REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRTIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DE SCIENCE

Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Spécialité : Immunologie et Maladies Infectieuses

THÈME :

Etude des mécanismes inflammatoires et histologiques impliquant le monoxyde d'azote dans un modèle expérimentale d'emphysème pulmonaire chez les souris BALB/c

Présenté par :

- SALI Maha **- SLIMI Ouahiba**

Soutenu publiquement le : 20 /06/2017 devant le jury composé de :

Membre	Nom et prénoms	Grade	Université
Président	BENHAFRI Nadir	MAA	Dr Yahia Farès Médéa
Promotrice	DOUAOUI Sanaa	MAA	Dr Yahia Farès Médéa
Co-promotrice	MOUZAOUI Fatima Alzahraa	MAB	Dr Yahia Farès Médéa
Examinateur 1	NASRI Riad	MAA	Dr Yahia Farès Médéa
Examinateur 2	BENAMARA Radia Rabia	MAA	Dr Yahia Farès Médéa

Année universitaire: 2016/2017

Dédicace :

-Louange à dieu le très clément qui m'a enseigné le savoir et m'a guidé au milieu des ténèbres de l'ignorance par sa lumière divine.

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude.

L'amour, le respect, la reconnaissance….

Je dédie ce modeste travail à :

-A ma très chère mère :

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait.

*Je dédie cet évènement marquant de ma vie à la mémoire de **ma grande mère** disparue trop tôt. J'espère que du monde qui est sien maintenant, elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de sa petite fille qui a toujours prié pour le salut de son ame, puisse Allah, le tout puissant , l'avoir en sa sainte miséricorde, c'est dans ces moments que ton absence a me pèse cruellement.*

-A mon très cher papa :

Pour son amour et ses sacrifices sans limites durant toutes ces années d'études, pour son soutien dans les moments difficiles.

Vous avez toujours cru en moi tout au long de mon parcours universitaire, même dans mes moments de doute, vous avez toujours respecté et encourager mes choix, puisse le tout puissant vous donnez santé, bonheur et longue vie afin que je puisse mes combler à mon tour.

« Je t'aime papa »

-A ma très chère sœur Aziza :

Qui ma beaucoup soutenu et encouragé très fortement dans ma réalisation de ce travail et dans toutes ma vie.

***-A mon très chère Toufik :** qui mon toujours fait confiance de moi, et cime considérer comme la fille idéale, il a toujours me l'aimer.*

***-A ma très petite sœur Amina,** a tous mes amies*

A mon binôme ma vraie sœur Maha sans vous je pourrai plus avancer, et leur famille.

*A tous ma famille « **SLIMI** »,A tous qui me sont très chères ,A tous ceux qui m'aime ,A tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et encouragé tout au long de mon corsus universitaire.*

Wahiba

Dédicace

Au nom de Dieu le Miséricordieux,

A coeur vaillant rien d'impossible,A conscience tranquille tout est accessible Quand il y a la soif d'apprendre. Tout vient à point à qui sait attendre Quand il y a le souci de réaliser un dessein.
Tout devient facile pour arriver à nos fins Malgré les obstacles qui s'opposent dieu merci.

Je remercer en premier lieu le Dieu qui m'a donné la santé,la patience et la volonté pour arriver à ce stade et réaliser ce travail .
Je tien a remercier
-A mes très chers parents, *aucun dédicace ne serait exprimé l'amour l'estime , le dévouement , et respect que j'ai toujours eu pour vous , ma mère et mon père qui n'ont cessé de m'encourager et qui ont toujour était à mes cotés et qui ont toujours donné le meilleur d'eux meme pour avoir réussir ce travail est le fruit de tes sacrifices que vous je t'aime mes parents .*
Toutes les mots ne sauraient exprimer la gratitude,l'amour ,le respect ,la reconnaissance à mes tantes , ma grand-mère et mon oncle Rachid , et ma tante paire ZENAINI Zohir merci beaucoup
-A ma chère tante *HERICHE Fatiha qui ma donné l'encourage , la supplication ,merci*
-A mes frères, *Belkacem , Mahfoud,Abdellah et Zine elabidine et ma grande pleasure ma frère et mon ami Mohamed je t'aime et je te remercie beaucoup .*
-Ma voisine *ma tante FETOUMI Mezoura*
-Mon cousin *HERICHE Oussama*
A tous les membres de ma famille, Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection
-A mes chères amies *BEN ISA YAHIA Hadjer, LAROUCI DILMI Imene,TCHIKOU Nacira , OULD RAMOUL Yasmin , CHAOUCHE Ilham, ETTAHRI Maroua, SAIDANI Sihem, HILALI Hizia, DOUMA Somia,BOUHMAD Fatiha, LAZAZI Meriem, BAHRIA Karima .*
Et pour les garcons LARBI Nabil, Guettar Moussa et DAOUDI Mohammed
A Tous les gens qui vous ont aidé a me remercier financièrement et moralement très bien et a tous ceux qui ont croisé mon chemin .
A ma copine et ma sœur ***«SLIMI Wahiba »*** *Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité merci ma copine.*
Pour tous les gens qui me aiment et souhaitent mon succès

MAHA

Remerciements

Nous adressons nos sincères remerciements à :

Le bon dieu, tout puissant et miséricordieux pour nous avoir donné la santé et la force de mener ce travail.

Nous adressons nos remerciements particuliers au ***professeur***

« Mr OUMOUNA Mustapha » *le doyen de notre faculté ainsi que notre professeur d'immunologie c'est grâce à lui que nous avons aimé la biologie, nous remercions pour leur* soutien sans faille tout au long de notre étude.

-A notre promotrice de mémoire :

Mademoiselle ***« DOUAOUI Sanaa »,*** *de nous avoir fait confiance en nous confiant un sujet aussi passionnant pour notre projet fin d'études et pour leur conseilles, l'encouragement et leur soutien tout au long de ce travail de mémoire avec bienveillance et disponibilité.*

Par ce travail, nous espérons faire honneur à vos enseignements et être digne de la confiance que vous nous avez accordée.

A monsieur « BELHAFRI Nadir» *qui nous fait l'honneur de bien vouloir présider notre jury.*

-A nos examinateurs : «Mr ***NASRI Riad*** » et **«M^{me} BENAMARA Radia Rabia »** *pour avoir accepté de juger notre mémoire.*

-A notre Co-promotrice : « M^{me} MOUZAOUI FZ » pour leur aide.

-A les membres de complexe « ***Saidal***» pour leur aide dans l'attribution des souris, sans oublier monsieur « SALI Ahmed »

-A Mademoiselle NAGAB pour leur aide avisée.

-**A monsieur MAZAARI** NourEddin

Enfin *au laboratoire de biologie de l'université de* ***« Docteur Yahia Farès ».***

Résumé :

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une affection pulmonaire dont le premier facteur de risque est le tabagisme. Elle est caractérisée par une diminution progressive des débits aériens non totalement réversible associée à une destruction des parois des alvéoles et une inflammation chronique. Cette maladie, est un véritable problème de santé publique qui pourrait, selon l'OMS, être la 3èmecause de décès à l'horizon de 2020.

L'objectif de notre étude est d'établir un modèle murin de BPCO chez des souris male de type BALB/c afin d'étudier, d'une part, les changements histologiques et anatomiques d'emphysème au cours de la BPCO. D'autre part, une analyse de l'expression du monoxyde d'azote (NO) plasmatique a été réalisée.

La démarche expérimentale a été élucidé comme suivante : il s'agit d'une étude de type témoin basée sur trois injections intra péritonéale de l'extrait de tabac (CSE) fraichement préparé pour chaque administration pour les lots du souris traitées et des injection du PBS stérile pour les lots du souris témoins, selon un calendrier bien précis durant un mois d'expérimentation (j1, j12, j23 et sacrifice en j29). Par la suit une étude macroscopique des rates et des poumons a été réalisée ainsi qu'une analyse histologique des coupes transversales des poumons ont été procédées par la coloration d'hématoxyline et à l'éosine (HE). En fin, des dosages plasmatiques du monoxyde d'azote (NO) ont été faites par la méthode griess afin d'évaluer sa teneur et son association aux processus inflammatoires et aux changements histopathologies observés.

Les résultats obtenus révèlent une destruction des parois pulmonaire et des lésions tissulaires témoignent d'une installation d'un emphysème pulmonaire. Aussi, une expression systémique importante du NO a été notée et ceci en association avec l'infiltration des cellules inflammatoires au poumon et parfois une hémorragie locale signe d'hypertension pulmonaire.

Finalement, toutes ces observations présentent des similitudes avec les mécanismes physiopathologiques observés chez les patients atteints de BPCO ce qui suggère que ce modèle expérimentale est un bon exemple d'étude pour cette maladie.

Mots clé:modèle murin, BPCO**,** emphysème, concentré de tabac, monoxyde d'azote

Liste des abréviations :

µl : Microlitre

µM : Micromole

C° : celsius

cm : centimètre

g : gramme

h : heure

v : volume

m : masse

C : Concentration

n :nombre

nm : nanomètre

j :jour

mbar :millibar

Kpa :Kilopaskall

AAT: Alpha-Anti-Trypsine

ATPase : **A**dénosine **T**ri-**P**hosphatase

BAL: Lavage Broncho-Alvéolaire

BH_4 : Tétrahydrobioptérine

BPCO : Broncho-pneumopathie Chronique Obstructive

BTS: British Thoracic Society

CD: Cluster of Differentiation

CEB: Cellules Epithéliale Bronchique

CEV : Cellule Endothéliale Vasculaire

CO : Monoxyde de Carbone

CV: Capacité Vitale

CXCL : Chimiokine (C-X-C motif) Ligand

CXCR: Chimiokines (C-X-C motif) Receptor

CS : Cigarette Smoke

CSE :Cigarette smoke extract

DO : Densité optique

ECM : Matrice Extracellulaire

ECP: Protéine Eosinophile Cationique

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

F: Fibroses

FAD : Flavin adenine dinucleotide

FMN : Flavin mononucléotide

FC: Fragment Cristallisable de l'anticorps

GCSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GE: groupe d'etude

GM-CSF: Granocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

GT: groupe témoins

GE : groupe d'étude

HE: Coloration Hématéine/éosine

IL : Interleukine

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule

iNOS : NO synthase inductible

Kcl : Chlorure de Potassium

KH_2PO_4 : Hydrogénophosphate de Potassium

Kpa :Kilopascal

LB: Lymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharide

LTB-4 : Leukotriène B4

LT : Lymphocytes

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

MAC: Macrophage

MMP : Métallo Protéases Matricielles

MO : Microscope Optique

Nacl: Chlore de Sodium

NADPH : Nicotinamide adeniné dinucleotide phophate

Na_2HPO_4 : Hydrogénophosphate de Sodium

NaOH: Hydroxide de Sodium

$NaNO_2$: Sodium Nitrite

NF-kβ: Nuclear factor Kappa β

NK: Natural Killer

NO: Monoxide d'azote

NO_2^-: Dioxyde d'azote

NOS: NO synthase

PBS: Phosphates Buffer Salin

PBS-CS: Phosphate Buffer Salin-cigaratte smoke

PI-1: Protease Inhibitor-1

PH:Potontiel Hydrogène

PN: Polynucléaire Neutrophile

RANTES: Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

ROS: Reactive Oxygen Species

Rpm: Rotation par minute

SPLF : Société de Pneumologie de Langue Française

TGFß: Transforming Growth Factor beta1

TIMP : Inhibiteur Tissulaires des Métalloprotéases

T° : Température

Th: T Helper

TLR: Toll-like Receptor

TNFα: Tumor Necrosis Factor Alpha

Treg: T Régulatrice

VAD: Voie Aérienne Distale

VAP: Voies Aériennes Périphériques

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor receptor

VEMS : Volume Expiration Maximum Seconde

Liste des figures :

