présence d'un œdème. Le nombre de ces cellules endothéliales étant fixé à la naissance, lorsque l'une d'entre elles meure, ses voisines s'étendent pour combler l'espace libéré ce qui en fait une zone extrêmement fragile qu'il est important de préserver, notamment lors d'interventions chirurgicales (Caroline,2011)

3.3.2. L'iris

Appartenant à l'uvée de l'œil, ce tissu est vascularisé et forme une membrane circulaire et contractile. Par sa pigmentation, il donne la couleur de l'œil et il existe un nombre infini de pigments, allant du bleu ou vert au marron. En l'absence de pigmentation, l'iris prend la couleur du sang qui y circule. Par ailleurs, l'iris est innervé par des fibres nerveuses stimulant les muscles et les sphincters qui contrôlent la dilatation et la constriction de la pupille, le diaphragme de l'œil. Ce réflexe permet d'adapter la vision à la luminosité ambiante.

3.3.3. Le cristallin

Le cristallin joue le rôle d'une lentille biologique biconvexe. Comme tous les éléments impliqués dans le cheminement des rayons lumineux vers la rétine, ce tissu est non vascularisé et transparent. Le cristallin est situé juste en arrière de l'iris et attaché au corps ciliaire (portion antérieure de la choroïde). Situé en couronne derrière l'iris, le corps ciliaire est constitué d'une série d'environ 80 procès ciliaires contenant des fibres musculaires lisses, des vaisseaux sanguins et responsables de la sécrétion d'humeur aqueuse. Il contient également le muscle ciliaire dont la contraction contrôle la forme du cristallin, et donc l'accommodation.

La structure du cristallin est unique et particulièrement organisée. Il est formé de la périphérie vers le centre par : la capsule cristalloïde (ou cristalloïde) ; le cortex, constitué des corticales antérieure et postérieure, formées par l'apposition successive des fibres cristalliniennes issues de l'épithélium de la région équatoriale ; et du noyau adulte. C'est le seul tissu humain dont la transparence est assurée par la composition de ses cellules.

3.3.4. L'humeur aqueuse

Il s'agit d'un liquide transparent à faible viscosité, remplissant la chambre antérieure de l'œil, l'espace entre la cornée et le cristallin. Continuellement renouvelée, avec le corps vitré, elle maintient la pression intraoculaire, ainsi que la forme du globe. Sécrété par les procès ciliaires dans la chambre postérieure, ce liquide est constitué à 97 % d'eau. Il gagne la chambre antérieure en passant par la pupille puis est évacué via le trabéculum dans le canal de Schlemm qui rejoint les

veines aqueuses, « épisclérales », de la circulation générale . Si son évacuation est gênée, la pression intraoculaire s'élève et peut engendrer un glaucome. (**Caroline, 2011**)

I.4. Structure de rein

Le rein est un organe pair, situé dans l'étage sous diaphragmatique, enrétro-peritonéal, et de part et d'autre la colonne vertébrale (**Martin et al.,2008**)

4.1. Conformation externe

Le rein est un organe plein et encapsulé. Il est long de 3 cm en moyenne, large de 1,5 à 2 cm et pèse entre 8 à 12 g. Les deux reins représentent environ le 1/6 éme du poids du corps (**Barone, 1984**). Ils sont de coloration brunâtre et de consistance ferme sous la capsule. Mais, une fois décapsulé, le tissu rénal est relativement friable. En forme de haricot, les reins sont lisses et unis en surface. Ils présentent un hile au niveau de leur petite courbure. Aplatis dorso-ventralement, les reins sont constitués par :

✓ **2 faces**

une dorsale et l'autre ventrale et légèrement convexes Rein droit Rein gauche Uretère gauche Testicule gauche Muscle psoas Veine cave caudale Vessie Testicule droit.

✓ **2bords**

Un bord latéral qui est épais et convexe et un bord médial plus court, et profondément échancré par le hile où passent les vaisseaux, les nerfs et les uretère.

✓ **2 extrémités**

Dont une crâniale et une caudale arrondies et épaisses.

4.2. Conformation interne

Sur une coupe longitudinale, on distingue successivement en partant de la concavité :

4.2.1. Le hile

Contient le bassinnet. Celui-ci est une cavité de forme conique qui se prolonge à l'intérieur du rein par 2 ou 3 grands calices. Ces derniers se ramifient en 8 à 18 petits calices. (Martin *et al.*, 2008)

4.2.2. Le parenchyme rénal

Est organisé en couches concentriques de texture et de structure différentes. L'on peut observer 2 zones que sont une zone corticale qui est périphérique et une zone médullaire qui est centrale.

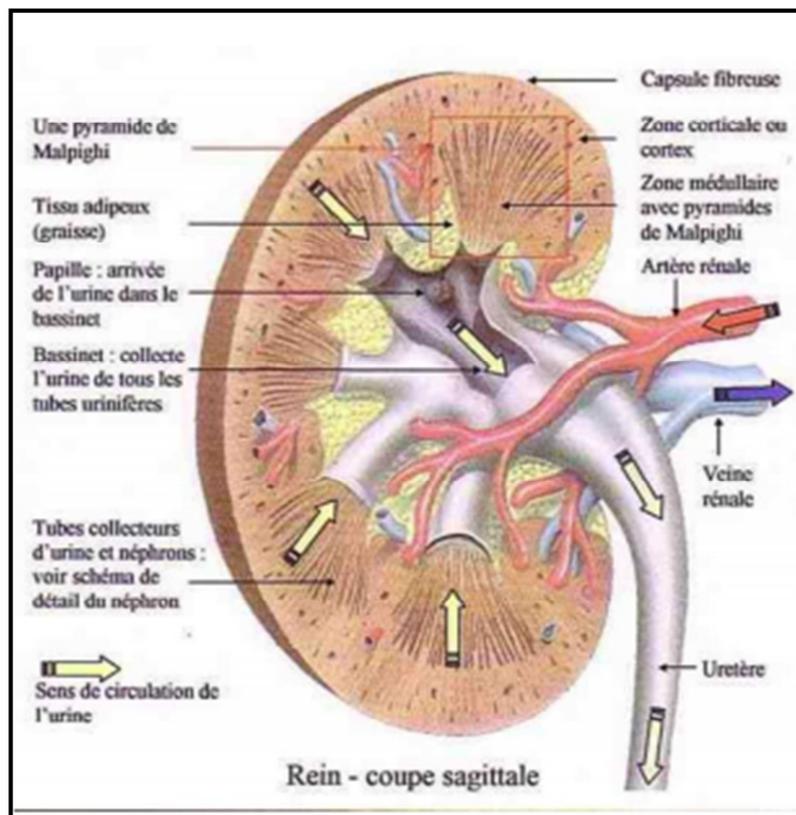


Planche 05 : coupe sagittale au niveau de rein. (Martin *et al.*, 2008)

4.3. Histologie de rein

4.3.1. La médullaire:

La zone interne du parenchyme, rouge. Elle a un aspect striée de façon radiaire.

Elle contient :

A. Les pyramides de Malpighi

Des structures coniques, au nombre de 8 à 18 par rein. Leur base est externe et leur pointe fait saillie au niveau d'un petit calice formant: la papille rénale qui est criblée d'orifices (10 à 20) : area cribrosa.

Les pyramides de Malpighi sont composées: des branches ascendantes et descendantes de l'anse de Henlé et des tubes collecteurs.

B. Les pyramides de Ferrein:

Ce sont des Irradiations médullaires partant de la base des pyramides de Malpighi pour s'infiltrer dans la zone corticale. Leur sommet est effilé vers la corticale. Leur nombre est 400 à 500 par pyramide de Malpighi. Elles contiennent la partie initiale des tubes collecteurs et des portions plus ou moins longues des anses de Henlé des glomérules corticaux. (**Martin et al ., 2008**)

4.3.2. La corticale :

Elle est composée des segments contournés des néphrons et corpuscules de Malpighi. Elle est faite de 3 zones :

A. Cortex corticis

Sous capsulaire peu épaisse, dépourvue de corpuscules de Malpighi.

B. Le labyrinthe rénal

Sous le cortex corticis et entre les pyramides de Ferrein.

C. Colonnes de Bertin

Entre les pyramides de Malpighi De point de vue topographique et physiologique:

- Lobe rénal

Est l'ensemble fonctionnel constitué par un petit calice, la pyramide de Malpighi sus-jacente, la moitié des colonnes de Bertin adjacentes, les pyramides de

Ferrein et le parenchyme cortical en rapport. Le rein humain est un organe multilobé (8 à 18 lobes).

- Le lobule rénal

Est formé de même par une pyramide de Ferrein et le parenchyme cortical adjacent.

Le parenchyme rénal est constitué d'un amoncellement d'unités anatomiques et fonctionnelles élémentaires : le néphron. Il en existe un peu plus de 1 million par rein.

A l'une de ses extrémités, le néphron s'associe à un glomérule vasculaire pour former le corpuscule rénal.

A l'autre extrémité, le néphron se jette dans un tube collecteur. Les tubes collecteurs (ou tubes de Bellini) s'ouvrent dans le petit calice au niveau de la papille rénale. L'ensemble formé par un néphron et un tube collecteur constitue le tube urinaire ou tube urinifère.

Entre les tubes urinifères, se trouve du tissu conjonctif très fin. Il renferme les vaisseaux et les nerfs.

- Le néphron :

Le néphron est un tube de 50 à 55 mm de long. Il comprend 4 segments:

- Le corpuscule rénal.
- Le segment proximal: correspond au tube contourné proximal et au segment droit.
- Le segment grêle ou moyen: correspond à la partie grêle de l'anse de Henlé.
- Le segment distal: correspond à la portion large de l'anse de Henlé et au tube contourné distal.

4.4. Histophysiologie

Le rein assure 2 grands groupes de fonction : La fonction exocrine et les fonctions endocrines.

4.4.1. La production de l'urine: (fonction exocrine)

Elle est complexe, associant filtration, diffusion passive, sécrétion active et réabsorption sélective.

1. La filtration glomérulaire.

2. La réabsorption tubulaire.

4.4.2. Les fonctions endocrines

1. L'élaboration de la rénine.

2. La régulation de l'érythropoïèse.

3. La transformation de la vitamine D.

Matériels
et
Méthodes

RESULTATS

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériels :

1.1. Matériels biologiques :

Les yeux et les reins de lapin ont été récupérés immédiatement après le sacrifice de l'animal au niveau du laboratoire et ont été mis en culture dans les conditions favorables à notre étude.

1.2. Les milieux de culture et réactifs :

A. Le milieu de culture :

Les explants sont cultivées dans le milieu DMEM supplémenté avec de 10 %SVF et de 0,10% DMSO et de 20mM HEPES. Il est composé d'un ensemble d'antibiotique aux concentrations respectives (100 µg/ ml et de gentamicine et de streptomycine et de pénicilline 100UI /ml).

B. les agents inducteurs

Nous avons utilisé trois molécules nitrosynthétique suivantes :

- 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM.
- 1-méthyl -5- nitroimidazol à concentration 25 mM.
- 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM.

II.2. Méthodes

2.1.1. Culture des explants oculaires et rénaux

Après sacrifice du lapin, les yeux et les deux reins sont déposés dans une boîte de Pétri stérile contenant une solution tampon PBS pour la lavage .

Les yeux sont découpés avec une lame bistouri au niveau de l'équateur en deux parties postérieure et antérieure, le cristallin et le vitrée sont enlevés puis les deux parties sont fragmentés en quatre parties.

Concernant le rein, après incision longitudinale, la zone médullaire et corticale sont coupées en petits cubes de 1 cm³ environ.

Tous les explants sont introduits dans une plaque de culture contenant le milieu de culture en présence ou en absence des molécules nitrosynthétique considérés à savoir le 4-nitrobenzyl alcool, le 1-méthyl -5-nitroimidazol et le 5-nitroimidazol.

La culture a été réalisée pendant 24h à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Après l'incubation, les explants oculaires et rénaux traités par les inducteurs considérés ainsi que celles des cultures témoins ont été récupérée et conservé dans le Bouin jusqu'à leur utilisation.

II.2.2. Etude histologique

C'est le recueil de fragments tissulaires qui sont découpés pour permettre la réalisation de fines tranches colorées pour l'analyse morphologique au microscope optique.

2.2.1. La fixation :

Elle a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion de l'organe dans un liquide fixateur. Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol et le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements.

Dans notre étude, nous avons fixé, vu la taille des explants, la durée de fixation était de 24h dans le Bouin.

2.2.2. L'inclusion :

Cette étape a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool à degré croissant puis dans des bains de toluène avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide. Cette dernière infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

A. Déshydratation :

Du point de vue caractère chimique de la paraffine, celle-ci n'est pas miscible à l'eau donc un passage successif dans du bain d'alcool (éthanol) de degrés croissant

commençant avec l'alcool 70° puis celui de 96° et en dernier avec l'alcool 100° ; de façon à éliminer toute l'eau dans les compartiments tissulaires et à être remplacé par l'alcool.

Aussi, comme l'alcool n'étant pas miscible avec la paraffine, l'alcool est ensuite progressivement remplacé par un solvant organique qui est le xylène qui est miscible à la paraffine ; c'est l'étape de l'éclaircissement.

B. Imprégnation à la paraffine :

L'inclusion à la paraffine est effectuée au sein d'une étuve réglée à 60°C, la chaleur provoque l'évaporation du solvant et sa dissolution dans la paraffine. Les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine. Les explants baignent dans deux bains successifs de la paraffine fondue (chauffé à 60°C) pendant une heure pour chaque bain afin d'éliminer totalement le xylène.

C. Coulage des blocs (enrobage) :

Cette étape a pour but d'orienter convenablement les organes dans un bloc de paraffine refroidie. Elle est réalisée au moyen des petites moules appelés les barres de Leuckart.

On remplit le fond de moule avec un faible volume de paraffine liquide puis les tissus sont immergés dans le moule selon le plan de coupe désiré. Une fois la paraffine durcie, le moule est rempli jusqu'à ras bord de paraffine ce qui provoque le remonté des tissus, et la cassette déposée au-dessus de la paraffine encore liquide. Ce qui provoque son durcissement et donc la rigidification des fragments tissulaires. On procède alors au démoulage : on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.

D. La réalisation des coupes :

Les blocs de paraffine sont coupés selon une forme pyramidale à l'aide d'un couteau pour enlever l'excédent de paraffine.

La fixation du bloc sur le microtome, le bloc doit rester parallèle au couteau.

Le dégrossissage au microtome permet d'éliminer la paraffine qui se trouve en avant du prélèvement pour obtenir une coupe entière du tissu à colorer.

Le passage du bloc de paraffine dans un microtome qui permet de réaliser des tranches de section de 2 à 5 µm disposées en séries régulières sous forme de rubans contenant les tissus.

E. Montage des coupes sur les lames :

Le montage des coupes sur une lame se fait par trois étapes :

L'étalement : des segments de rubans de paraffine sont mis sur une lame de verre contenant une goutte d'eau gélatinée.

Le collage : les lames de verre sont placées sur une platine chauffante, réglée à une température de 40°C, pendant 15min.

Le séchage : les lames sont laissées sécher à l'aire à température ambiante.

F. Déparaffinage et réhydratation :

Etant donné que la plupart des colorants sont utilisées en solution aqueuse, leur pénétration ne peut être assurée que si les coupes sont déparaffinées et hydratées.

Déparaffinage :

Les lames sont placées sur une plaque chauffante à 60°C pendant quelques minutes afin que la paraffine fonde et donc de pouvoir éliminer la paraffine.

Réhydratation :

En émergeant les lames dans deux bains contenant du xylène, on élimine toute trace de paraffine et ainsi on permet la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus après avoir fait passer les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (de l'alcool 100% jusqu'à l'alcool 70%), puis dans l'eau distillé.

G. Coloration :

Puisque les tissus de l'organisme ne sont pas spontanément colorés, ils seront naturellement mal visibles, c'est pourquoi on utilise en histologie des colorants qui permettent leur observation au microscope. La plupart d'entre eux sont des composants acides ou basiques en milieu aqueux qui interagissent avec les radicaux ionisés des tissus.

Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituents tissulaires.

La coloration des lames a été faite avec deux colorants qui permettent de mettre en évidence la morphologie cellulaire et tissulaire : l'hématoxyline de Groat basique qui colore le noyau acide en brun noir et picro-fushine acide qui colore le cytoplasme basique en rouge.

Les lames ont tout d'abord été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau du robinet. Par la suite, elles ont été plongées dans un bain de picro-fushine pendant 5 minutes.

La dernière étape de l'histologie est la déshydratation avant le montage. Elle se déroule par le passage des lames dans un bain d'alcool suivi d'un deux bains successifs de xylène.

H. Montage des lames et l'observation microscopique :

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique baume du canada, l'ensemble lame et lamelles a été par la suite séché à l'air libre.

Une fois l'histologie terminée, les lames ont été observées à l'aide d'un microscope optique.

III .Résultats

III.1. Etude histologique des explants oculaires de lapin

III.1.1. Etude histologique des cultures « témoin » des explants oculaires antérieurs :

Les cultures des explants oculaires non traités (témoins) n'ont montré aucune altération à l'exception du détachement artéfact de quelques cellules de la couche superficielle de la cornée. L'organisation générale est similaire à celle des tissus sains. En effet, la cornée présente un épithélium pluristratifié non kératinisé reposant sur une lame basale (planche 06, A), un stroma dense avec des lames de fibres collagène entre lesquelles se trouvent les kératocytes sains visibles par leurs noyaux (planche 06, B) et une membrane de Desmet et un endothélium.

De même, les procès ciliaires, d'allure homogène et formant des expansions à partir du corps ciliaire possèdent un épithélium continu bi stratifié, l'un pigmentaire et l'autre non pigmentaire, entourant un stroma conjonctif vascularisé (planche 07).

L'iris, relié au corps ciliaire présente un épithélium antérieur reposant sur un stroma conjonctif contenant des fibroblastes et des chromatophores. On y observe également des vaisseaux sanguins ainsi que des fibres musculaires qui constituent le sphincter (planche 08). L'épithélium postérieur de l'iris est de type pigmentaire.

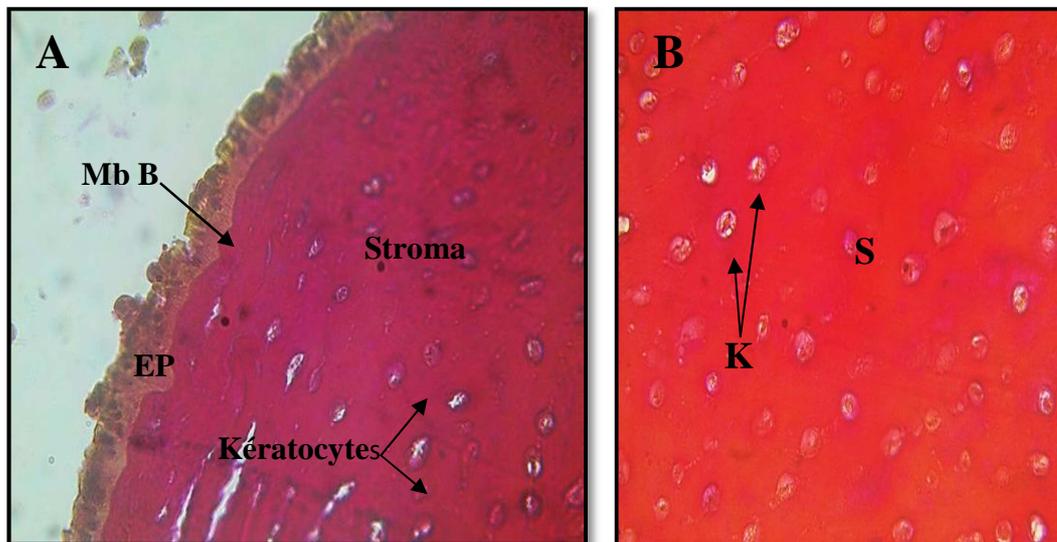


Planche 06 : coupe transversale au niveau de la cornée d'un œil sain en vue générale (A), composé principalement (EP) d'épithélium, le stroma(S) possède un aspect homogène composé des kératocytes. (B) détail d'un stroma cornéen. Le stroma (S) composé des kératocytes (K) qui possède des noyaux. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

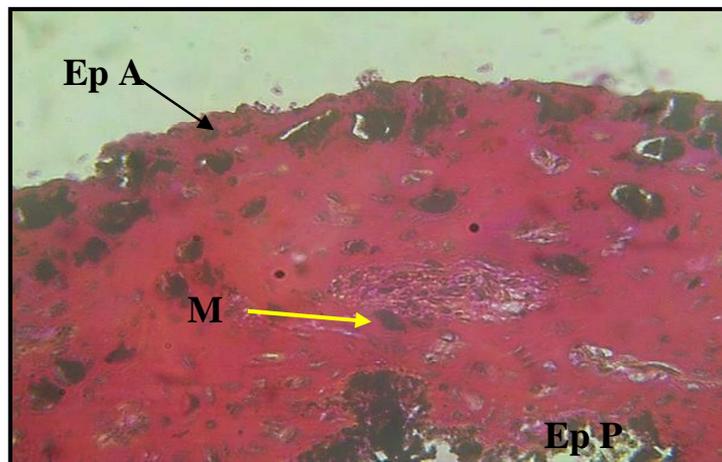


Planche 07 : coupe transversales au niveau de l'iris d'un œil sain. L'iris est possède deux épithélium : épithélium postérieure pigmenté (Ep P) et antérieur fin (Ep A), le corps de l'iris est formé de tissu conjonctif contenant des fibroblastes, Les fibres du muscles lisse (M). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

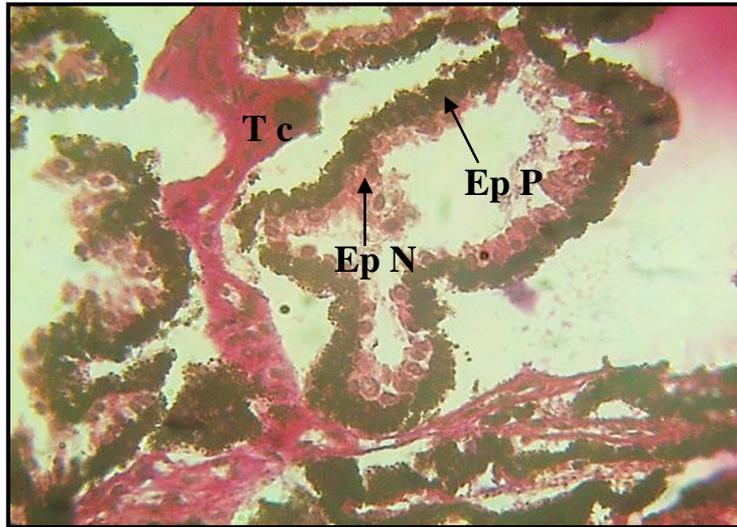


Planche 08 : coupe transversales au niveau de procès ciliaire d'un œil sain, le corps ciliaires composés d'épithélium pigmenté (Ep P) et épithélium non pigmentés (Ep N), entourant un tissu conjonctif vascularisé. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III. 1.1.1. Etude histologique de l'action 1-méthyl -5- nitroimidazol sur les explants oculaires antérieurs *in vitro*:

Des altérations tissulaires sont observées sur les explants oculaires antérieurs traités. Ainsi, l'épithélium cornéen montre une désorganisation générale avec dissociation totale des cellules concernant toute les couches aussi bien apicales que basales et présentant un aspect arrondi. Par contre, le stroma cornéen n'est pas affecté et présente une structure similaire au tissu sain (planche 09).

Concernant l'iris, le stroma conjonctif contenant les fibroblastes et les chromatophores n'est pas affecté par le traitement administré. On y observe les fibres musculaires sans aucune modification structurale (planche 10). En revanche, l'épithélium postérieur pigmentaire de l'iris montre des lésions au niveau cellulaire qui ont tendance à se détacher et à éclater.

Contrairement aux autres structures, les procès ciliaires montrent de fortes altérations de structure. L'épithélium bistratifié à l'origine perd sa couche de cellules non pigmentaire. La couche de cellules pigmentaire se détache du stroma conjonctif avec dissociation de certaines cellules entre elles et l'éclatement d'autres (planche 11).

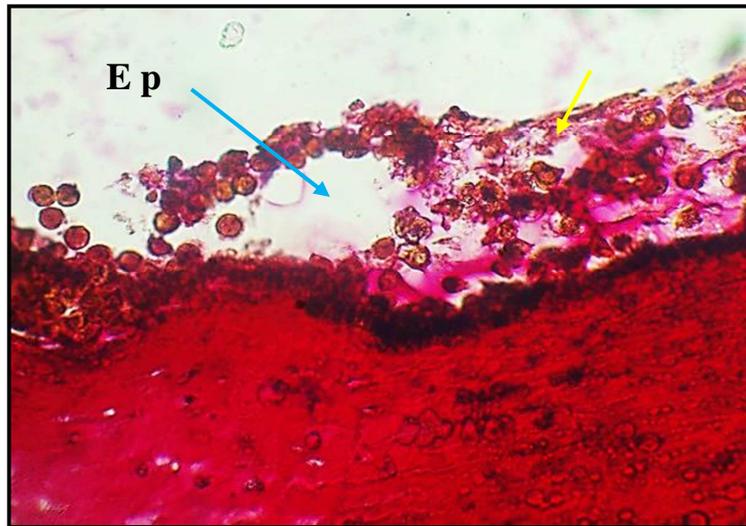


Planche 09 : coupe transversales au niveau de cornée d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium de la cornée altéré et détaché du stroma (→) avec détachement des cellules entre elle (→) .la stroma cornéen est conservé. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

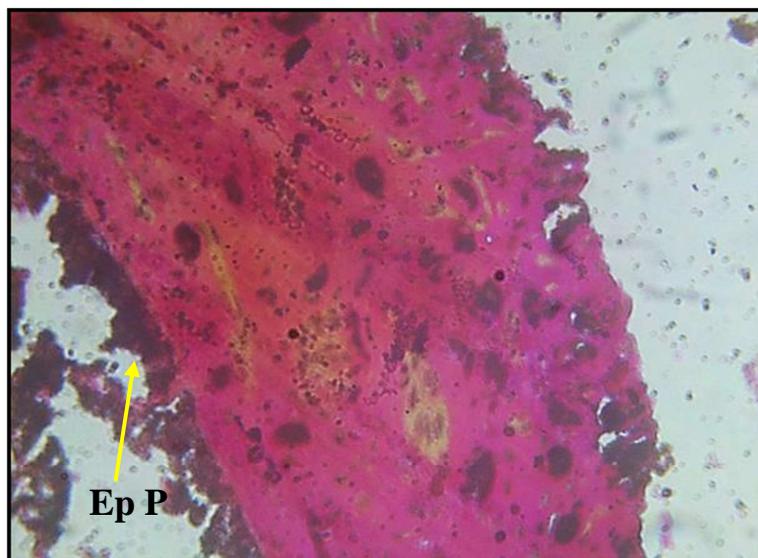


Planche 10 : coupe transversales au niveau de l'iris d'explant traité avec 1méthyl- 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium postérieur pigmentés (Ep P) présente un aspect altérés (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

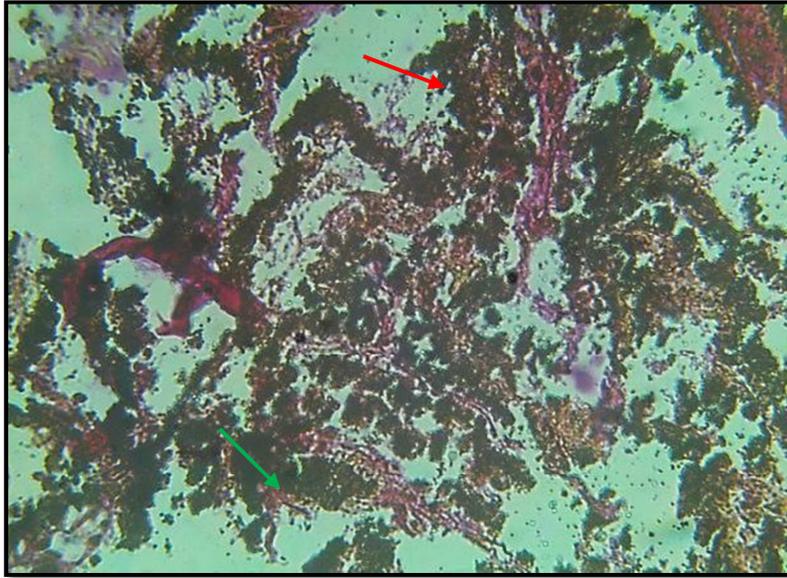


Planche 11 : coupe transversales au niveau de corps ciliaires d'explant traités avec 1-méthyl-5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Altération complète de l'épithélium pigmenté (→) et non pigmenté (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.1.1.2. Etude histologique de l'action 4-nitrobenzyl alcool sur les explants oculaires antérieurs *in vitro*:

Le traitement des explants avec le 4-nitrobenzyl alcool a induit des altérations tissulaires au niveau de différentes structures. Ainsi, l'épithélium cornéen montre un détachement des cellules par endroits sans modifications de l'aspect des cellules (planche 12, A). Egalement, le stroma cornéen présente une structure de fibres collagène intact mais une perte en kératocytes est observée (planche 12, B).

Les procès ciliaires montrent des altérations mineures. La couche de cellules non pigmentaire est la seule à être affectée avec perte cellulaire par certains endroits sans que la couche de cellules pigmentaire ne soit atteinte (planche 13).