Figure 01 : Schéma représentative de la Bronchite chronique ……...06
Figure 02 : Schéma représentative d'Emphysème centrolobulaire et pan-lobulaire……...07
Figure 03 : Schéma représentative les manifestations intra et extra-pulmonaire
au cours de la BPCO……...……..08
Figure 04 : L'aspect anatomopathologique des voies aériennes pulmonaires
Chez les patients BPCO…….....08
Figure 05 : Les évènements moléculaires et cellulaires immuno- pathologique
De la BPCO ……....11
Figure 06 : Nitric oxide (NO) et ces dérivés. INOS : NO Synthase Inductible……...16
Figure 07 : Protocol de préparation de l'extrait de tabac…….23
Figure 08: protocole expérimentale pour la réalisation des coupes histologiques
Au niveau de poumons……..25
Figure09 : Démarche expérimentale …….....27
Figure10 : Evolution pondérale des différents groupes au début et à la fin
de l'expérience……..28
Figure 11: Aspect morphologique de la rate chez les souris témoins(a) souris traité par
CSE (b)……..29
Figure12 : Aspect morphologique de poumons chez les souris témoins(a) souris traité par
CSE (b)……..31
Figure13 : Coupe Transversale au niveau de lobe droite supérieur de poumon
de souris témoins et traités (coloration HE observées au microscope photonique
à G 10x10)……32
Figure14 : Coupe Transversale au niveau de lobe gauche supérieur de poumon de souris
CSE (coloration HE observées au microscope photonique à (G10×40)……...32
Figure15 : Coupe Transversale au niveau de lobe gauche supérieur de poumon de
souris CSE (coloration HE observées au microscope photonique à (G10×100)……..33
Figure16 : la teneur plasmatique des Nitrites résiduels……...35
Figure17 : classification des souris étudiées en fonction de la teneur plasmatique
des nitrites résiduels……36
Figure18 : Coupe transversale au niveau de lobe gauche supérieur de poumon de souris
CSE(Coloration HE observé au microscope optique (G : 10 x40)…….....38

Listes de Tableaux :

Tableau 01 : Classification de la BPCO ……02
Tableau 02 : L'évolution pondérale au cours de l'expérimentation.……28
Tableau 03 : Mensuration des dimensions des rates de souris des deux groupes étudiés…...30

Tables des matières :

Dédicace
Remerciements
Liste des abréviations
Listes des figures
Résumé
Sommaire
Introduction générale……..... 01

Partie I : Recherche Bibliographiques

I. Généralité sur la Bronchopneumopathie Chronique Obstructive(BPCO)

I.1.Définition……. 02
I.2Classification……. 02
I.3.Epidémiologie……..... 03
I.4.Facteurs étiologique……. 03
I.4.1.Facteurs endogènes (facteurs génétique) ……. 03
I.4.2.Facteurs exogènes (l'environnement) …….. 04
I.4.3.Autres facteurs de risque……. 04
I.5.L'aspect anatomopathologie…… 04
I.5.1.Lésions des vaisseaux pulmonaires (Bronchite chronique)…….. 05
I.5.2.Lésions des grosses voies aériennes (emphysème)…….. 06
I.6.Les manifestations cliniques…… 07
I.7.Diagnostic…… 09
I.8.Traitement…… 09

II. La Physiopathologie de la BPCO

II.1.Définition…… 11
II.2.Les cellules inflammatoires…… 12
II.2.1.Les cellules myéloïdes…… 12
II.2.1.1.Macrophages…… 12
II.2.1.2.Polynucléaires neutrophiles…… 12

II.2.1.3.Autres…….. 13
II.2.1.3.1.Eosinophiles et Mastocytes…….. 13
II.2.1.3.2.Les cellules épithéliales……... 13
II.2.2. Les cellules lymphoïdes…… 14
II.2.2.1.Les cellules lymphocytaires Th1 (CD4) TH17 et Treg……... 14
II.3.le monoxyde d'azote dans le BPCO……. 14
II.3.1.le Monoxyde d'azote(NO) …… 14
II.3.2.Biosynthèse du monoxyde d'azote ……... 15
II.3.3.Les NO Synthases ……. 16
II.3.4 Participation des radicaux libres de l'oxygène (ROS) au développement de l'emphysème……... 16

I.3. Model murin de BPCO

I.3.1.Les conditions pour avoir un bon model de la BPCO……. 18
I.3.2. Espèce, âge et sexe de model BPCO……..... 18
i.3.3.les majeur approches d'induction des signes de BPCO expérimentales (emphysème)…… 19

Partie II : Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes…….…… 21
I.1.Matériels…… 21
I.1.1.les matériels non biologique…… 21
I.1.2.les matériels biologique……. 21
I.1.2.1Les animaux (les souris) …… 21
I.1.2.2.Le concentré de tabac……. 21
I.1.2.3.Le plasma…… 22
I.1.2.4.Récupération des organes…… 22
I.2.méthodes…… 22
I.2.1.préparation de la solution CSE- PBS…… 22
I.2.1.1.PREPARATION DE SOLUTION PBS……... 22
I.2.1.2.PREPARATION DE L'EXtrait de tabac CS…… 22
I.3.L'induction de l'emphysème…… 23
I.4. Dosage du monoxyde d'azote …… 23
I.4.1.PRINCIPE DE METHODE GRIESS…… 23
I.4.2.Mode opératoire……. 24

I.5. ETUDE MACROSCOPIQUE ET histologique…….. 24
I.5.1 Etude macroscopique……. 24
I.5.2 .Etude histologique…… 25
I.6.analyse statistique……. 26
La démarche expérimentale……..... 27

Partie III : Résultats et Discussion

III.1.Evolution pondérale de différents groupes……. 28
III.2.Etude macroscopique…….. 29
III.2.1.l'Aspect morphologique de la rate……... 29
III.3.L'Aspect morphologique des poumons…….. 30
III.4.Analyse histologique des poumons…… 31
III.5.Dosage de monoxyde d'azote……. 34
III.5.1.Etude de la production du monoxyde d'azote ex-vivo par la méthode de Griess 34
Modifiée……
III.6.Analyse de l'association entre l'emphysème et la production de NO……..
38
Conclusion……. 39
Référence bibliographique
Les annexes

Introduction

Introduction :

La muqueuse respiratoire est l'interface entre l'organisme et le monde extérieur, elle est donc en première ligne de défense face aux agresseurs polluants tels que les particules de tabac la fumé de cigarette. Ces agresseurs sont considérés comme des facteurs de risque de plusieurs pathologies chroniques, pulmonaires et extra-pulmonaire, parmi ces maladies on a : la Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

La BPCO qui est un problème majeur de la santé publique à la fois pour sa sévérité et sa fréquence. Selon l'organisation mondiale de santé, sa prévalence sera doublée en 2020 ce qu'il a rend la 3ème cause de mortalité dans le monde entier.

C'est une pathologie regroupant l'ensemble des maladies obstructives broncho-pulmonaires, à l'exclusion de l'asthme. Elle se définit par trois grand phénotype y compris la bronchite chronique, l'hypersécrétion de mucus et l'emphysème, ils existent séparés ou en combinaison.

Le fumé de tabac est considéré comme le principal facteur responsable de développement de la maladie car il joue un rôle crucial dans l'activation et l'attraction des cellules immunitaires. Ces dernières libèrent d'autres molécules tels que les cytokines pro-inflammatoire, ces éléments contribuent au développement d'une inflammation pulmonaire se traduit par les différents signes caractéristique de BPCO dont les mécanismes physiopathologiques restent mal élucidés.

Dans cette optique, afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous nous intéressons en premier lieu à l'établissement d'un modèle expérimentale murin. Nous avons choisis un modèle de l'emphysème pulmonaire observé lors de la BPCO présentant des similitudes avec l'anatomie pulmonaire de l'homme.

Aussi, nous avons renforcé cette étude histologique par la mesure de taux de monoxyde d'azote(NO). Le NO qui est définit comme étant un biomédiateur détecté au cours de plusieurs pathologies inflammatoires **[McMicking et *al* ,1997]**, afin d'éclaircir le lien entre l'emphysème et le changement d'expression de ce biomarqueur inflammatoire.

Partie I : Recherche bibliographique

I.I : Généralités

I. Généralité sur la Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

I-1. Définition :

La BPCO est une maladie chronique qui se caractérise par une limitation non totalement réversible des débits aériens, souvent lentement progressive. Cette limitation des débits est secondaire à une réponse inflammatoire anormale après inhalation d'aerocontaminant (particules, gaz délétère) dont le principal est fumée de tabac **[GOLD ,2009]**.

I-2 .Classification de la BPCO :

La meilleure façon d'estimer l'obstruction bronchique est la spirométrie. La diminution du rapport de Tiffeneau définit le syndrome obstructif et la valeur du VEMS spécifie de degré d'obstruction qui permet de classer les patients BPCO selon des stades de sévérité différents. Il existe plusieurs classification internationales pour définir l'obstruction la plus usuellement pratiquée est la «Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) », selon le GOLD en 2006 on distingue quatre stades de sévérités **[GOLD, 2009]** semble être standard actuel.