De même, l'iris ne présente aucune atteinte structurale (planche 14) à l'exception du détachement de l'épithélium postérieur pigmentaire de l'iris sans pour autant montrer de lésions.

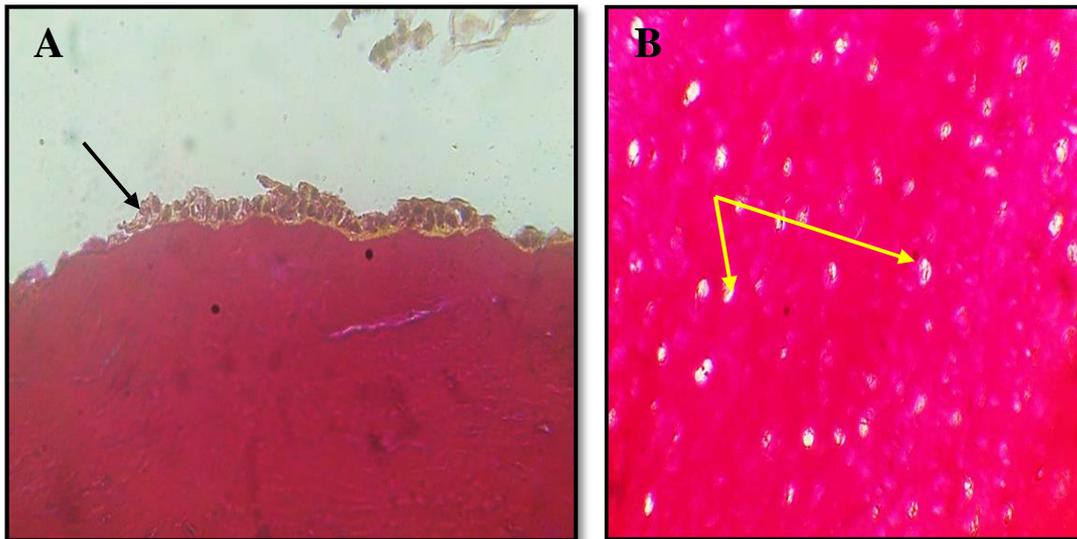


Planche 12 : coupe transversales au niveau de la cornée d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. En vue générale (A). L'épithélium altérés (→) et détaché du stroma. (B) détail d'un stroma cornéen, Atteintes cellulaires (→), absence de noyaux. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

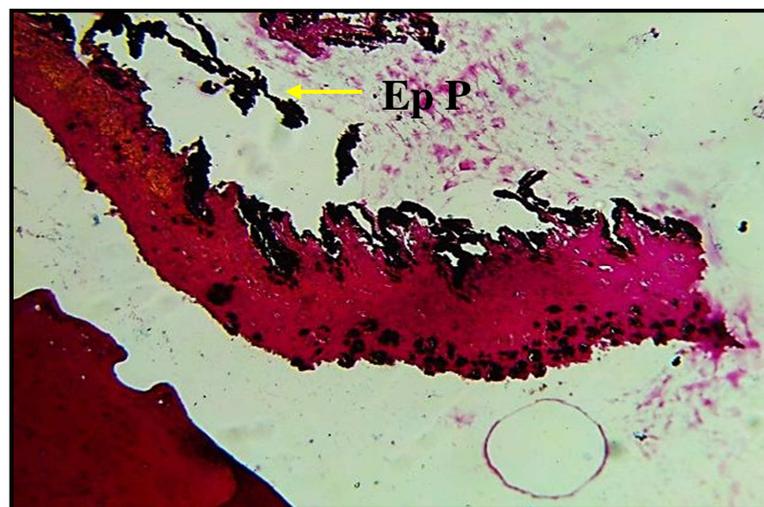


Planche 13 : coupe transversales au niveau de l'iris d'explants traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. Une altération d'épithélium postérieur (Ep P) (→). (G x 10, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

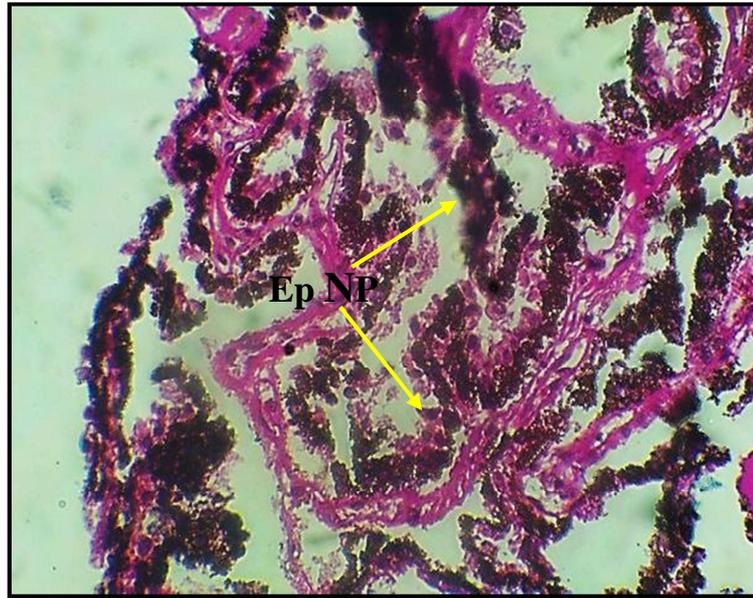


Planche 14 : coupe transversales au niveau de procès ciliaire d'explant traité par 4-nitrobenzyl alcohol à concentration 25 mM pendant 24 h. l'épithélium non pigmentaire est altéré (→) .(G x 40 , fixateur Bouin , coloration de Van Gieson).

III.1.1.3. Etude histologique de l'action 5-nitroimidazol sur les explants oculaires antérieurs *in vitro*:

Les explants traités avec le 5-nitroimidazol montrent des altérations tissulaires similaires aux traitements précédents avec quelques particularités. Ainsi, l'épithélium cornéen montre un détachement léger des cellules par endroits sans modifications de l'aspect des cellules aussi bien restantes que des cellules libres (planche 15, A). Egalement, le stroma cornéen présente une structure de fibres collagène intact mais une perte plus prononcée en kératocytes est observée (planche 15, B).

Les procès ciliaires montrent des altérations mineures. La couche de cellules non pigmentaire est la seule à être affectée avec perte cellulaire par certains endroits sans que la couche de cellules pigmentaire ne soit atteinte (planche 16).

De même, l'iris ne présente aucune atteinte structurale au niveau du stroma (planche 17) alors qu'une destruction totale de l'épithélium postérieur pigmentaire de l'iris est observée.

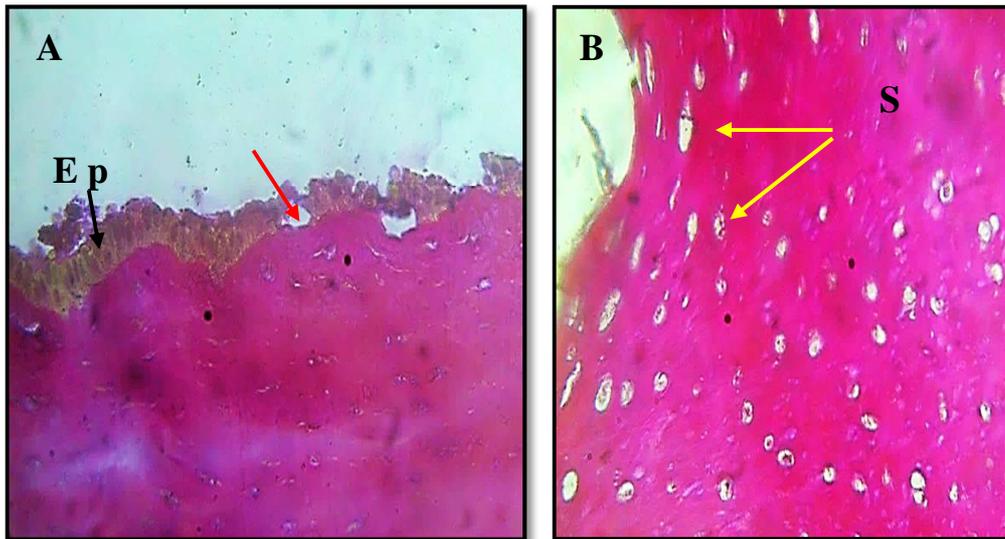


Planche 15 : coupe transversale au niveau de la cornée d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. En vue générale (A) l'épithélium (Ep) non altéré (→) avec des cellules détaché du stroma (→). (B) détail du stroma cornéen (S), œdème au niveau des kératocytes (→). (Gx40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

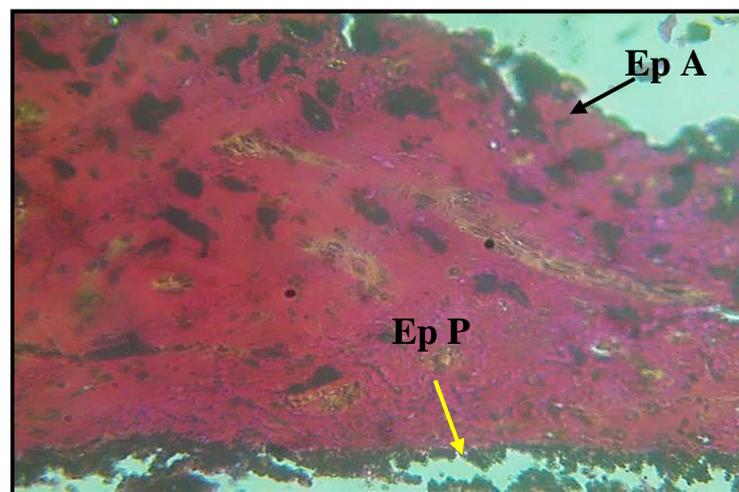


Planche 16: coupe transversales au niveau de l'iris d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. L'épithélium postérieur (Ep P) est altéré (→), aspect irrégulier de l'épithélium antérieur (Ep A) (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 17 : coupe transversales au niveau de procès ciliaire d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. L'épithélium non pigmentaire (Ep N) presque totalement altéré (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.1.2. Etude histologique des cultures « témoin » des explants oculaires postérieurs :

Les cultures des explants oculaires non traités (témoins) n'ont montré aucune altération à l'exception du détachement artéfact de la rétine de l'épithélium pigmentaire. La rétine présente une organisation stratifiée intacte (planche 20) avec du bas vers le haut : la couche des photorécepteurs, la couche plexiforme externe, la couche nucléaire externe, la couche plexiforme interne, la couche nucléaire interne et la couche plexiforme externe, la couche des cellules ganglionnaires et la couche des fibres optiques.

La partie postérieure comporte également la choroïde, riche en vaisseaux sanguins et contient des cellules pigmentaires dans certaines régions (planche 19), et la sclérotique formé d'un tissu conjonctif très dense contenant des fibroblastes (planche 18).

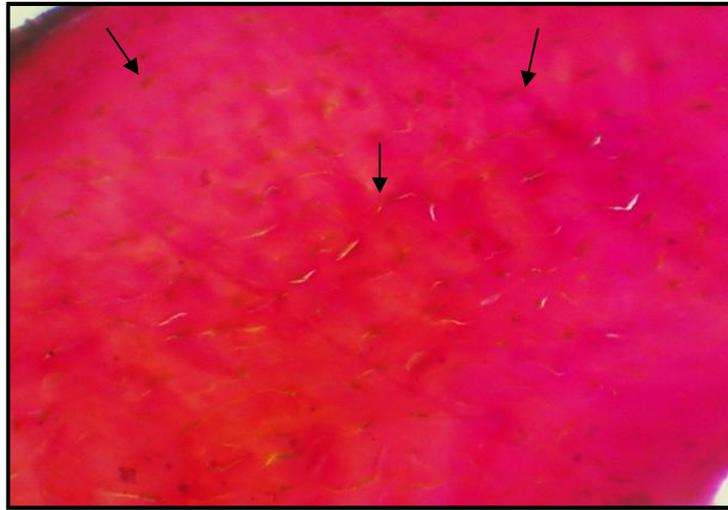


Planche 18 : coupe transversale au niveau de sclérotique d'un œil sain. La sclérotique est formée des fibres de collagènes disposé en faisceaux agencés parallèlement entre lesquelles se trouvent des fibroblastes fusiformes reconnaissables par leur noyau (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 19 : coupe transversale au niveau de la choroïde d'un œil sain. C'est une couche pigmenté par des mélanocytes, elle est riche en vaisseaux sanguins (V s g). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

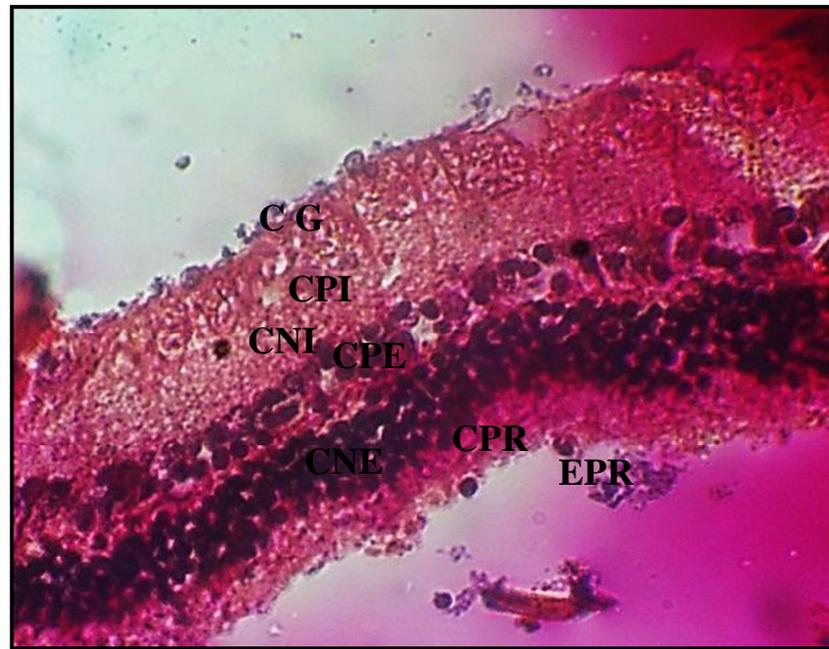


Planche 20 : coupe transversale au niveau de la rétine d'un œil sain. La rétine est organisée en des couches (couche ganglionnaire (CG), couche plexiforme interne (CPI), couche nucléaire interne(CNI), couche plexiforme externe (CPE), couche nucléaire externe(CNE), couche des photorécepteurs(CPR)), limité extérieurement par l'épithélium pigmentaire de la rétine(EPR). (G x40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.1.2.1. Etude histologique de l'action 1-méthyl -5- nitroimidazol sur les explants oculaires postérieurs *in vitro*:

La mise en culture des explants oculaires en présence du 1-méthyl -5-nitroimidazol a induit quelques altérations cellulaires. En effet, la rétine présente une organisation stratifiée intacte (planche 23, A et B) mais la couche des cellules ganglionnaires et la couche des fibres optiques montrent des altérations allant jusqu'au détachement de la partie superficielle de la rétine.

La choroïde, riche en vaisseaux sanguins (planche 22), montre une légère dissociation des fibres collagène qui la constituent. Egalement, la sclérotique formée d'un tissu conjonctif très dense montre une légère dissociation de ces fibres (planche 21).



Planche 21 : coupe transversale au niveau de la sclérotique d'explant traité avec 1méthyl 5-nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Les fibroblastes montrent un léger œdème. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

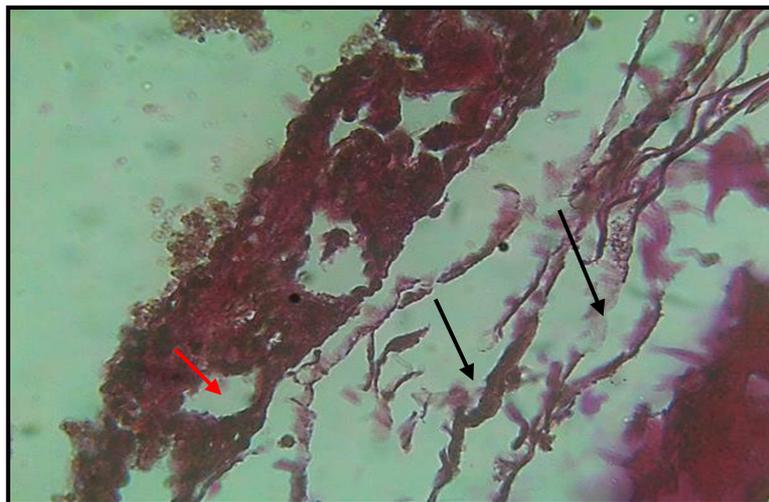


Planche 22 : coupe transversale au niveau de la choroïde traité avec 1méthyl 5-nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. La choroïde montre une vasodilatation (→) et dissociation des fibres de collagène (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

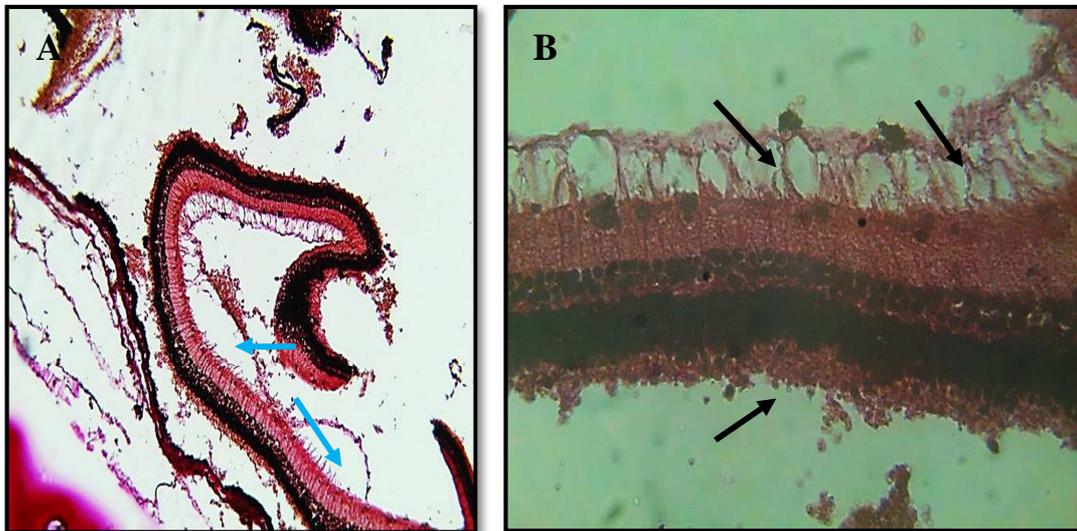


Planche 23 : coupe transversale au niveau de la rétine d'explant traité avec 1-méthyle 5 -nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. En vue générale la rétine apparait altéré (→) (A). (B) détail de la couche ganglionnaire (CG) altéré (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.1.2.2. Etude histologique de l'action 4-nitrobenzyl alcool sur les explants oculaires postérieurs *in vitro*:

Le traitement des explants avec le 4-nitrobenzyl alcool a induit des altérations tissulaires au niveau de différentes structures. En effet, la rétine présente une organisation stratifiée mais la densité nucléaire dans les deux couches nucléaires interne et externe a diminuée (planche 26). La couche des cellules ganglionnaires et la couche des fibres optiques montrent des anomalies de structure.

La choroïde ne montre aucune altération (planche 25) alors que la sclérotique formée d'un tissu conjonctif très dense montre une dissociation marquée de ces fibres avec perte de fibroblastes (planche 24, A et B).

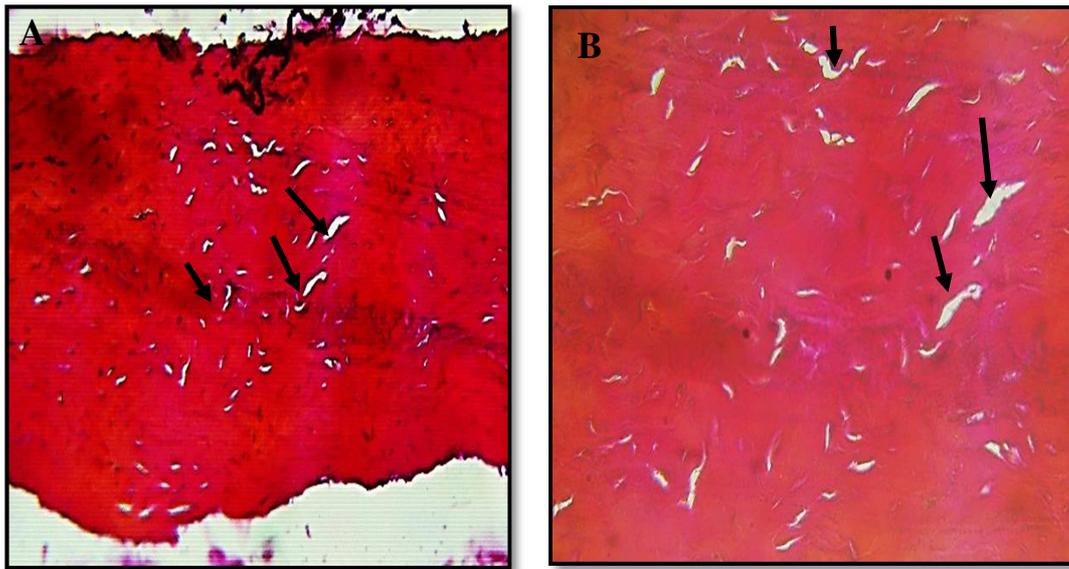


Planche 24 : coupe transversale au niveau de la sclérotique d'un explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. En vue générale la sclérotique (A). La sclérotique présente une altération des fibres conjonctives (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

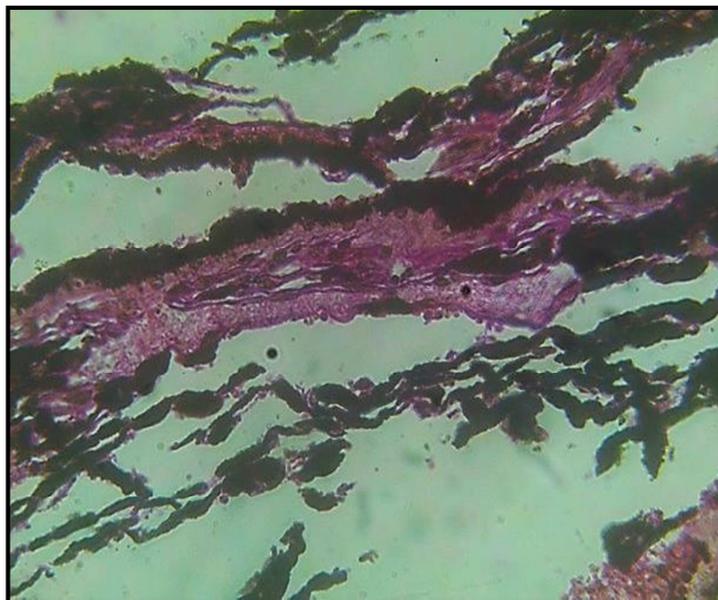


Planche 25 : coupe transversale au niveau de la choroïde d'un explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. L'aspect normal de la choroïde. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

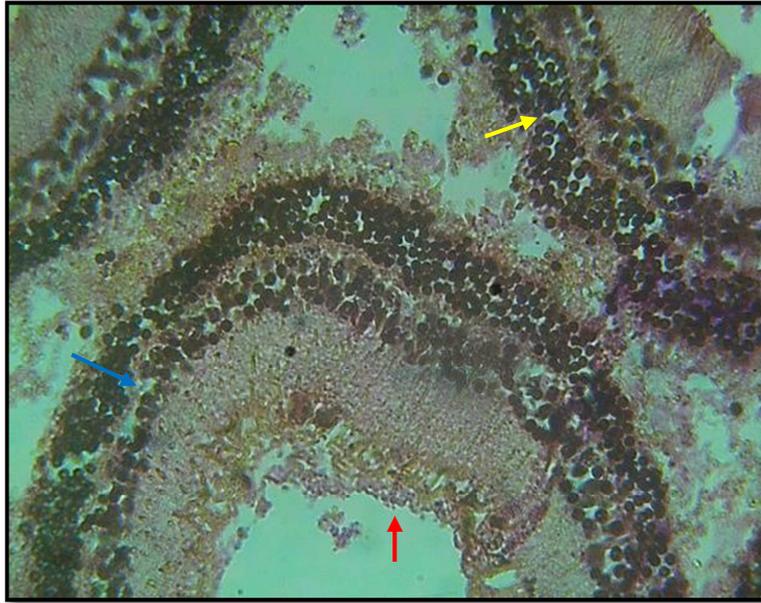


Planche 26 : coupe transversale au niveau de la rétine d'un explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. La structure est altéré avec perte de la couche des cellules photorécepteurs(CPR), destruction des déférentes couches, la couche nucléaire (→), de la couche ganglionnaire(CG) (→) avec détachement des cellules entre elle. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.1.2.3. Etude histologique de l'action 5-nitroimidazol sur les explants oculaires postérieurs *in vitro*:

Les explants traités avec le 5-nitroimidazol montrent des altérations tissulaires similaires aux traitements précédents avec quelques particularités.

En effet, la rétine présente une organisation stratifiée mais la densité nucléaire dans la couche nucléaire interne a diminuée de façon marquée (planche 29). Les autres couches de cellules sont restées intactes.

La choroïde ne montre aucune altération avec un épithélium pigmentaire non altéré (planche 28), alors que la sclérotique est constituée d'un tissu conjonctif très dense présentant une dissociation marquée de ces fibres avec perte des fibroblastes (planche 27).

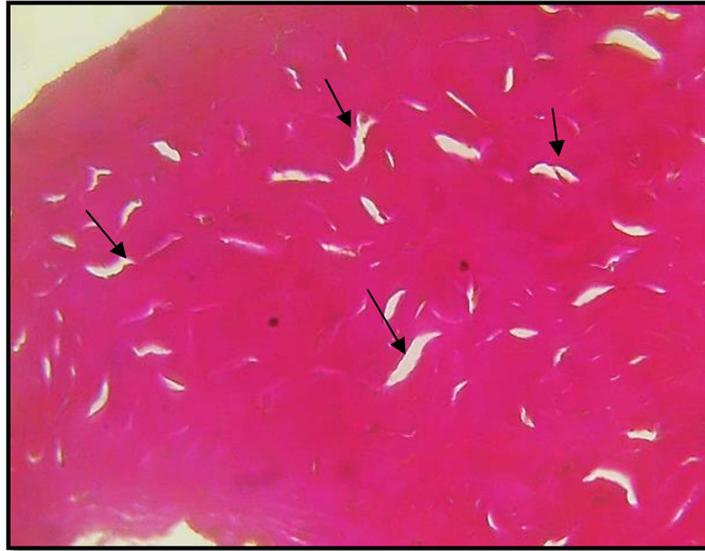


Planche 27 : coupe transversale au niveau de la sclérotique d'un explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. La sclérotique présente un aspect très altéré des fibres conjonctives (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

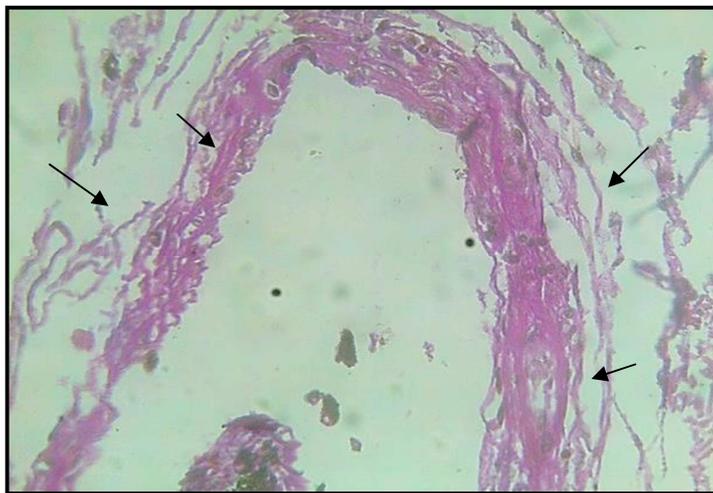


Planche 28 : coupe transversale au niveau de la choroïde d'un explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. La choroïde montre un aspect détaché des fibres de collagène (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 29 : coupe transversale au niveau de la rétine d'un explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. La rétine montre un aspect altéré au niveau de la couche nucléaire interne. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.2. Etude histologique des explants rénaux de lapin**III.2.1. Etude histologique des cultures « témoin » des explants rénaux :**

Les cultures des explants non traités (témoins) n'ont montré aucune altération. Dans la partie du cortex rénal, les glomérules de Malpighi ainsi que les différents segments du néphron sont bien structurés sans atteintes notables (planche 30).

De même au niveau de la médulla, les différentes sections réalisées au niveau des branches de l'anse de Henlé et des tubes collecteurs ne montrent pas d'altérations cellulaires (planche 31 et 32).