Elle classe les patients BPCO en quatre stades de sévérité selon la valeur de leur VEMS :

GOLDI (faible)	VEMS/CV<0.70 et VEMS1≥ 80% prédite
GOLDII (moyen)	VEMS/CV<0.70 et 50%≤VEMS1<80% prédite
GOLDIII (sévère)	VEMS/CV<0.70 et 30%≤VEMS1<50% prédite
GOLDIV (très sévère)	VEMS/CV<0.70 et VEMS1<30% prédite

Tableau 1 : Classification de la BPCO **[Atsou et al ,2012]**

I-3. Epidémiologie :

Dans le monde, la mortalité par la BPCO devrait doubler en 2020 par rapport à 1990 et devenir la troisième cause de mortalité (après les cardiopathies ischémiques et les maladies cérébrovasculaire) en raison de l'augmentation du tabagisme, notamment chez les femmes **[Murry et al, 1997] .**

En France, la prévalence des BPCO est estimée à 15,5% chez les hommes et 14.8 % chez les femmes **[Molinie et al, 2003] .**En Amérique plus de 26 millions américains souffrent de cette pathologie en 2003 et représente la 4ème cause de mortalité **[Mapel et al, 2004]**. En Algérie la prévalence des BPCO est vraisemblablement sous estimée car ces affections ne sont généralement diagnostiquées qu'une fois devenues apparentes sur le plan clinique et déjà passablement avancées .Une étude statistique en Algérie a estimé qu'en 2010 la prévalence de la BPCO serait de 250.000/36.000.000 habitants**[Zidouni et al,2005] .**

I-4 .Facteurs étiologiques :

Les facteurs de risque incriminés dans la BPCO sont à la fois liés au patient et à l'environnement **[GOLD, 2005]**.

I- 4-1. Facteurs endogènes :

Le facteur héréditaire le mieux connu dans l'étiologie de la BPCO est le déficit en alpha 1 antitrypsine. La mutation génétique à l'origine de ce déficit est rare et atteint généralement des personnes d'Europe du Nord. Elle se transmet sur le mode récessif. La conséquence de cette mutation est une moindre résistance du tissu pulmonaire aux agressions **[Senn et al ,2005].**

On compte aussi l'hyperréactivité bronchique (elle-même dépendant à la fois de facteurs génétiques et environnementaux) est un autre facteur de risque connu de la BPCO **[GOLD, 2005].**

La croissance des poumons pendant la gestation et l'enfance interviendrait également dans la prédisposition à la BPCO **[GOLD, 2005].**

Pendant longtemps, la prévalence de la BPCO et la mortalité qui y est liée étaient nettement supérieures chez les hommes par rapport aux femmes. Cela ne semble plus être le cas actuellement dans les pays industrialisés ou les deux sexes sont quasi égaux devant cette pathologie **[GOLD, 2005].** Cette nouvelle tendance reflète vraisemblablement le changement de comportement tabagique des femmes, mais pourrait révéler également une plus grande susceptibilité des femmes aux effets du tabac **[GOLD, 2005].**

I-4-2. Facteurs exogènes :

De nombreuses substances toxiques pour les poumons peuvent intervenir dans le développement de la BPCO avec une contribution plus ou moins importante **[GOLD, 2005].** Le tabagisme constitue le facteur de risque majeur de la BPCO, la fumée de tabac contient de multiples composants chimiques et oxydatifs qui peuvent être impliqués dans la genèse de l'inflammation caractérisant la BPCO **[GOLD, 2005].** Ces composants peuvent agir sur plusieurs aspects de la physiopathologie de la BPCO : stimulation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires, effet toxique directe sur l'épithélium et la matrice extracellulaire, déséquilibre de la balance protéase anti protéase par différents mécanismes et induction d'un stress oxydatif **[GOLD, 2005].**

Le tabagisme est un facteur de risque bien connu menant : au cancer de divers organes, les maladies des artères et des maladies respiratoires comme la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) **[Almiral, 2004]**.

Le tabagisme constitue le facteur de risque majeur impliqué dans plus de 80% des BPCO **[GOLD, 2006]**.

I-4-3 Autre facteurs de risque :

Des antécédents infantiles d'infections sévères ont ainsi été associes à une diminution de la fonction pulmonaire et à une augmentation des symptômes d'atteinte respiratoire à l'âge adulte **[GOLD, 2005].**

I-5. L'aspect anatomopathologique :

Deux mécanismes sous-tendent l'obstruction bronchique de la BPCO. Il s'agit de l'atteinte des petites voies aériennes et de la destruction du parenchyme pulmonaire **[GOLD, 2005].**

La contribution relative de ces des deux mécanismes diffère largement d'une personne à l'autre **[GOLD, 2005].**

Précédemment, on insistait sur cette différence, en dissociant la **bronchite chronique** (modification de la structure des bronches et hypersécrétion bronchique), de l**'emphysème** (dilatation des espaces aériens et destruction des parois alvéolaires).Actuellement, certains experts considèrent que la définition de la BPCO peut se passer distinction **[GOLD, 2005].**

I-5-1. Lésion des vaisseaux pulmonaires :

I-5-1-1. Bronchite chronique :

La bronchite chronique est caractérisée par une inflammation de la muqueuse bronchique, une hyperplasie des glandes muqueuses, une hypersécrétion bronchique et une augmentation de la perméabilité épithéliale **[MacNee, 2006].**

La Fumée de cigarette favorise la migration des cellules inflammatoires dans l'épithélium et l'hypersécrétion de mucus. Les atteintes des grosses bronches sont faiblement corrélées à la sévérité de l'obstruction évaluée sur le VEMS **[Lams, 2004].** A ce titre, la bronchite chronique n'est pas obligatoirement associée à un trouble ventilatoire obstructif, mais en constitué un facteur de risque **[Lams, 2004].**

30%des patients atteints de bronchite chronique développent ultérieurement un trouble ventilatoire obstructif **[Molfino, 2005]**. Cependant, les lésions inflammatoires des petites bronches et des bronchioles, présentes dès les stades précoces, sont d'autant plus importantes que la BPCO est sévère **[Molfino, 2005]**. Ces lésions inflammatoires sont caractérisées par l'épaississement de la paroi bronchique et par l'obstruction de la lumière bronchique par un exsudat inflammatoire et muqueux **[Molfino, 2005]**. L'infiltrat inflammatoire (macrophages, lymphocytes T et B) participent à l'obstruction endo-liminale et à l'épaississement de la paroi des petites bronches **[Molfino, 2005]**.

Il se définit aussi comme une expectoration chronique due à une augmentation de la production des sécrétions bronchiques durent au moins trois mois par ans consécutifs, sans autre cause identifie. En effet, l'agression de l'épithélium bronchique par un aerocontaminant va entrainer des cils vibratiles ainsi qu'une inflammation de la muqueuse **[Similoswski, 2007]**. On observera alors une augmentation de la taille et du nombre de glandes à mucus (augmentation de la sécrétion du mucus) et une hyperplasie des cellules caliciformes (diminution de la lumière bronchique**) [Similoswski, 2007]**.

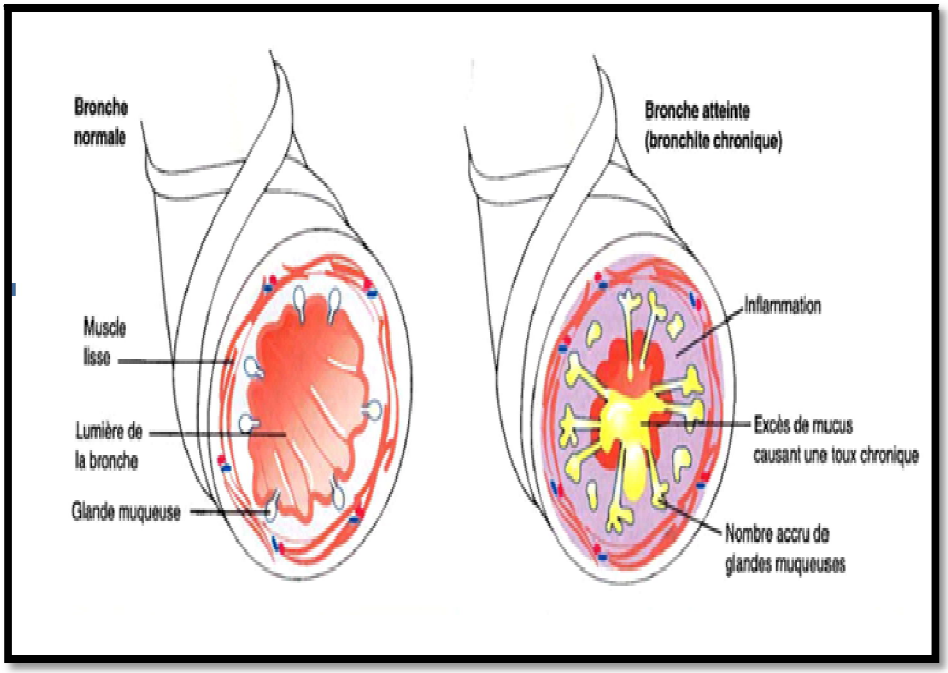


Figure 1 : Schéma représentative de la Bronchite chronique **[Brunner et al, 2006].**

I-5-2. Lésion des grosses voies aériennes :

I-5-2-2 .L'emphysème :

L'emphysème est du à la détérioration ainsi qu'à la disjonction des fibres élastique des poumons qui seront remplacées par des fibres plus épaisses et irrégulières (remodelage pulmonaire) **[Similoswski, 2004].** La définition de l'emphysème se fait sur des critères anatomiques, le diagnostic de celui-ci reposant sur l'imagerie médicale (scanner**) [Reychler, 2007].** Il se caractérise par une dilatation anormale et permanente des territoires pulmonaires situés en aval des bronchioles et à la perte d'élasticité alvéolaire.