Planche 30 : coupe transversale au niveau du cortex d'un rein sain. La zone corticale est possède des petite masses sphérique c'est les glomérules rénaux, ou corpuscules de Malpighi (GR), et composé des tubules rénaux sont le tubule contourné proximale qui est bordé des cellules cylindrique ou cubique (→) et distale qui est bordé de cellules épithéliales cubiques (→). (G x 10, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 31 : Coupe transversale au niveau de médulla d' un rein sain. La zone médullaire est composé des tubes collecteurs qui constitué d'un épithélium simple cylindrique (→) et l'anse de henlé (partie fin) constitué d'un épithélium simple pavimentaoux(→). (G x 10, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

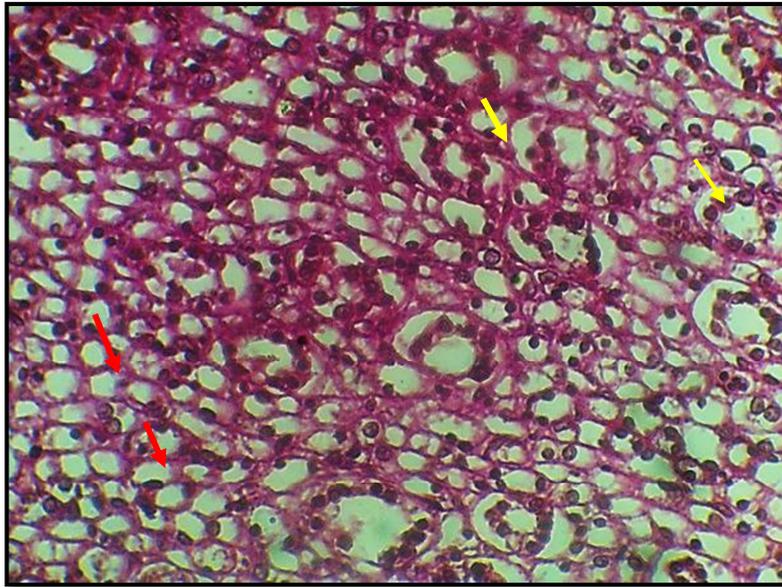


Planche 32 : coupe transversale au niveau de la médulla d'un rein sain. La zone médullaire composée des tubules collecteurs sont bordé des cellules cubique basse ou cylindrique, leur noyau sphérique et leur cytoplasme dépourvu de granulation (→) et de l'anse Henlé qui possède deux branches larges descendante et ascendante (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.2.1.1. Etude histologique de l'action 1-méthyl -5- nitroimidazol sur les explants rénaux *in vitro*:

Les explants traités avec le 1-méthyl -5- nitroimidazol montrent des altérations tissulaires et cellulaires.

Au niveau du cortex rénal, tous les tubes contournés proximaux seules sont altérés montrant un épithélium unistratifié avec des cellules dépourvues de noyaux ou bien lysées (planche 33, 34, 35,36, 38).par contre les tubes contournés distaux et les glomérules de Malpighi soit ne montrent pas de modification structurale soit celles-ci sont mineures (planche 33, 34,3, 36, 37). Toutefois, certaines régions des explants sont restées intacts.

Au niveau de la médulla, l'épithélium des tubes collecteur sa préservé globalement son intégrité cellulaire. Les branches de Henlé, de même, présentent un épithélium montrant de légères altérations (planche 39, 40, 41, 42, 43, 44).



Planche 33 : coupe transversale au niveau de cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules contournés proximales sont totalement altéré (→). Les glomérules de Malpighi reste intacte (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

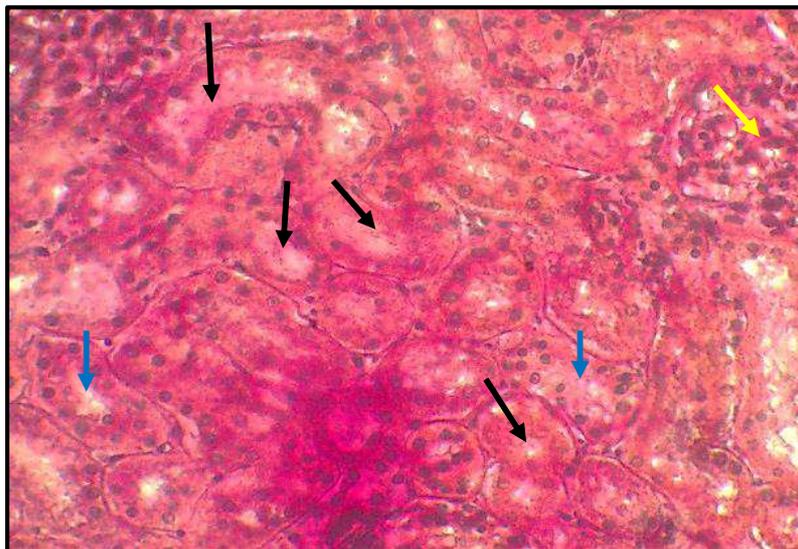


Planche 34 : coupe transversale au niveau de cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules contournés proximales montre des cellules avec noyaux (→). Les tubules contournés distales reste intacte (→). La structure de glomérule est conservé (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 35 : coupe transversale au niveau de cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules contournés proximales montre une lyse cellulaire (→). La structure de glomérules de Malpighi montre aucune modification structurales (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

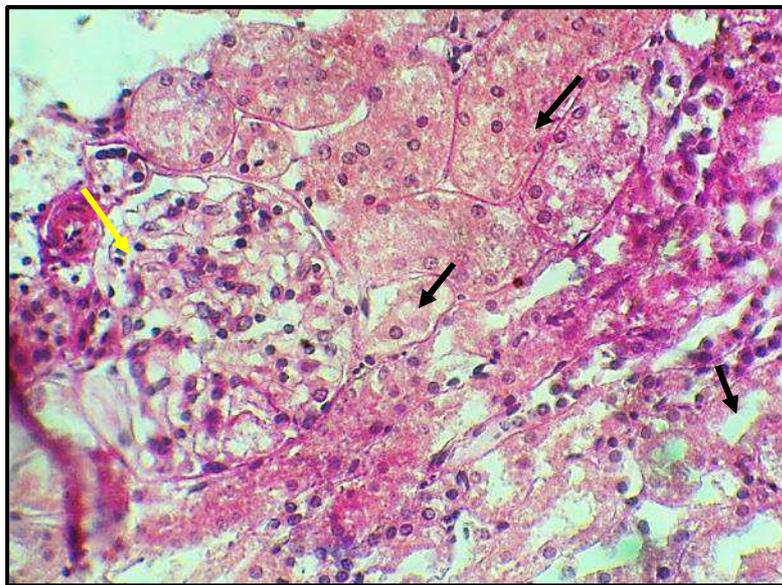


Planche 36 : coupe transversale au niveau de cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules contournés proximales sont altéré (→). Le glomérule de Malpighi présente un aspect intact (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

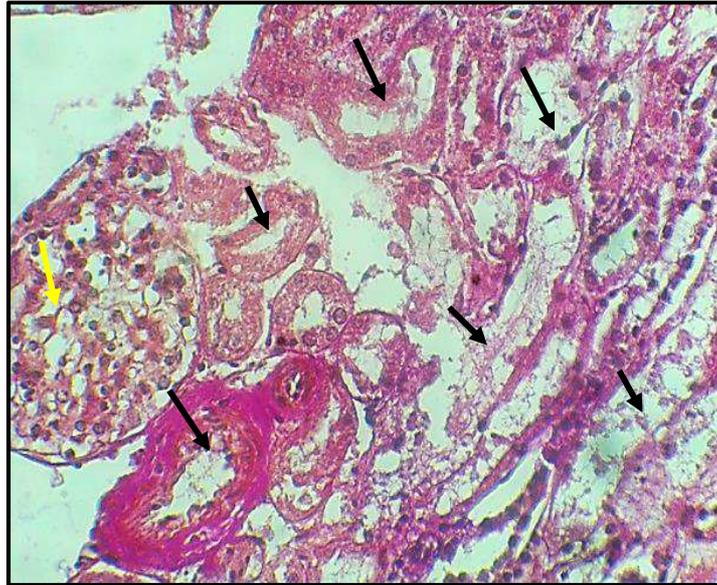


Planche 37 : coupe transversale au niveau de cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Une altération totalement au niveau des tubules contournés proximales avec dégénérescence de leur épithéliums (→). Le glomérule de Malpighi montre aucune modification structurale (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

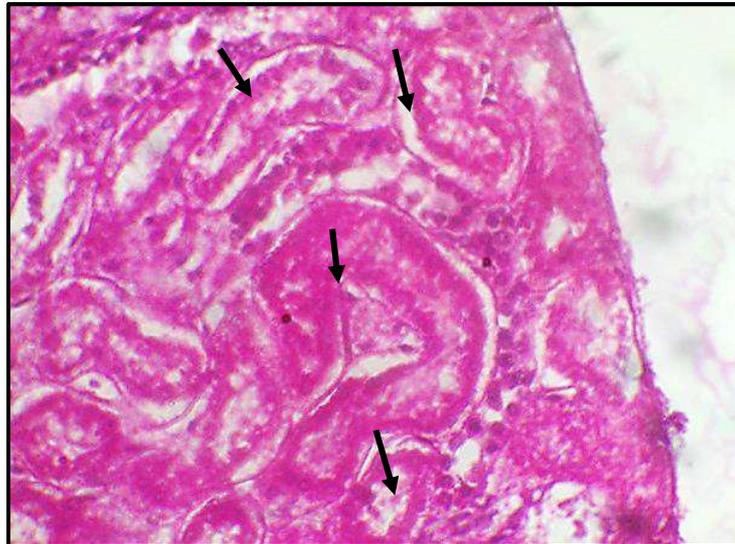


Planche 38 : coupe transversale au niveau de cortex rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium des tubules contournés proximales est dégradé avec une lyse cellulaire (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 39 : coupe transversale au niveau de médulla rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules collecteur préservé leur structure (→). L'anse de Henlé montre une légère altération (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

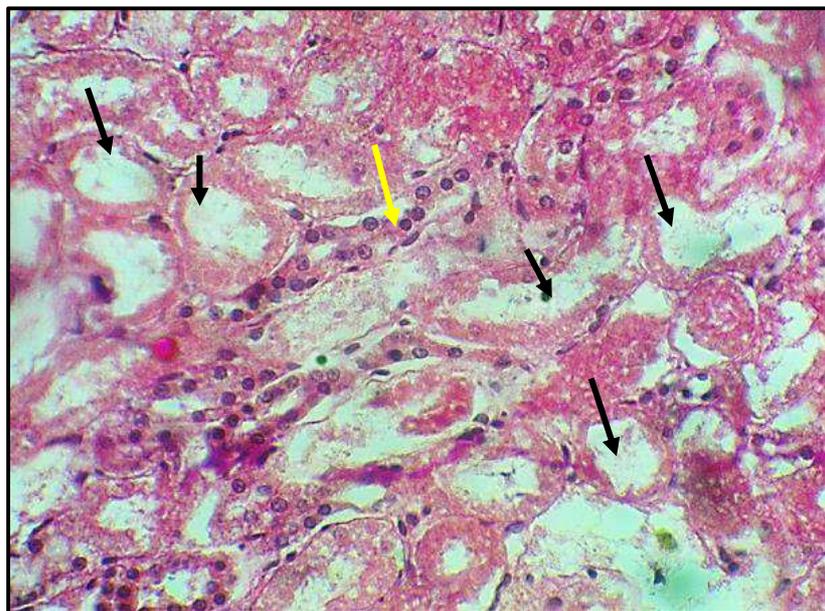


Planche 40 : coupe transversale au niveau de médulla rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium de L'anse de Henlé présente un aspect peu dégradé et leur cellules sont dépourvue des noyaux (→). Les tubules collecteur est intacte (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

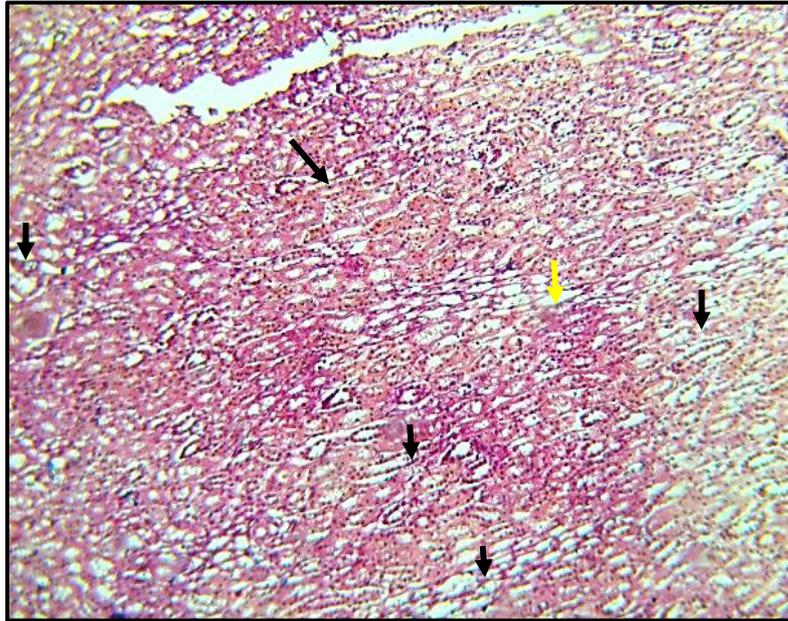


Planche 41 : coupe transversale au niveau de médulla rénale traité d'explant avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. La structure des tubules collecteur est conservé (→). L'anse de Henlé montre une légère altération (→). (G x 40, fixateur Bouin, de Van Gieson).