Il existe deux types d'emphysèmes : les emphysèmes centrolobulaire (atteinte des bronchioles respiratoires) et pan-lobulaire (atteinte des canaux et sac alvéolaires). Tous ces phénomènes vont tendre à diminuer la force de rétraction élastique du poumon**) [Reychler, 2007].**

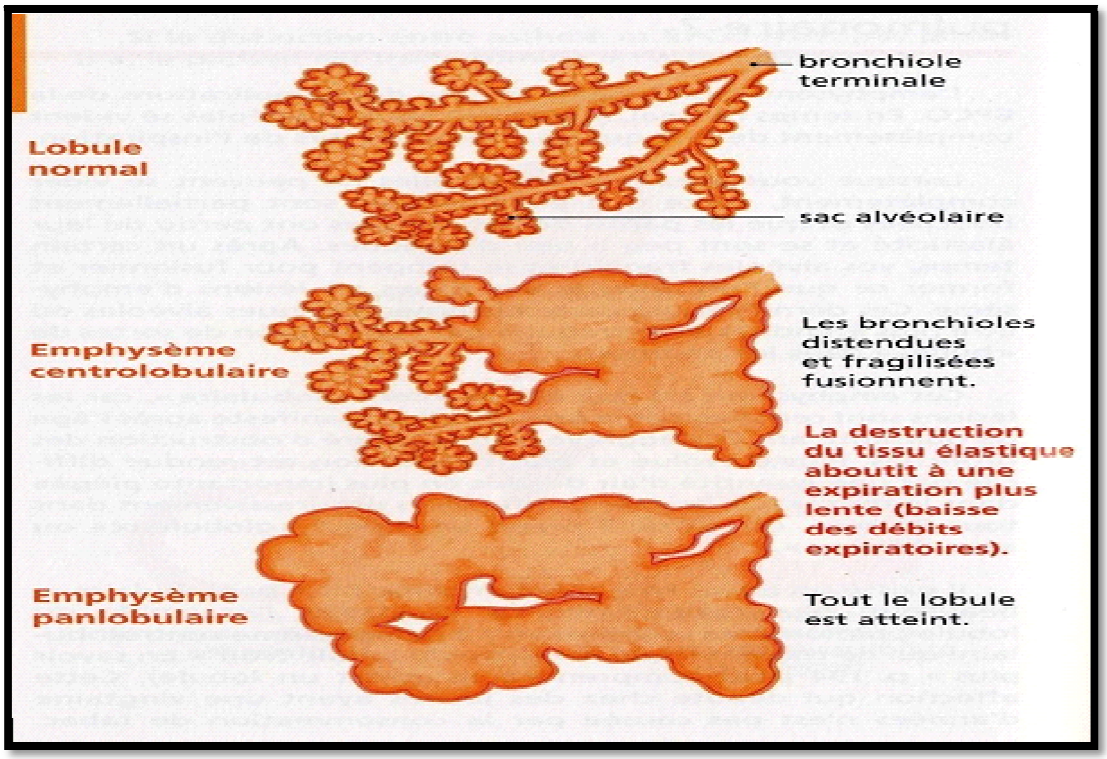


Figure 2 : Schéma représentative d'Emphysème centrolobulaire et pan-lobulaire **[SPLF, 2004]**.

I-6. Les manifestations cliniques :

Les symptômes de la BPCO et l'asthme peuvent être très semblables .Il n'est donc pas toujours aisé de différencier ces deux pathologies. D'autant qu'elles peuvent coexister chez le même patient **[Global strategy ,2006]**.

Une toux modérées le matin (toux de fumeur) et des expectorations sont souvent les premières manifestations de la BPCO et peuvent précéder les signes d'obstruction bronchique de plusieurs années **[Institut de veille sanitaire, 2006]**.

Généralement, les symptômes n'apparaissent pas avant 40 ans **[WHO, 2006]** et sont largement ignorés par les patients **[GOLD, 2005].**

Progressivement, une dyspnée s'installe. Elle est alors persistante (présente chaque jour) et peut être aggravée par l'effort ou par une infection respiratoire **[GOLD, 2005]**.

En outre, les patients souffrant de la BPCO ont généralement des comorbidités associées, comme l'atrophie musculaire, les maladies cardiovasculaires, la dépression, l'ostéopénie, et les infections **[Sin et al, 2006]** qui contribuent à une forte morbidité de la maladie.

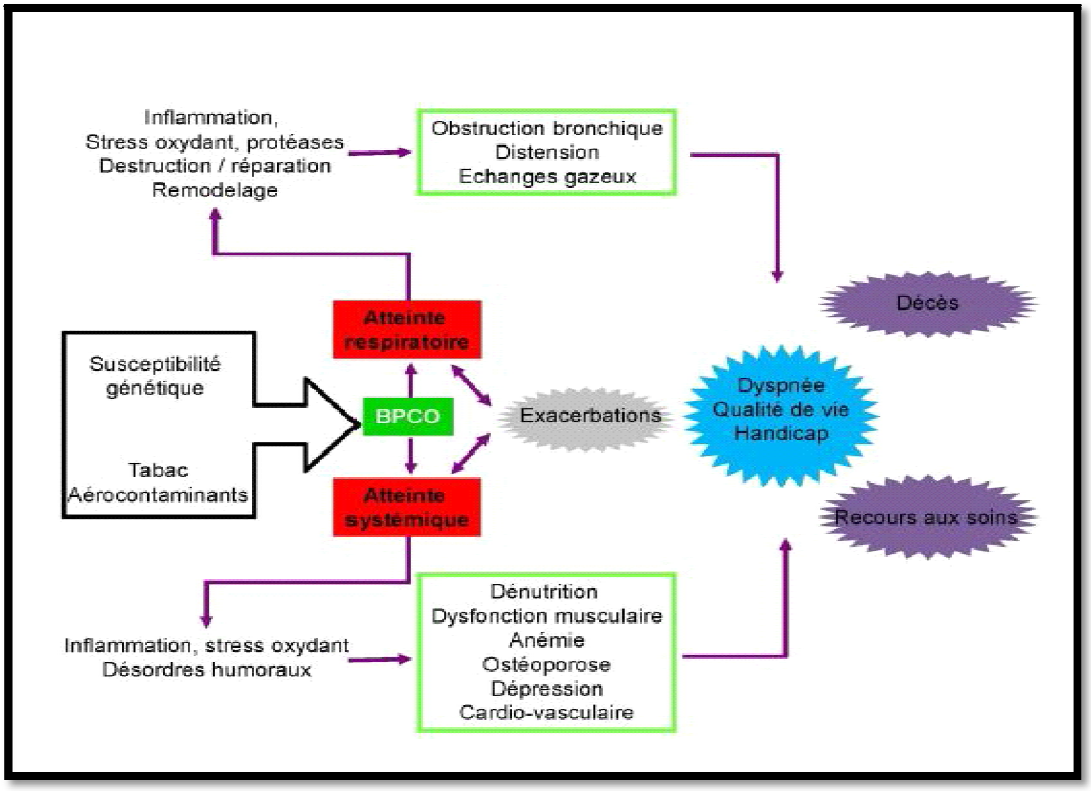


Figure 3 : Schéma représentative les manifestations intra et extra pulmonaires au cours de la BPCO **[Atsou, 2012]**.

La BPCO est marquée par des épisodes d'exacerbations, impliquant des pathogènes bactériens et /ou viraux dans 80 % des cas [**Sethi, 2004].** La limitation des débits aériens vésicatoire résulte de deux mécanismes distincts, mais souvent associés : l'obstruction des voies aériennes (bronchite chronique obstructive) et la destruction du parenchyme pulmonaire (emphysème) **[Djelili ,2013].**

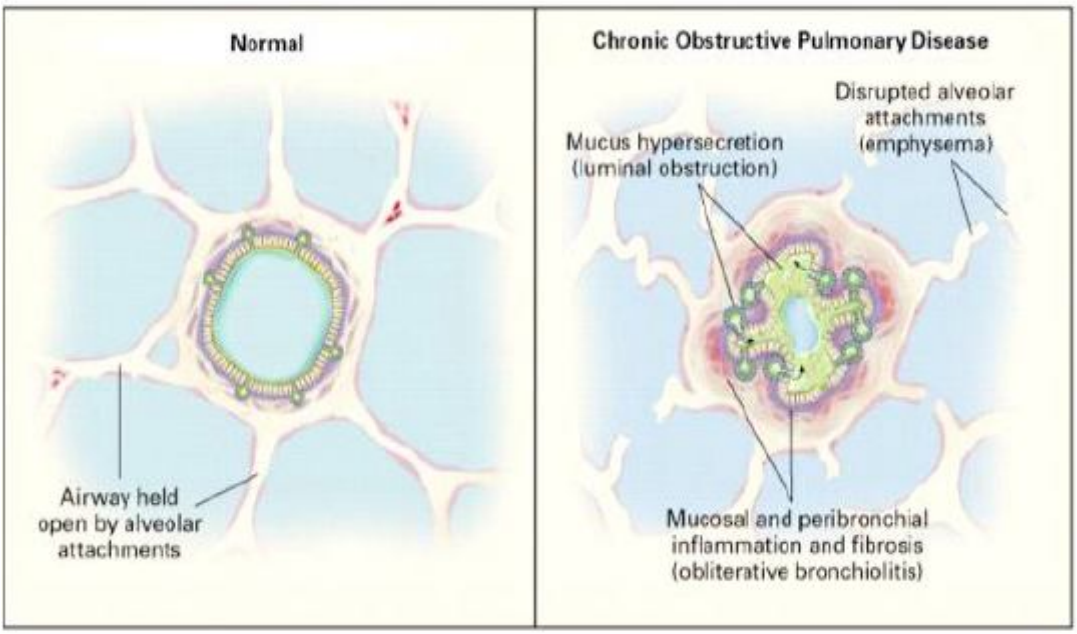


Figure 4: Destruction du mur alvéolaire, perte d'élasticité, les petites voies aériennes ne sont plus attachées, fibrose pulmonaire, destruction du lit capillaire et réduction du diamètre des voies respiratoires (bronchiolite oblitérant) **[Barnes, 2004].**

I-7. Diagnostic :

I-7-1. Spirométrie:

Le diagnostic est basé principalement sur la spirométrie. Elle mesure la limitation du débit d'air et il est nécessaire pour confirmer un diagnostic de la BPCO.

La spirométrie post bronchodilatatrice confirme la composante partiellement réversible de l'obstruction des voies aériennes chez les patients atteints de BPCO.

D'une manière générale, les résultats d'obstruction sur les tests de fonction pulmonaire sont en corrélation faible avec l'ampleur anatomique de l'emphysème, avec des valeurs de résultats de 0,4 à 0,7et l'emphysème peut impliquer 30 % du parenchyme pulmonaire sans la présence d'obstruction d'écoulement d'air [**Muller ,1991]** [**Pratt ,1987].**

I-7-2. Radiographie thoracique:

La radiographie thoracique peut être utile dans le diagnostic différentiel et doit être obtenue sur tous les patients [**GOLD, 2007].**

Il est nécessaire pour exclure d'autre maladies et d'établir la présence des comorbidités importantes telles que l'insuffisance cardiaque [**GOLD, 2007].**
L'emphysème sévère peut être clairement diagnostiqué à partir des radiographies, l'emphysème léger n'est pas aussi évidant des radiographies, et l'emphysème modéré est diagnostiqué à partir des rayons X de la poitrine seule environ 50 % du temps **[Celli ,1995].**

I-8. Traitement :

La prise en charge des patients BPCO devrait comprendre 4 volets : l'évaluation et le suivi de la maladie, la diminution des facteurs de risque, la stabilisation de la BPCO et la gestion des exacerbations.
L'accompagnement de patients vers l'arrêt de tabagisme est l'action la plus importante car la mieux à même d'influencer l'histoire naturel de la maladie **[Institut de veille Sanitaire ,2006].**
Les bronchodilatateurs sont le pilier du traitement des symptômes de la broncho-pneumopathie chronique obstructive. Ils peuvent être administrés à la demande ou sur une base régulière **[GOLD ,2005].** Parmi les substances Actives possibles, les β2-mimétiques, les anticholinergiques et la théophylline sont les médicaments de choix, seuls ou en combinaison. Des corticostéroïdes inhalés peuvent être ajoutés au traitement chez les patients symptomatiques dont l'atteinte fonctionnelle est sévère (Volume Expiratoire Maximal par Seconde < 50%) et qui subissent des exacerbations répétées (telles que 3 sur les 3 dernières années).Par contre, les corticostéroïdes devraient être évités par voie systémique lors d'un traitement chronique au vu de l'importance de leurs effets négatifs **[GOLD ,2005].**
Une oxygénothérapie peut s'avérer nécessaire a un stade évolue de même qu'une assistance ventilatoire **[Institut de veille Sanitaire, 2006].**

I.II : La physiopathologie de la BPCO

II: La physiopathologie de la BPCO

II.1.Définition :

Actuellement, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est définit comme une affection respiratoire caractérisée par une inflammation chronique responsable de nombreux changements physiopathologiques au niveau des voies aériennes.

D'une façon générale, l'inflammation observée dans les poumons de la BPCO résulte de l'inhalation de particules et de gaz délétères. La fumée de tabac a la capacité d'induire cette inflammation et d'entrainer par elle-même des dommages directs dans les bronches et le parenchyme pulmonaire. Il est très probable que d'autres facteurs de risque pour la BPCO soient en mesure d'initier un processus d'inflammation similaire **[Daheshia ,2005].**

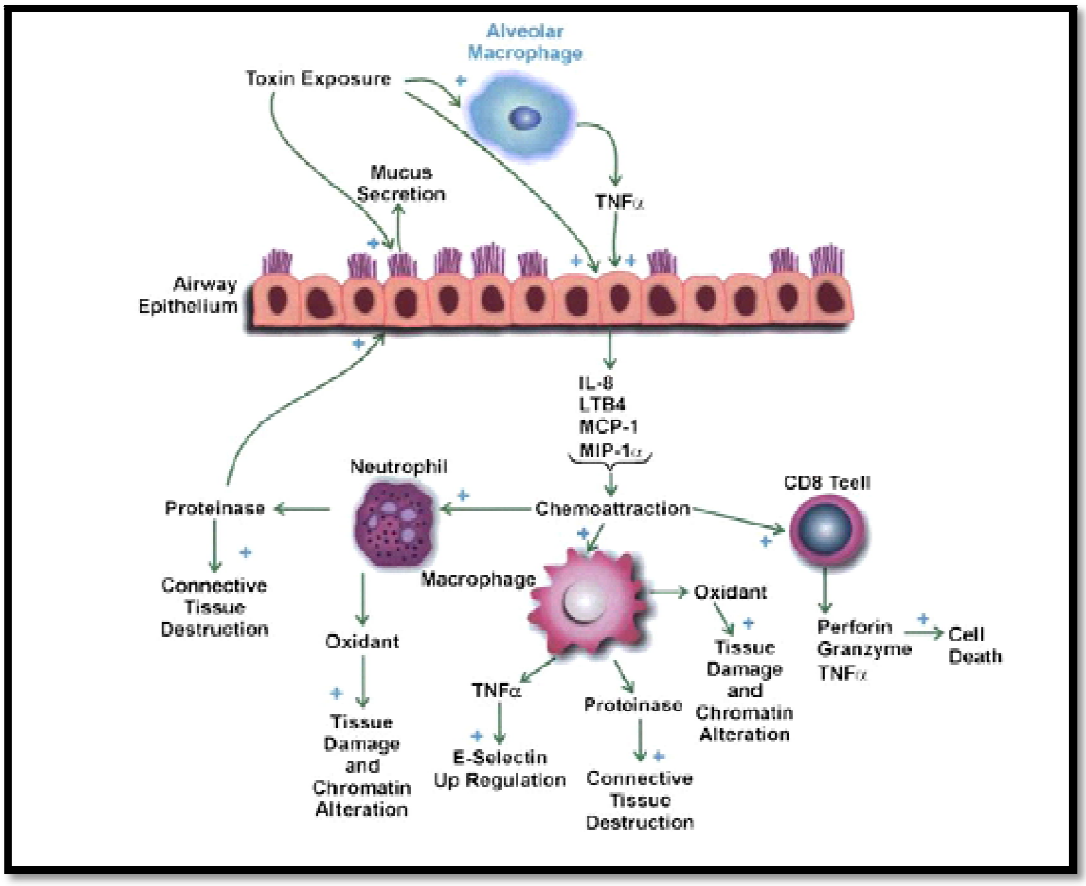


Figure 5 : Les évènements moléculaires et cellulaires immuno-pathologique de la BPCO **[Djelili, 2013].**

II.2.Les cellules inflammatoires :

L'inflammation des voies aériennes est constante au cours de la BPCO et touche les voies aériennes proximales (VAP) et les voies aériennes distale(VAD) **[Hogg et Timens, 2009].**

Le pourcentage de bronchioles contenant des polynucléaires neutrophiles, des macrophages, des lymphocytes TCD4 et CD8, des lymphocytes B, ainsi que des follicules lymphoïdes (témoignant d'une profération lymphocytaire in situ) augmente avec la sévérité de l'obstruction bronchique **[Hogg et *al,* 2004].**

II.2.1.Les cellules myéloïdes:

II.2.1.1.Macrophages:

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la BPCO. Ils sont activés par la fumée de cigarette. Leur nombre est multiplié par 5à10 dans les bronches, le parenchyme pulmonaire, le lavage Broncho- alvéolaire (LBA) et les expectorations induites. Le nombre des macrophages alvéolaires est corrélé à la sévérité de la BPCO **[Barnes et *al,* 2003]**.

Ils sont localisés en particulier au niveau des lésions emphysémateuses. Cette cellule joue un rôle de plaque tournante dans la BPCO **[Barnes et *al* ,2003].** Les corticostéroïdes sont inefficaces sur les macrophages de sujets BPCO, du fait d'une diminution de l'activité histone déacétylase. La baisse de cette activité enzymatique corrèle avec l'augmentation du TNF-α, de l'interleukine 8 et de la diminution de la réponse aux corticostéroïdes **[Barnes et *al* ,2003].**

La fonction phagocytaire des macrophages est significativement réduite par la fumée de cigarette **[Kirkham et *al* ,2004].** En outre les changements phénotypiques des macrophages alvéolaires humains stimulés par la fumée de cigarette modifient les protéines de matrice qui régule vers le bas considérablement leur capacité de phagocyter les neutrophiles apoptotiques **[Kirkham et *al* ,2004].**

II.2.1.2. Les polynucléaires neutrophiles :

Les polynucléaires neutrophiles dans le cadre de la BPCO sont en nombre accru. Ils sont activés dans les expectorations et le lavage Broncho-alvéolaire (LBA) **[Barnes et *al,***

2003]. Une faible augmentation de ces cellules est constaté dans le parenchyme et la paroi bronchique. Ils fabriquent des enzymes protéolytiques, neutrophile élastase, cathepsine, métallo-protéase : MMP8, MMP9 et des radicaux libres de l'oxygène **[Barnes et *al*, 2003].**

Ils sont recrutés et activés par des facteurs tel que le GM-CSF, le GCSF, l'interleukine 8, le leucotriène B4, CXCL8, CXCL1 , CXCL5 agissent sur les polynucléaires neutrophiles et les monocytes grâce au récepteur CXCR2 **[Barnes et *al*, 2003].**

Les récepteurs FC qui sont impliqués dans la phagocytose par l'interaction avec le complément sont supprimés par la fumée de cigarette **[Mehta et *al* ,2008]**.

Les Produits de neutrophiles induisent une hypersécrétion de mucus, à la fois par un effet de secretagogue aigue et par une augmentation de l'appareil de production de mucus bronchique **[Nadel ,1991].**

L'exposition aux médiateurs de l'inflammation pourrait affecter la structure et la contractilité du muscle lisse bronchique, contribuant à l'obstruction des voies aériennes périphériques. Une forte corrélation entre le dysfonctionnement des voies aériennes périphériques dans la BPCO et le nombre de Polynucléaire (PN) Neutrophile dans les expectorations **[O'Donnell et *al*, 2004]**.

II.2.1.3.Autres :

II.2.1.3.1.Eosinophiles et mastocytes:

Bien que les éosinophiles et les mastocytes sont des cellules effectrices importantes dans L'asthme, Ils n'ont pas ce pivot dans BPCO, Dans l'exacerbation de la BPCO l'éosinophilie de la paroi des voies aériennes a été observée à un niveau similaire à celui trouvé dans l'asthme avec une augmentation associée de l'expression de RANTES par et les cellules épithéliales des voies respiratoires **[Zhu et *al*, 2001]**.