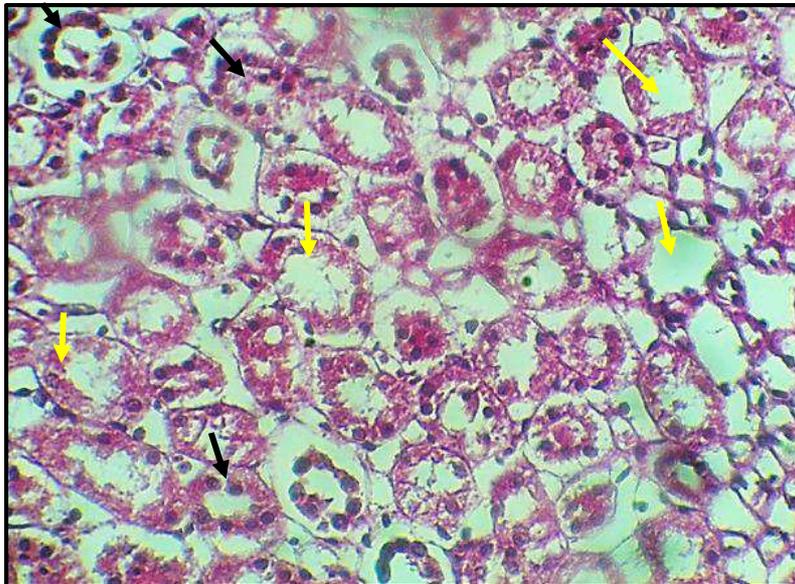


Planche 42 : coupe transversale au niveau de médulla rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium de l'anse de Henlé montre une altération (→). Les tubules collecteurs montre aucun modification cellulaire (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

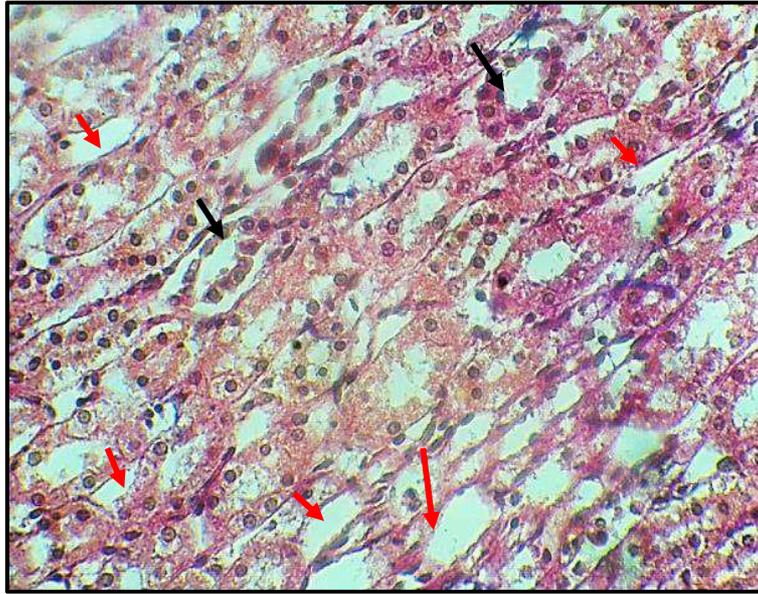


Planche 43 : coupe transversale au niveau de médulla rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. L'anse de Henlé montre une légère altération (→). Les tubules collecteur est intacte (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

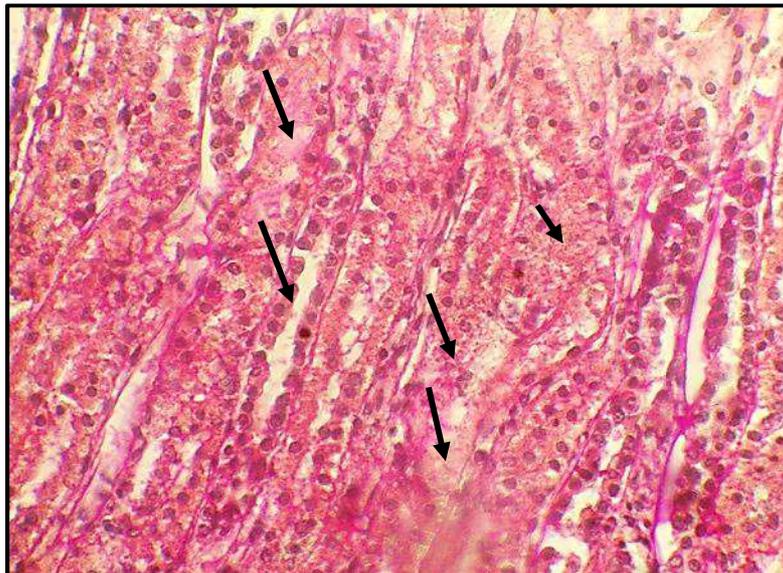


Planche 44 : coupe transversale au niveau de médulla rénale d'explant traité avec des 1 méthyl 5- nitroimidazol à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules collecteur et l'anse de Henlé est intacte (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.2.1.2. Etude histologique de l'action 4-nitrobenzyl alcool sur les explants rénaux *in vitro*:

Des altérations tissulaires et cellulaires sont induites par le 4-nitrobenzyl alcool.

Au niveau du cortex rénal, les tubes contournés proximaux montrent un épithélium unistratifié avec des cellules fantômes dépourvues de noyaux (planche 45, 46, 47, 48, 49, 50). Les tubes contournés distaux sont intacts avec des cellules épithéliales intactes (planche 45, 46, 47, 48). La majorité des glomérules de Malpighi ne montrent pas de modification structurale mais quelques-uns ont complètement dégénéré (planche 50).

Au niveau de la médulla, l'épithélium des tubes collecteurs et les branches de Henlé présentent un épithélium montrant de légères altérations se présentant sous forme de quelques détachement de cellules (planche 51, 52, 53).

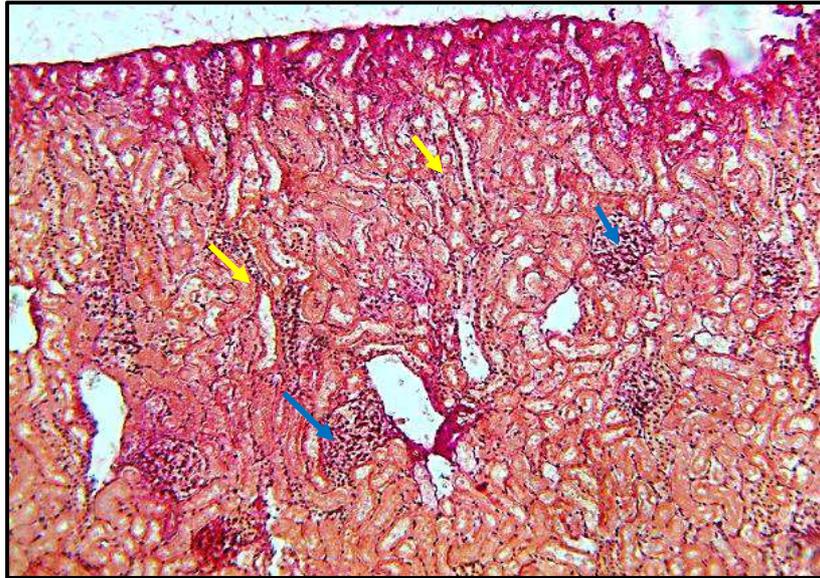


Planche 45 : coupe transversales au niveau du cortex rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules contourné distales sont intacte (→). Le glomérule de Malpighi montre aucune modification structurale (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

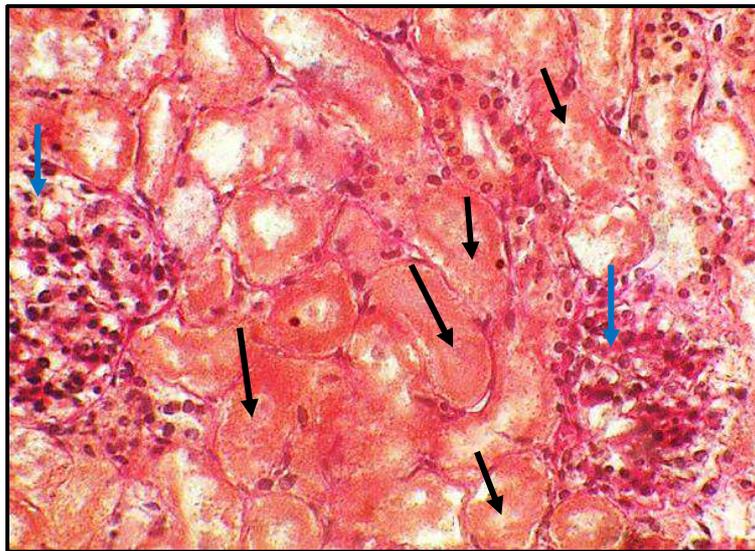


Planche 46 : coupe transversales au niveau du cortex rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. Les cellules des tubules contourné proximaux montre un aspect dépourvue des noyaux (→). Le glomérule de Malpighi est intacte (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

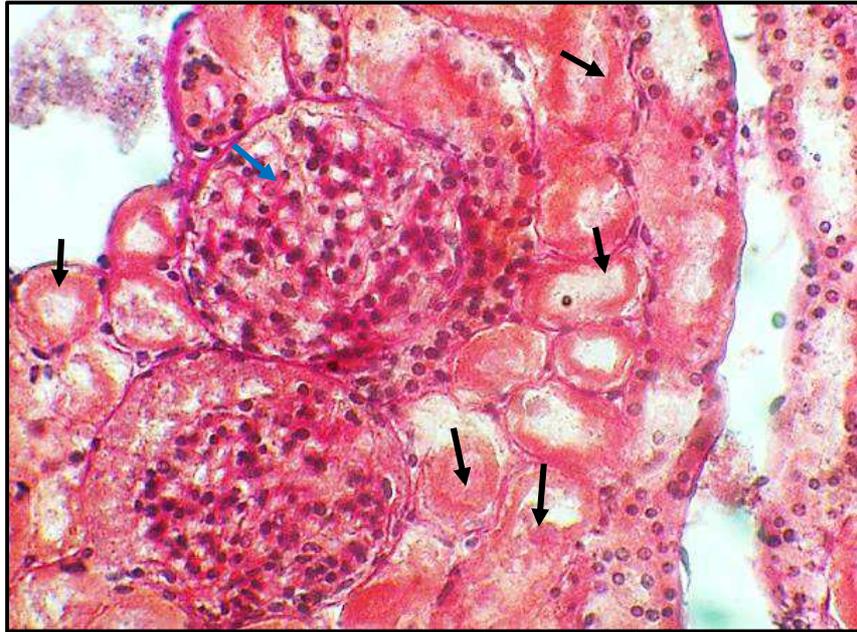


Planche 47 : coupe transversales au niveau du cortex rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. Une altération au niveau des tubules contournés proximaux (→), par contre les glomérules de Malpighi reste intacte (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration hématoxyline de groat).

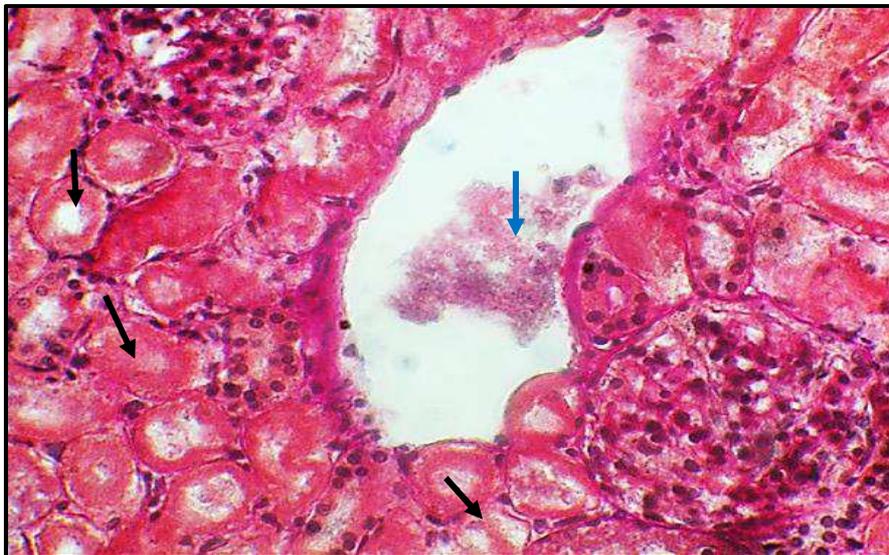


Planche 48 : coupe transversales au niveau du cortex rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium de tubule contourné proximaux sont dégradé (→). Le glomérule (→) est complètement dégénéré. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

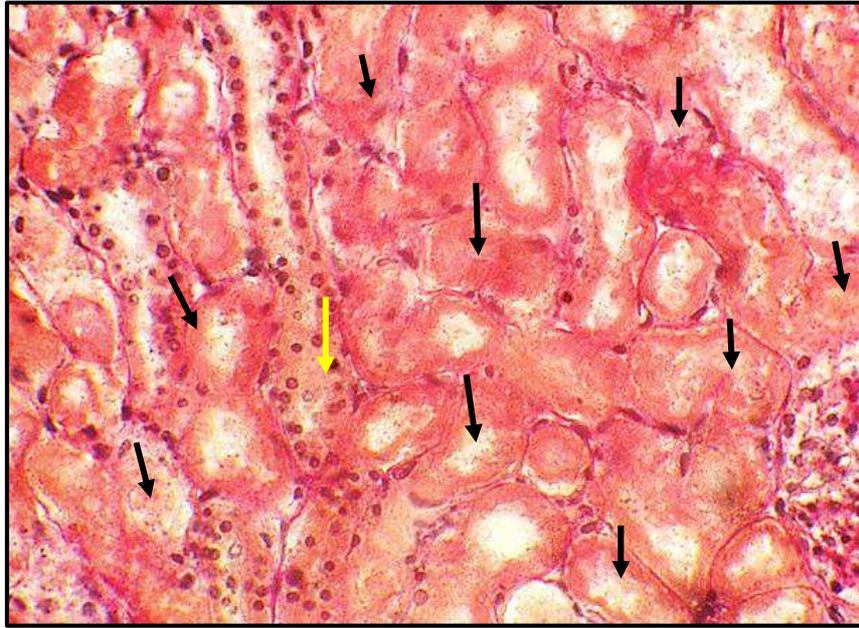


Planche 49 : coupe transversales au niveau du cortex rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules contourné proximaux montre une lyse cellulaire (→). Les tubules contourné distaux sont conservé (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 50 : coupe transversales au niveau du cortex rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcool à concentration 25 mM pendant 24h. Les tubules contournés proximaux montre une lyse cellulaire, leur épithélium est dégradé et dépourvu des noyaux (→). Un vaisseau est totalement intact (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

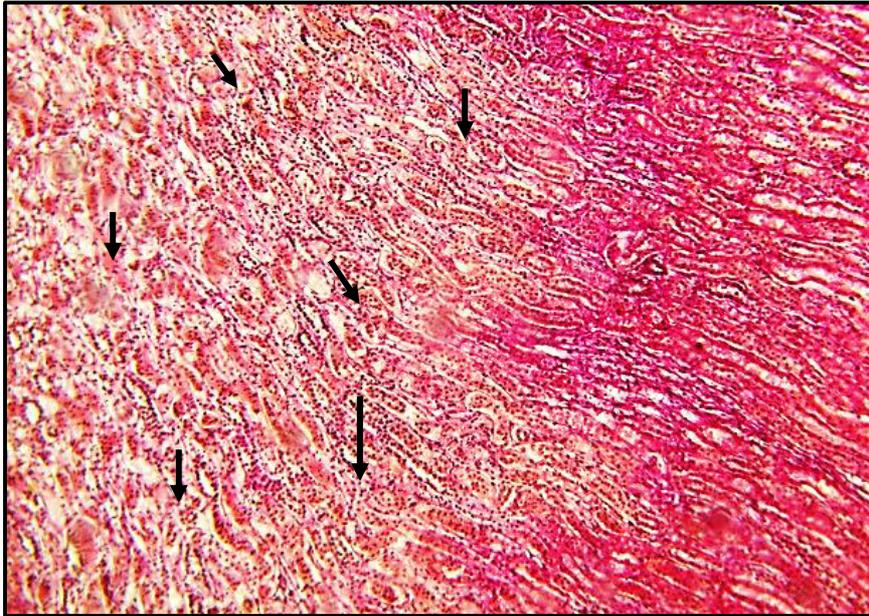


Planche 51 : coupe transversales au niveau du médulla rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium de tubule collecteur et de l'anse de Henlé montre une légère altération (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