Au cours de la BPCO stable, une augmentation du nombre de polynucléaires éosinophiles a été observée dans les expectorations **[Shironjit et *al*, 2006].** Le liquide LBA**,** et dans la paroi des voies respiratoires, augmentation des niveaux de protéine éosinophile cationique (ECP) dans Liquide LBA **[KLUCHOVÁ et *al* 2007] et [Panzner et *al*, 2003] et [Pesci et *al*, 1998].**

II.2.1.3.2.Les cellules épithéliales:

Les cellules épithéliales alvéolaires peuvent être une source importante de médiateurs de l'inflammation et des protéases dans la BPCO. Ces cellules sont activées par la fumée de cigarette produisent des médiateurs inflammatoires, à l'exemple de : TNF-α, IL-1ß, GM-CSF et IL-8 **[Floreani et *al*, 2003].**

Les cellules épithéliales dans les petites voies respiratoires peuvent être une source importante de TGFß, ce qui favorise alors une fibrose locale **[Takizawa et *al*, 2001].** Le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) semble être nécessaire pour maintenir la suivie des cellules alvéolaires. Le blocage des récepteurs du VEGF (de VEGFR2) chez les rats induit l'apoptose des cellules alvéolaires et l'emphysème comme pathologie. Dont les mécanismes restent obscurs **[Kasahara et *al*, 2000].**

Les cellules épithéliales des voies respiratoires sont également importantes dans la défense des voies respiratoires. Glaire produite à partir les cellules caliciformes piège les bactéries et les particules inhalées **[Adler et Li, 2001],** ils sécrètent les défensives et d'autre peptides cationiques avec des effets antimicrobiens et font partie du système de défense innée, mais sont également impliqués dans les processus de réparation des tissus **[Aarbiou et *al*, 2002].**

II.2.2.Les cellules lymphoïdes :

II.2.2.1.Les cellules lymphocytaires Th1 (CD4), TH17 et T reg :

Antigènes dérivés de la fumée cigarettes et les agents bactériens ou viraux, les produits de dégradation de la matrice extracellulaire, et peut être auto-antigènes de tissus pulmonaires peuvent stimuler les réponses immunitaires adaptatives dans les poumons des patients atteint de BPCO avec la participation des cellules cytotoxiques les cellules TCD8+, T helper 1 et TH17 et de la réponse des cellules B par la production d'anticorps **[Nikoletta et *al* ,2013].**Le nombre de cellules TCD8+ pulmonaires augmente substantiellement avec les hauts stades de limitation du débit aérienne et l'emphysème **[Nikoletta et *al* ,2013].** Le nombre des cellules CD4+ sont élevés dans les voies respiratoires et les poumons des fumeurs atteints de BPCO. Deux types de cellules CD4 accumulent dans les poumons des patients atteints de BPCO stables les cellules TH1et TH17 **[Nikoletta et *al* ,2013].**

Les patients de BPCO ont une augmentation du taux d'IL-23 et IL-17 dans l'épithélium bronchique .Au contraire, les fumeurs souffrant de BPCO ont beaucoup moins de cellules T régulatrices (Treg) dans les poumons et faible niveaux d'IL10 **[Nikoletta et *al* ,2013].**

II.3.le Monoxyde d'azote dans la BPCO :

II.3.1.le Monoxyde d'azote(NO) :

Le monoxyde d'azote (NO) est l'une des plus petites molécules biologiquement actives **[Strober et *al.* ,2002].** C'est un radical libre qui peut traverser la membrane cellulaire et agir

comme un messager biologique intracellulaire et extracellulaire. Il intervient dans de nombreux processus physiologique tel que : la défense de l'hôte et la communication neuronal **[McCarthy et *al* ,2008].**

II.3.2.Biosynthèse du monoxyde d'azote :

Le NO est un radical libre synthétisé à partir d'un acide aminé la L-Arginine (L-Arg), et d'oxygène moléculaire par une famille d'enzymes appelées les NO synthase (NOS) **[Schroeder et Kuo, 1995].**

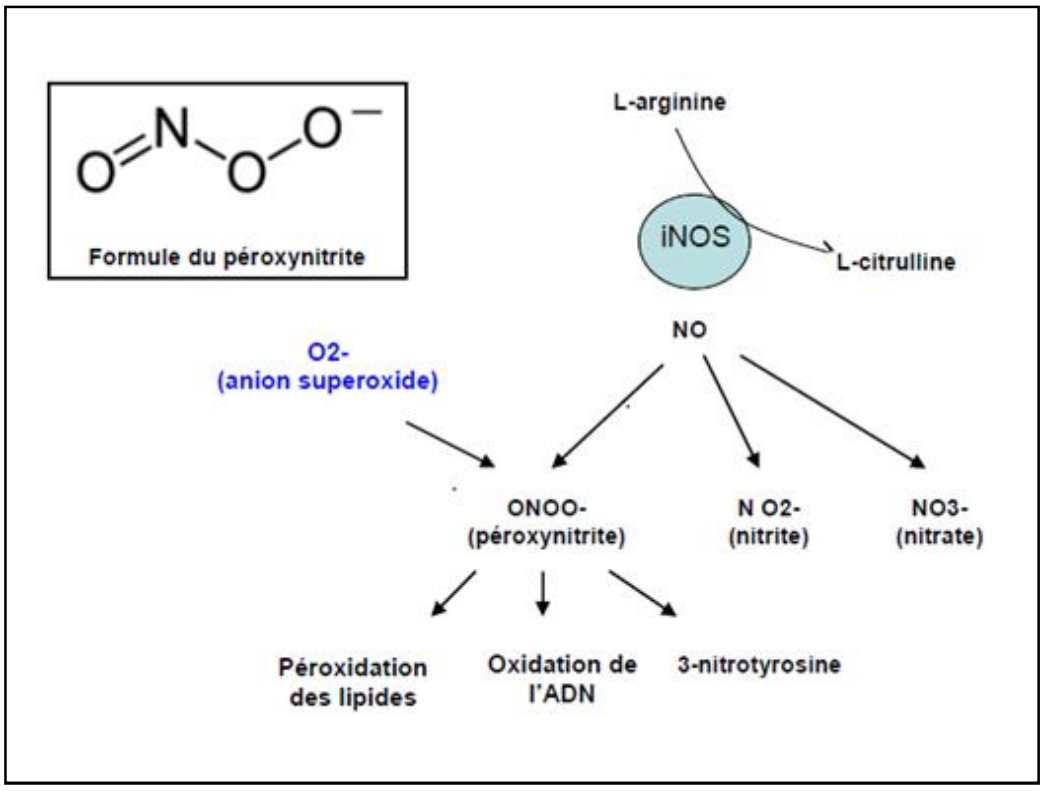


Figure 6 : Nitric oxide (NO) et ces dérivés. INOS : NO Synthase Inductible **[Boyer, 2011]**

La NOS activé est un tétramère formé par deux protéines NOS et deux molécules de calmoduline .Elle convertit la L-Arginine en NO et en L-citrulline en présence du NADPH et de l'oxygène (O_2) et les cofacteurs suivants : BH4, FAD, FMN et l'hème**.** La demi-vie du NO est très courte **[Palmer et *al*. ,1987].**Cependant, après oxydation il y a formation de composés plus stables qui sont les nitrites (NO_2^-) et les nitrates (NO_3^-) [**Cross et Wilson, 2003].**

II.3.3.Les NO Synthases :

NO Synthases (NOS) on un poids moléculaire d'environ 130-160 KDa. Actuellement, au moins trois isoformes distinctes de NOS ont été isolés et clonés : eNOS (endothéliale, NOS I), iNOS (NOS inductible, NOS II) et n NOS (NOS neuronale, NOS III) **[Fugen ,2004].**

-Ces trois isoformes codées par trois gènes distincts et situés sur trois chromosomes différents se distinguent entre elle par leur fonction, leur localisation cellulaire, leurs caractéristiques biochimiques et par la quantité de NO synthétisée ainsi que la durée de sa production par les cellules spécialisées.

Ces 3 isoformes peuvent être exprimées soit de manière constitutive ou de manière inductible [**Kolios et *al,* 2004].**

- **La NOS1 (neuronal) et la NOS3 (endothélial) :** elles sont de synthèse constitutive et elles sont Ca^{+2} et calmoduline dépendantes [**Kronck et *al* ,1998].**
- **La NOS2 (iNOS) :** de synthèse inductible Ca^{+2} et calmoduline indépendant, le NO est produit en concentration micro molaire [**Kronck et *al* . ,1998].** L'exposition à des produits microbiens comme le LPS ou à des cytokines pro-inflammatoire comme l'IFN-γ, le TNF-α, le TNF-a et l'IL-1β induit l'expression des gènes de l'iNOS **[Fazio, Let *al,* 2014].**

II.3.4 Participation des radicaux libres de l'oxygène (ROS) au développement de l'emphysème :

L'excès d'oxydants est une des caractéristiques du poumon emphysémateux. Le taux d'H_2O_2 dans l'air exhalé est plus élevé chez les sujets fumeurs et les sujets BPCO par rapport aux sujets non fumeurs **[Dekhuijzen, 2004].** Alors que les produits de la peroxydation lipidique, marquant la présence d'espèces réactives de l'oxygène, sont détectés à des taux élevés dans le condensat de l'air exhalé et le tissu pulmonaire des fumeurs atteints de BPCO par rapport à ceux des fumeurs indemnes d'emphysème et des non-fumeurs **[Rahman ,2002].** De même, la 8-Hydroxy-2- deoxyguanosine (8-OH-dG), qui est produite par les dommages oxydatifs de l'ADN induits par les radicaux libres de l'oxygène est augmentée dans le poumon périphérique des patients emphysémateux **[Deslee et *al,* 2009].** La relation de cause à effet entre la production de radicaux libres de l'oxygène et la survenue d'un emphysème pulmonaire est évidente dans des modèles animaux. Le traitement par des chélateurs des

oxydants tels la N-acétyl-cystéine ou la thioredoxine protègent les animaux contre l'emphysème induit par l'élastase **[Rubio et *al* ,2004] / [Kinoshita et *al*, 2007].**

I.III : Modèle murin de BPCO

III .Modèle murin BPCO

Il existe peu de modèles animaux de la BPCO secondaires à l'exposition à des particules de la pollution, des poussières et des fumées issues des carburants de biomasse. La plus grande partie des modèles utilise l'exposition à la fumée de cigarette ou d'autres approches (administration d'élastase, par exemple), et des animaux modifiés génétiquement **[Dagouassat et Boczkowski, 2012].**

La première question à se poser dans ce contexte, c'est la constitution du modèle le plus proche de la BPCO humaine Qui est elle-même composée d'au moins quatre lésions anatomiques :

-l'emphysème pulmonaire

-remodelage des voies aériennes de petite taille (y compris la métaplasie des cellules caliciformes)

-la bronchite chronique

-l'hypertension artérielle pulmonaire.

III.1. Les conditions pour avoir un bon modèle de BPCO :

Un bon modèle animal de BPCO devrait présenter des similitudes: avec L'anatomie pulmonaire de l'homme, la pathologie étant étroitement liée à l'anatomie du poumon et avec les mécanismes physiopathologiques de la BPCO humaine **[Dagouassat et Boczkowski, 2012]**

III.2. Espèce, âge et sexe de modèle BPCO :

Les espèces, l'âge et le sexe des animaux utilisés sont tous des considérations critiques.

De nombreuses études ont utilisé des cobayes, des rats et des souris comme mammifères modèles pour l'induction de la BPCO expérimentale induite par CS (cigarette smoke) **[Dagouassat et Boczkowski, 2012].**

Une limitation de l'utilisation des rongeurs dans la modélisation de la BPCO est qu'il ya beaucoup moins de branches des voies aériennes dans leurs poumons par rapport aux humains.

Les études d'exposition au CS chez les rongeurs ont montré des similitudes importantes dans les réponses immunitaires et le développement de la pathologie à celles observées chez les

patients atteints de BPCO. Ainsi, les modèles animaux de cette pathologie expérimentale sont très prometteurs pour l'utilisation dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

-Les rats :

Peu d'études ont utilisé le rat comme modèle pour l'induction de la BPCO induite par le tabagisme .Plusieurs groupes ont démontré l'induction de l'inflammation suivie de l'emphysème **[Kratzer et *al.* ,2013].** Dans certains cas, l'emphysème a été observé après seulement 2 mois d'exposition à la CS, ce qui représente une période de temps significativement plus courte que ce qui est couramment nécessaire dans les études sur cobaye et souris **[Kratzer et *al.* ,2013].**

-Les souris:

Le sexe peut jouer un rôle dans le développement de la maladie, car les souris femelles semblaient développer des pathologies de BPCO à un rythme plus rapide que les souris mâles lorsqu'elles étaient exposées à des doses identiques de CS **[March et *al.* ,2006].**

III.3.les majeures approches d'induction des signes de BPCO expérimentales (emphysème):

Différents modèles animaux ont été et sont utilisés pour examiner la physiopathologie de la BPCO chez l'homme. Aucun de ces modèles ne reproduit toutes les caractéristiques de la maladie. Ceci étant dit, le modèle d'exposition à la fumée de cigarette semble le plus proche de la pathologie humaine **[Boczkowski ,2012].**

Le modèle d'administration pulmonaire d'élastase garde sa place, spécialement quand il est difficile de développer le modèle d'exposition à la fumée de cigarette. Les modèles transgéniques sont potentiellement utiles, mais les résultats obtenus lors de leur utilisation doivent être interprétés avec précaution **[Boczkowski ,2012].**

Ainsi que notre modèle d'étude d'emphysème par d'injection intrapéritoniales de l'extrait de tabac (CSE), a été déjà proposé par **ZHANG et *al* en2013** ont démontre que le CSE mène au développent rapide de l'emphysème de même façon que l'exposition à la fumée de cigarette**.** Ils induisent l'emphysème et des lésions au niveau de muscle squelettique et cardiaque par l'injection intra-péritonéale de CSE **[Zhang et *al* ,2013].**

D'autre étude sont déjà utilisé ce modèle expérimental de BPCO à l'exemple de **He et *al* en 2015.**

Ils ont réalisé une comparaison entre l'induction de l'emphysème par la fumé de cigarette et l'injection de l'extrait de tabac pour évaluer le meilleur modèle qui reproduit l'ensemble des échangent histologiques et inflammatoire de l'emphysème **[He et al, 2015].**

Les résultats obtenu ont démontré une ressemblance des ces données quoique avec le modèle d'induction d'emphysème par injection intrapéritoniale du CSE on obtient de bon résultats dans une courte période et avec des moyens plus simple. Ainsi que **Lamb et *al* en 2012,** ils ont utilisé ce modèle pour étudier, en plus de l'emphysème, les mécanismes inflammatoire de la BPCO **[Lamb et *al*, 2012].**

Partie II : Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes

Etablir un model murin d'emphysème au cours de la BPCO par l'injection intra péritonéale de l'extrait de tabac :

I.1.Matériels :

I.1. 1. Les matériels non biologiques :(voir l'annexe 1)

Les matériels non biologiques sont des appareils existent dans laboratoire comme des grandes appareils par exemple : spectrophotomètre, aussi les réactives comme griess A et B, les colorants de l'étude histologique (Hématoxyline et Eosine), et les verreries comme bécher et entonnoir.

I-1.2. Les matériels biologiques

I-1.2-1. Les animaux :

Cette étude a été réalisée sur 20 souris BALB/c mâles et adultes âgés (8 semaines), Pesant entre 30-58 g.

Avant le début de la période expérimentale, un temps d'acclimatation d'une semaine au niveau de l'animalerie.

Les souris ont eu un accès libres à l'aliment et à l'eau sous des conditions de températures ambiantes (22 **C**°) et d'humidité (55%) avec un cycle répété de 12h d'obscurité /lumière régulier tout au long de l'étude.

I-1.2-2. Le concentré du tabac :

Nous avons utilisé une boite de cigarette (Marlboro Red)® dont la composition basale conne Est constitué de : 10mg de Goudron par boite, 0.8mg de nicotine/boite ,10mg de CO/boites, Erg(Ergostérol) :15.99 ng/mg, LPS : 10.77p mol/mg.

I-1.2-3. Le plasma :

Le plasma a été récupéré à partir du sang prélevé par décapitation immédiate des souris à l'aide d'un ciseau stérile. Le sang est mis dans des tubes avec EDTA. Après centrifugation du sang pendant 10 minutes à 10 000rpm, le plasma a été récupéré et conservé à -20°C pour des dosages des nitrites résiduels.

I-1.2-4. Récupération des organes :

Après sacrifié les souris par décapitation immédiate dans le jours 29 les organes poumons et la rates ont été récupérés

-Récupération de la rate :

La rate a été délicatement récupérée puis sa longueur et son poids ont été mesurés.

-Récupération de poumons :

Les poumons ont été délicatement récupérées puis sa longueur et son poids ont été mesurés puis elles ont été nettoyés et fixés au formol à 4% pendant 24h Pour l'étude histologique.

I-2. Méthodes :

I-2.1 Préparation de l'extrait de tabac (PBS-CS) :

I-2.1-1 .Préparation de solution Phosphate-Buffered Saline (PBS)

La solution PBS (en français Tampon Phosphate Saline) est une solution tampon qui maintient approximativement le même PH malgré l'addition de petites quantités d'une Acide ou d'une base, ou malgré une dilution.

Pour préparé la solution PBS à PH entre (7,2-7,4) besoin les produits suivant : Kcl, Nacl, Na_2Po4, KH_2PO4 **(Voir l'annexe 2).**

I-2.1-2 Préparation l'extrait de tabac :

Selon **He et *al*, 2015**, La préparation de l'extrait de tabac s'effectue par le concassement d'une seule cigarette brulé et sa perfusion dans de PBS. Par la suite, la solution obtenue CSE (cigarette smoke extract) est connectée à une pompe à vide sous une pression constante de -0,1 Kpa (-1mbar) puis verser dans un entonnoir mené d'un papier filtre en standard (0.22µm) pour filtration et stérilisation.

La concentration de l'extrait de tabac est déterminée selon la formule suivante (concentration de solution **C=** masse **m /** le volume de solution **v)**. La solution a été préparée fraîche pour chaque utilisation.

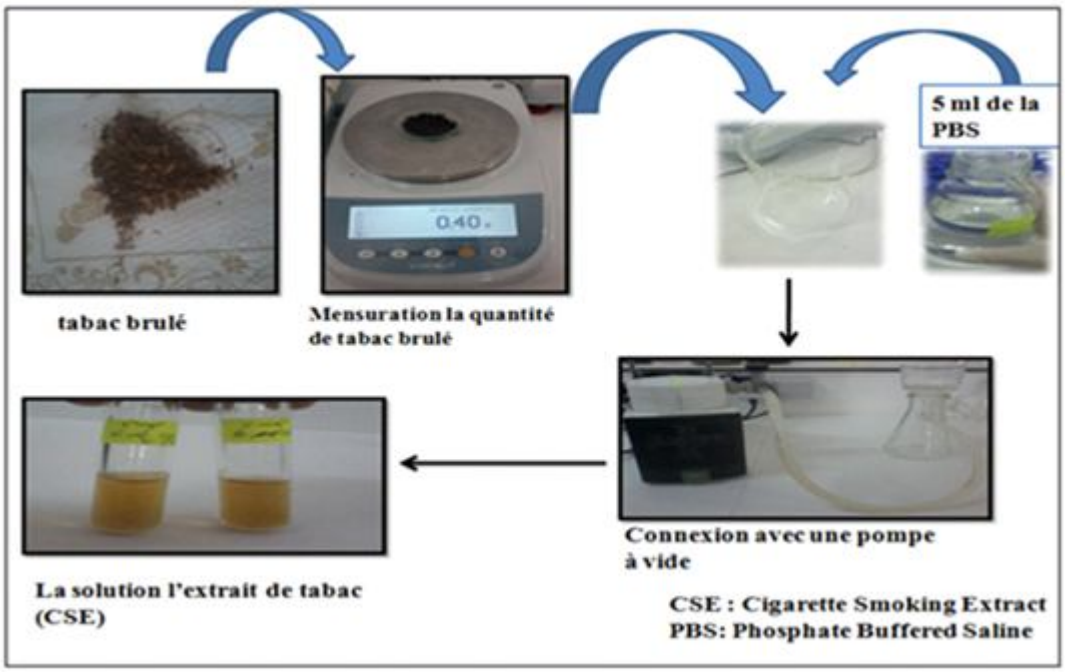


Figure 07 : Protocol de préparation de l'extrait de tabac

I.3.Induction de l'emphysème: chez des souris BALB/C

La composante emphysémateuse de la BPCO expérimentale a été induite chez 20 souris males de type BALB/c. Les souris sont subdivisées en 2 groupes

-groupes témoins : les souris traitées par le PBS (n=10)

- groupes traités : les souris traitée par le PBS-CS (n=10)

L'induction se fait par l'administration intra péritonéales du 0.3ml/ 20g de solution PBS-CS pendant un mois. Selon le calendrier suivi par **HE et *al* ,2015.**

Les souris ont été surveillées quotidiennement pendant toute la durée expérimentale (1mois) **(Voir l'annexe 3).**

I.4. Dosage de monoxyde d'azote (NO) :

L'évaluation des nitrites résiduels issus de plasma à été réalisé par la méthode de Griess modifié **[Touil, 1998].**

I.4.1. Principe de méthode Griess :

La méthode Griess est recommandée pour la quantification des nitrates et des nitrites car elle est plus facile, plus rapide, moins coûteuse et plus sensible que les autres méthodes, la

méthode griess permet le dosage du NO par la quantification des nitrites résiduels, qui sont des métabolites physiologiques stables du NO .les concentration sont quantifiés par un dosage colorimétrique à une longueur d'onde λ=543 nm

La concentration des nitrites sont déterminées par extrapolation de la valeur de DO obtenue sur le courbe étalon **DO=f ([NaNO2]) (Annexe 4).**

I.4.2. Mode opératoire :

À 50 µL de sérum dans l'eppendorf opaque (pour évité la photosensible) sont ajoutés 25 µL de griess B puis 25 µL de griess A **(Voir l'annexe 5)**. Le volume final est complété à 500 µL par 400 µL de l'eau distillée. Après une incubation de 20min à l'obscurité, et mélangé la solution à l'aide de vortex pendant une minute, la lecture de la Densité optique (DO) est réalisée à l'aide de spectrophotomètre (λ=543nm).