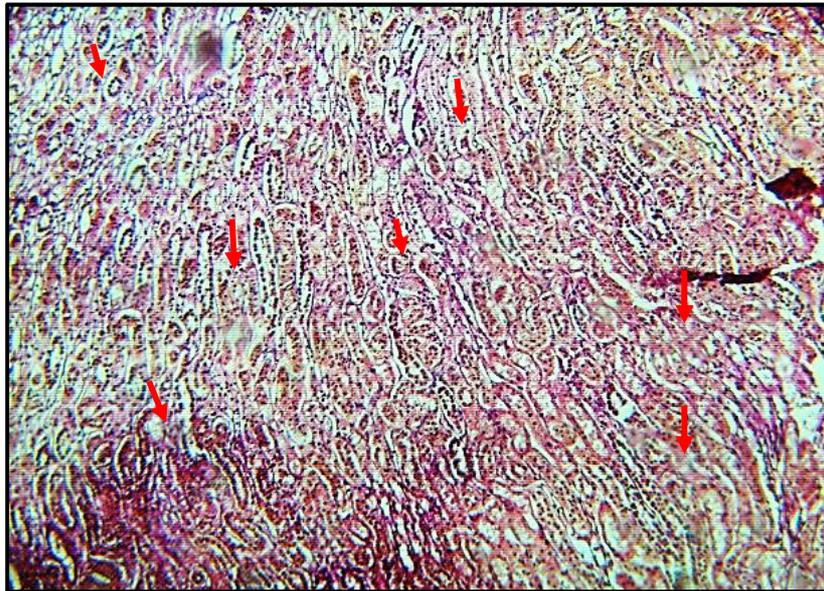


Planche 52 : coupe transversales au niveau du médulla rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium de tubule collecteur est de l'anse de Henlé montre une légère altération (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

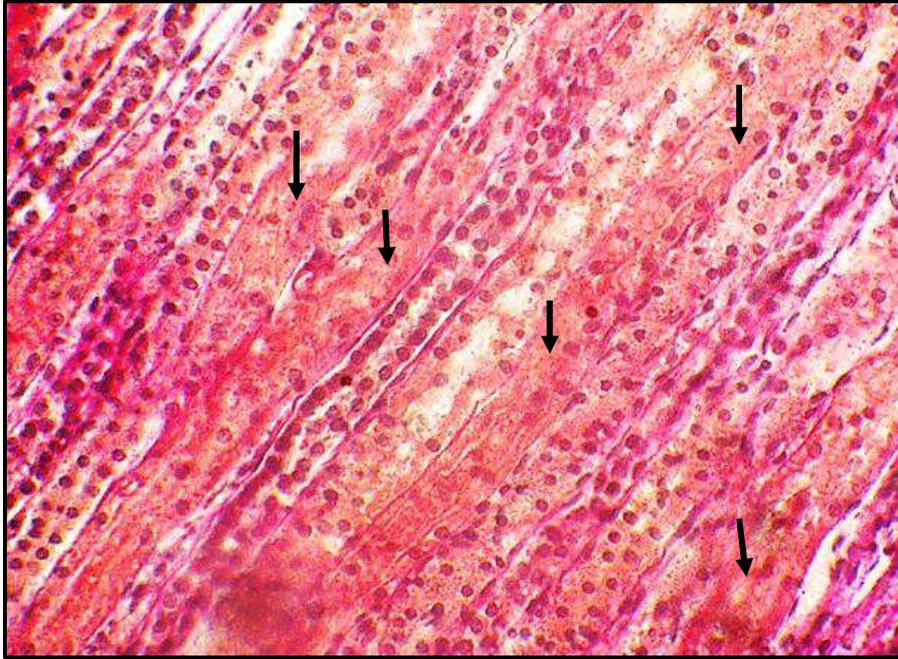


Planche 53 : coupe transversales au niveau du médulla rénal d'explant traité avec 4-nitrobenzyl alcohol à concentration 25 mM pendant 24h. L'épithélium des tubules collecteur et l'anse de Henlé montre une légère altération (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

III.2.1.3. Etude histologique de l'action 5-nitroimidazol sur les explants rénaux *in vitro*:

Les explants traités avec le 5-nitroimidazol montrent des altérations tissulaires particulières par rapport aux traitements précédents.

Au niveau du cortex rénal, tous les tubes contournés proximaux et distaux sont altérés. Leurs épithéliums présentent une lyse cellulaire (planche 54, 55, 56, 58). La majorité des glomérules de Malpighi montre une modification structurale soit par dégénérescence du réseau capillaire et des cellules associées à savoir les podocytes et les cellules mésangiales à l'intérieur du glomérule (planche 55, 56, 58), soit par diminution de taille. Toutefois, certains glomérules sont restés intacts.

Au niveau de la médulla, des altérations cellulaires sont nettement visibles avec l'altération de l'épithélium des tubes collecteurs où les cellules sont totalement détachées de la paroi et se sont dissociées les unes des autres et présente chez certaines une lyse cellulaire. Les branches de Henlé, de même, présentent une paroi dénuée de son épithélium (planche 59, 60).

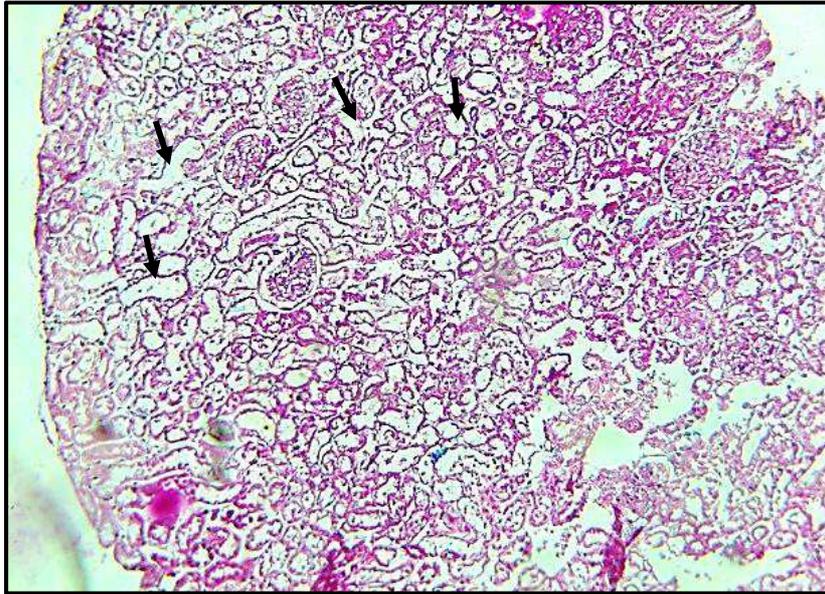


Planche 54 :coupe transversale au niveau de cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5m M pendant 24h. Les tubules contournés distaux et proximaux apparaissent altérés, leur épithélium présente une lyse cellulaire (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).



Planche 55 :coupe transversale au niveau de cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. Les tubules contournés proximal et distal présentent un aspect dépourvu des noyaux, sont complètement altérés (→). Le glomérule de Malpighi montre une modification structurale par dégénérescence des cellules podocytes et les mésangiales (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

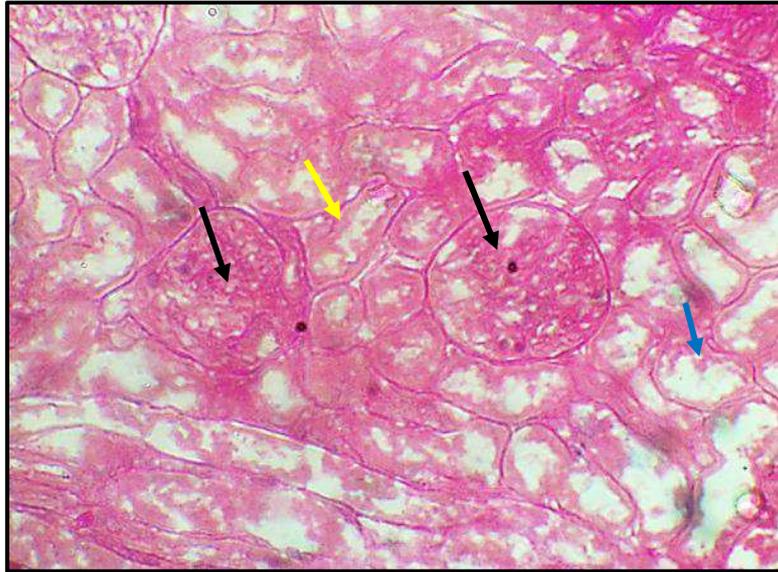


Planche 56 :coupe transversale au niveau de cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. Le glomérule rénale montre un aspect normal (→). Les tubules contournés distale (→) et proximal (→) montrent une perte leur noyau. (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

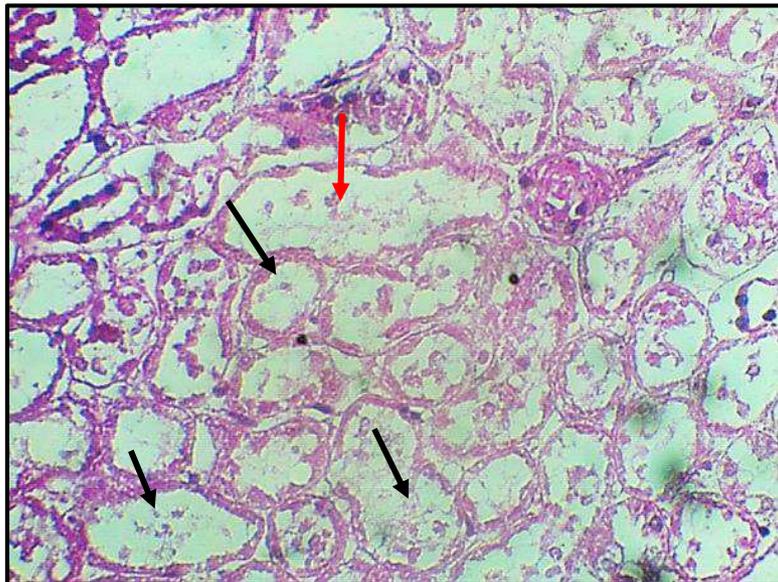


Planche 57 :coupe transversale au niveau de cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. Les cellules du tubes contournés proximales sont totalement altérées (→). La disparition de l'épithélium du tubes contournés distales (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

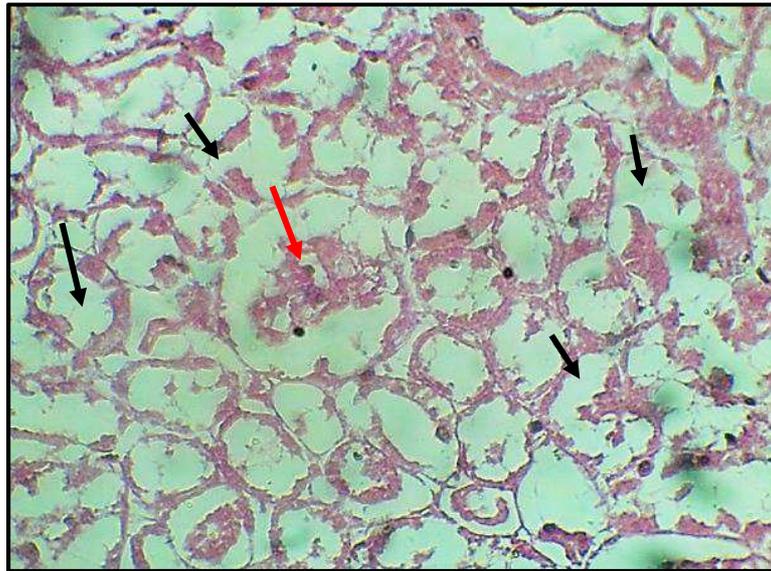


Planche 58 : coupe transversale au niveau de cortex d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. Les tubules distales et proximales montre une altération, leur épithélium est dégradé (→). Le glomérule de Malpighi montre une dégénérescence des capillaires et les cellules podocytes et mésangiales (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

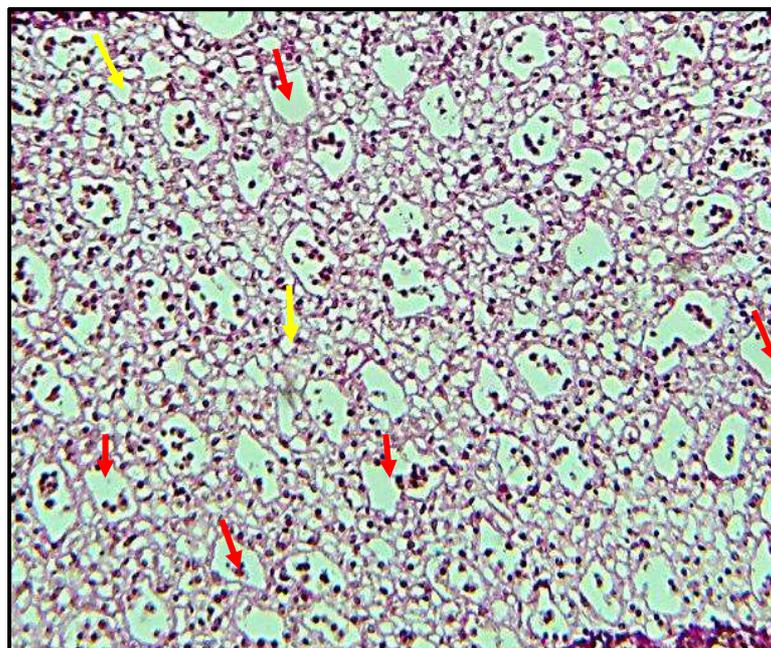


Planche 59 : coupe transversale au niveau de médula rénale d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. La lyse cellulaire au niveau des tubules collecteur (→) et l'anse de Henlé (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson)

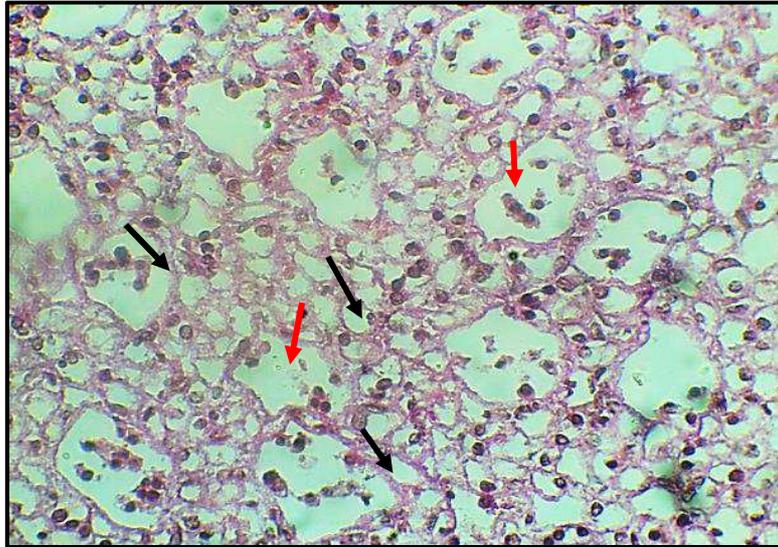


Planche 60 :coupe transversale au niveau de médulla d'un rein d'explant traité avec 5-nitroimidazol à concentration 12,5 mM pendant 24h. Les tubules collecteur est dépourvu d'épithélium avec altération des cellules (→). L'anse de Henlé est altérée (→). (G x 40, fixateur Bouin, coloration de Van Gieson).

DISCUSSION

IV. Discussion

Dans notre étude, nous avons évalué l'effet de trois molécules nitrées synthétiques à savoir le 1-méthyl-5-nitroimidazol, le 4-nitrobenzyl alcool et le 5-nitroimidazol sur les différentes parties oculaires et au niveau du rein du lapin local. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet explorant l'efficacité des molécules nitrées à réduire la méthanogenèse chez les bovins sans avoir pour autant des effets négatifs sur la santé animale.

Après avoir réussi les conditions de la culture cellulaire, nos résultats montrent une variabilité dans la réponse cellulaire et tissulaire en fonction du composé nitré administré et de l'organe étudié. Les tissus de même nature ont été altéré de la même manière mais avec des intensités variables selon la molécule utilisée.

Conformément aux résultats précédemment obtenue au niveau de notre étude, les travaux de **(Ayla, Nurcan, 2006)** montre que les métronidazole possède des propriétés cytotoxiques et produit des effets génotoxiques chez culture de lymphocytes du sang périphérique humains in vitro. La cytotoxicité est généralement due à son action de la réduction du groupe nitro des nitroimidazoles vis-à-vis de mammifères. **(Mark et al., 1989)**.

La rétine et la choroïde et la sclérotique montrent une altération, concernant la rétine présent une altération au niveau de déférentes couches cellulaires. Cependant les résultats obtenus par **(Mike et al., 1998)**, qui ont été testé l'effet des nitroimidazoles sur la rétine montrent que des segments sélectionné de la tige rétinienne interne est externe était gonflé et fragmenté, un état associé avec condensation cytoplasmique et les cellules de la couche nucléaire externe. Ainsi que montre une vacuolisation des photorécepteurs.

Les nitroimidazoles présentes différentes activités biologiques qui sont Liés à leur affinité électronique (réduction). **(Bahnous, 2007)**. Des études suggèrent que les nitroimidazoles produit des molécules telque les hydroxylamines par réduction des quatre électrons, a été isolé et s'est avéré être très réactif envers les molécules biologiquement importante en particulier le glutathion et la guanine. **(Mark et al., 1989)**.

Quoique nous ayons utilisé les nitrobenzènes, nous avons obtenu des effets similaires à ceux des NO radicalaire. Les nitrobenzènes réagissent avec GSH de deux manières : la formation directe d'adduit qui produit un sulfonamide et le cycle redox de GSH qui produit du glutathion oxydé (GSSG), la capacité de l'INO à épuiser les niveaux de GSH dans ces résultats ont été mesurés et comparés à un niveau provoquant la mort cellulaire. (Mark *et al.*, 1989).

D'autres études montrent que les nitroimidazoles sont instables dans différents milieux des cultures cellulaires. Au niveau de la cellule parce que le mécanisme de réaction de GSH avec les nitrobenzènes suggère qu'il peut y avoir une accumulation de GSSG des cycles redox. (Mark *et al.*, 1989).

Ces résultats suggèrent que le nitro intermédiaire peut jouer un rôle central dans la toxicité et les capacités d'appauvrissement en GSH du nitroimidazole dans les cellules mammifères. (Mark *et al.*, 1989).

Les nitroimidazoles montrent des altérations tissulaires et cellulaires. Au niveau du cortex rénal, tous les tubes contournés proximaux sont altérés montrant un épithélium unistratifié avec des cellules dépourvues de noyaux ou bien lysées. La majorité des glomérules de Malpighi montre une modification structurale soit par dégénérescence du réseau capillaire et des cellules associées à savoir les podocytes et les cellules mésangiales à l'intérieur du glomérule.

L'équipe de (Peggy, 1979) montre que l'incubation prolongée des cellules en culture dans des conditions aérobies, entraîne également une perte de capacité proliférative. Réduction partielle de groupe nitro avec auto-oxydation ultérieure des intermédiaires peut être responsable de la cytotoxicité limitée observée.

Aussi, une étude réalisée sur des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien humaines (lignée ARPE-19) et de lapin exposées au benzyl alcool à différentes concentrations et à travers le temps a montré une altération cellulaire dose- et temps-dépendante. Une concentration de 0,225 mg/ml causait des dommages ultra-structuraux et une perte de fonction cellulaire après 2 h et une concentration de 9,0 mg/ml était toxique après 5 min aussi bien au niveau des cellules humaines que celles de lapin. Les mécanismes majeurs impliqués sont la mort cellulaire par

nécrose(Chang *et al.*, 2008)et par apoptose, phénomène mis en évidence après une exposition des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien une concentration de 9,0 mg/ml pendant 6 h induisant 19% de cellules en début d'apoptose et 64,2% de cellules apopto- nécrotiques(Chang *et al.*, 2011).La signalisation impliquée dans l'apoptose met en jeu les production de radicaux libres oxygénés, l'activation de la caspase 8, la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial(Chang *et al.*, 2011).

Les nitroimidazoles provoque une toxicité multi organique chez les rongeurs (Mike *et al.*, 1998) .Les signes présenté une hypocellularité de la moelle osseuse, une déplétion lymphoïde multi organique.

Au niveau de la médulla, des altérations cellulaires sont nettement visibles avec l'altération de l'épithélium des tubes collecteurs où les cellules sont totalement détachées de la paroi et se sont dissociées les unes des autres et présente chez certaines une lyse cellulaire. Les branches de Henlé, de même, présentent une paroi dénuée de son épithélium

Le 1méthyle -2- nitroimidazoles (INO2), a été utilisé pour étudié le rôle possible des stress oxydative dans cette toxicité tissulaire normale. Les activités déférentes des enzymes antioxydants superoxyde dismutase et catalase pourraient être corrélé à la cytotoxicité aérobie d'INO2. (Christine *et al.*, 1998).

Pris ensemble, ces résultats corroborent fortement la conclusion selon laquelle la toxicité aérobie d'INO2 est due aux espèces d'oxygène actif créées par le cycle redox. (Christine *et al.*, 1998).

L'administration de métronidazole par voie orale ou parentérale peut avoir une toxicité neuro-ophtalmologie. Les complication rares mais graves sont réversibles à l'arrêt du traitement (Bouraoui *et al.*, 2016).

Les résultats que nous avons obtenus dans notre étude corroborent à ceux trouvés dans des études précédentes. La cytotoxicité du 4-nitrobenzyl alcool relevée sur les tissus oculaires et rénaux ressemblerait à celle du benzyl alcool.

En effet, la toxicité du benzyl alcool au niveau rétinien est retrouvée dans différents documents décrite par un changement de morphologie et de fonction, principalement par réduction des amplitudes de l'ERG. Ainsi, des études réalisées chez le lapin sain ont montrées que l'injection intra-vitréenne du benzyl alcool

réduisait temporairement et sélectivement la réponse rétinienne médiée par les photorécepteurs de type cônes (Myers et al., 2013). Cette toxicité a été observée également au niveau du système central nerveux chez des chiens injectés avec 1ml de benzyl alcool à 9% et après une injection intrathécale de 50ml de benzyl alcool à 1,5% causait une démyélinisation et une dégénérescence de nerfs chez le rat (**Deland, 1973; Feasby et al., 1983**).

CONCLUSION

Conclusion

Ce travail, initié dans le cadre de l'étude explorant la toxicité des molécules nitrées pour une future utilisation dans la réduction de la méthanogenèse chez les bovins, a permis de mettre au point la culture d'explants de la partie antérieure et de la partie postérieure de l'œil ainsi que celle des explants du cortex et de la médulla rénales de lapin et le maintien de la survie cellulaire.

Notre étude a permis la mise en évidence de quelques effets délétères du 1-Méthyl -5-nitroimidazol, 4-nitrobenzylalcool et 5-nitroimidazol *in vitro*. Ces résultats seraient le reflet d'une sensibilité différente entre les structures ou bien d'un métabolisme différent au sein des cellules.

Nous avons également montré que :

1- Dans la partie antérieure de l'œil :

- L'épithélium de la cornée était altéré quel que soit le traitement administré. Toutefois, le 1-Méthyl -5-nitroimidazol avait un effet plus prononcé que les deux autres. Les fibres de collagène du stroma cornéen n'ont subies aucune altération pour les trois traitements. Les kératocytes ont montré une sensibilité supérieure avec le 5-nitroimidazol.
- L'iris n'a été affecté qu'au niveau de l'épithélium postérieur avec la même intensité avec tous des traitements administrés.
- De même, au niveau des procès ciliaires, l'épithélium non pigmentaire était le plus affecté par les trois différentes molécules avec un effet marqué avec le 1-Méthyl -5-nitroimidazol et le 5-nitroimidazol, étant moins atteint avec le 4-nitrobenzyl alcool. L'épithélium pigmentaire étant affecté avec le 1-Méthyl -5-nitroimidazol uniquement.

2- Dans la partie postérieure de l'œil :

- Les fibres de collagène de la sclérotique n'ont subies aucune altération pour les trois traitements mais les fibroblastes ont montré une altération avec le traitement avec 4-nitrobenzyl alcool et le 5-nitroimidazol, le dernier étant plus toxique.
- La choroïde a présenté une dissociation des fibres collagène.

- La rétine a été très sensible aux différents traitements et chaque traitement a ciblé une couche cellulaire spécifique.

3- Dans la partie rénale :

- la structure la plus touchée a été les tubules contournés proximaux quel que soit le traitement.
- Les glomérules de Malpighi et les anses de Henlé ont été affecté différemment selon la molécule administrée.

D'autres travaux seraient nécessaires afin d'élucider les mécanismes de cytotoxicité impliqués dans les altérations tissulaires observées et d'autres concentrations seraient intéressantes à tester.

Références bibliographiques

Adolphe, M. (1988) Base des méthodes de culture. In: Culture de Cellules Animales: Méthodologies-Applications. INSERM, Paris, 1-8.

Agardh E et al., 1986. GABA immunore activity in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 27, 674-678.

Agaral S et al., 2002-Textbook of Ophthalmology. Jaypee Brothers Publishers .India .Ed : Jayebe. 3000p.

Ayla Ç et Nurcan A, 2006, The Frequency of Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocyte Treated with Métronidazole in Vitro, Drug and Chemical Toxicology, 1:85–94.

Bahnous M ,2007 , synthèse de nitroimidazoles par SRN 1, essais de quaternisation, mémoire de doctorat , université des frères mentouri constatine, P 08-15.

Boulton Mand Dayhaw-Barker P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. Eye. 15, 384–389.

Bouraoui R et al.,2016,effets secondaire neuro-ophtalmologique des traitement par métronidazole chez l'enfants : apropos de deux cas . archives de pédiatré volume 23 , issue 2 , february 2016, page 167-170.

Caroline C., 2011. Chirurgie du segment antérieur de l'oeil et traitement du glaucome par laser femtoseconde et imagerie de tomographie par cohérence optique. Optique [physics.optics]. Ecole Polytechnique X. Français, 2011.

Chalour N ,16 fevrier 2016 ,la reponse des cellules gliales de muller a l'amyloide -b et au stress oxydant dans la degenerencence retiniene,faculte de medcine-paris descartes,2012

Chang et al.,2008, in vitro benzyl alcohol cytotoxicity . implication for intravitreal use of triamcinolone acetonide . Expremental eye research 86(2008)942 – 950.

Chrestine B et al.,1994, mechanism of the selective hypoxic cytotoxicity of 1-methyl-2nitroimidazol, Biochemicd Ph~e~Io#, Vol. 48, No. 2, pp. 361-370,1994.

Références bibliographiques

Coutrois, Y. & Nourex, S. (1988) Les facteurs de croissance et la culture de cellules. In : Adolphe M.(ed), Culture de cellules animales Méthodologies Applications. INSERM, Paris, 17-18.

Dupont-Monod., J.16 juillet 2014, établissement et exploitation d'une ligne cellulaire de gliome canin pour la recherche thérapeutique, campus vétérinaire de Lyon ,2014.

Froger, B. & Adolphe, M. (1988) Besoins nutritifs des cellules en culture. In : Adolphe M. (Ed), Culture de cellules animales Méthodologies – Applications. INSERM, Paris, 9-15.

Gualino V., 2009-Ophtalmologie. De Boeck Secundair Paris .Ed. ESTEM . 220p.

Kolb H, et al., 2002. A new look at calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *J Comp Neurol.* 453:168-84.

Langdon, S. P., 2004 , Characterization and authentication of cancer cell lines, In: *Methods in Molecular Medicine*, vol. 88: *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, 3-15.

Macleod, R. A. et Drexler, H. G. 2004 Cytogenetic Characterisation of Tumor Cell Lines, In: Langdon S.P. (ed), *Methods in Molecular Medicine*, vol. 88 : *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, 57-76.

Mark B et al.,1989, 1- methyl-5nitroimidazol: cytotoxic and glutathione depleting capabilites ,radiation oncologie boil, phys ,vol,16,pp.1015-1019.

Mike A et al., 1998,Nitro-Imidazole Radio sensitizer-Induced Toxicity in Cynomolgus Monkeys, toxicologic pathology, vol. 26, no. 5. pp. 651-656.

Naïma C, 2012, la réponse des cellules gliales de Müller a l'amyloïde- β et au stress oxydant dans la dégénérescence retienne, thèse de doctorat, université de paris, P14-23

Peggy L, 1979, Influence of cellular environment on toxicity of nitrohetrocycles, *Chem.-Biol. Interactions*, 27 (1979) 281-290.

Xie J et al.,2015 ;potential confounding effects of benzyl alcohol as a formulation excipient support the elimination of the abnormal toxicity test from pharmacopoeias *Regulatory toxicology and pharmacology*, volume 73,issue 2,Novembre 2015, pages 509-514.

Références bibliographiques

Zama S, 2015. Les Dérivés Poly-Hétérocycliques : les Halogénoimidazoles et Benzimidazole-Hétérocycles : Synthèse, Réactivité et Evaluation Biologique, thèse de doctorat, université des frères mentouri constatine, P 12-18.