I.5. Etude macroscopique et histologie des organes :

I.5.1 Etude macroscopique :

Après avoir récupéré les organes (la Rate et les poumons), nous avons réalisé une étude Macroscopique à l'œil nue afin de déterminer les caractéristiques morphologiques et physique à savoir : le poids, la taille, la couleur.

I.5.2 .Etude histologique :

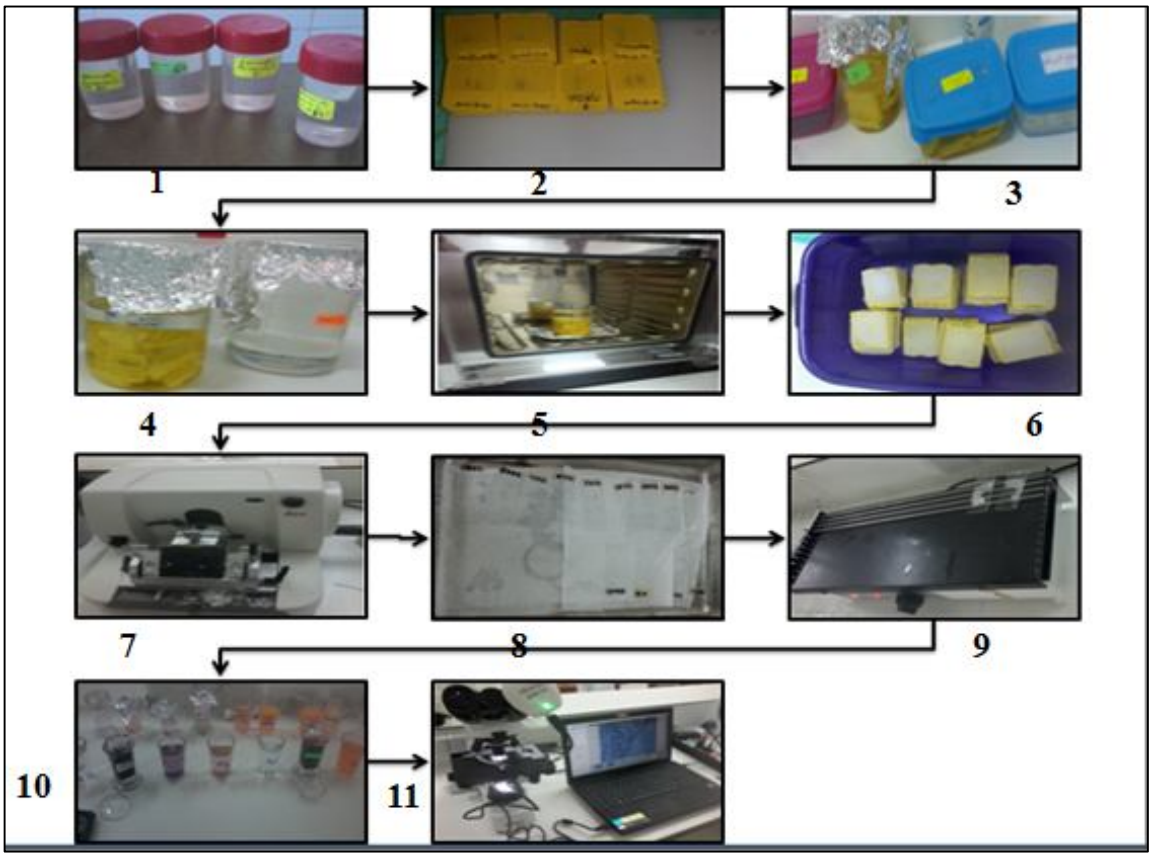


Figure 08 : protocole expérimental pour la réalisation des coupes histologiques au niveau de poumons.

I.5.2.1.Mode opératoire :

1. Fixation des poumons dans le formol de 4 % pendant 2J pour évité l'activité enzymatique et pour conservé l'organe à longue duré.
2. Insertion dans les casettes et preparation des blocks.
3. Déshydratation par des bains d'alcool à une concentration croissante de 70 % à 100 % pendant 30min pour éliminer le reste de l'eau.
4. plonger les casettes dans deux bains de xylène pendant 20min pour chacun pour évité mélangé l'alcool avec le formol.
5. Inclusion des cassettes dans la paraffine pendant 2H à T°= 56°C pour préparation les bloques ainsi pour le durcissement et pour avoir les coupes sous microscope c'est-à-dire pour passage le luminaire pendant l'observation.

6. Préparation des blocks
7. Réalisation des coupes à 5 µm par le microtome.
8. Séchage des lames dans étuve à T°= 37°C.
9. L'étalement et séchage des lames.
10. Déparaffinage, réhydratation des coupes puis Coloration par l'hématoxyline et l'éosine de but de coloration est coloré le noyau en violet et le cytoplasme en rose let montages des lames
11. Observation microscopique**.**

I.6.Analyse statistique :

Nous avons utilisé aussi le logiciel **Graph PAD prism7®** pour la représentation des donnés numérique et graphique et aussi dans la réalisation de l'analyse statistique :

-calcul de moyenne
-Calcul de l'Ecartype
-Test de student
-ANOVA

Démarche expérimentale :

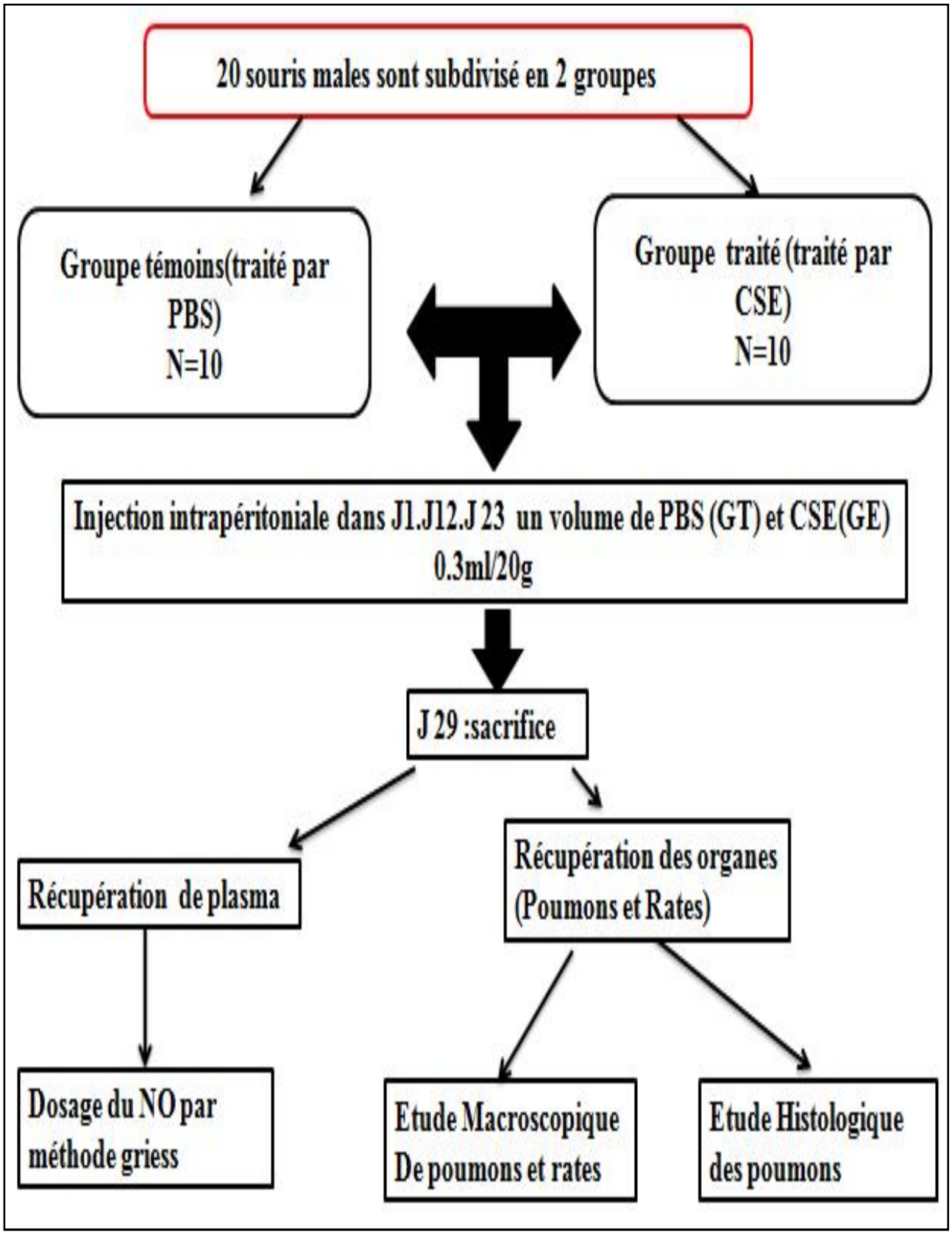


Figure 9 : La démarche expérimentale

Partie III : Résultats et Discussion

Partie III : Résultats et Discussion :

III-1- Evolution pondérale de différents groupes :

L'évolution pondérale des différents groupes expérimentaux en mesurant le poids de chaque souris dans J0 et dans J 29 de l'expérimentation.

Les résultats obtenus démontraient une chute pondérale importante chez les souris du groupe traités. Même observation a été notée chez les souris du groupe témoin mais de façon moins apparente. Sachant qu'au début de l'expérience les deux groupes présentaient les mêmes caractéristiques physiques.

	Groupe témoin (g)		Groupe d'etude (g)	
	Début	**fin**	**Début**	**fin**
Moyenne	**44.32±**	**31.25±**	**39.8±**	**19±**
ECARTYPE	**1.75**	**3.57**	**9.96**	**5.11**

Tableau 02 : L'évolution pondérale au cours de l'expérimentation

Les valeurs sont exprimés par les moyennes et l'écart types, les résultats obtenus ont étaient graphiquement représentés en figure (10)

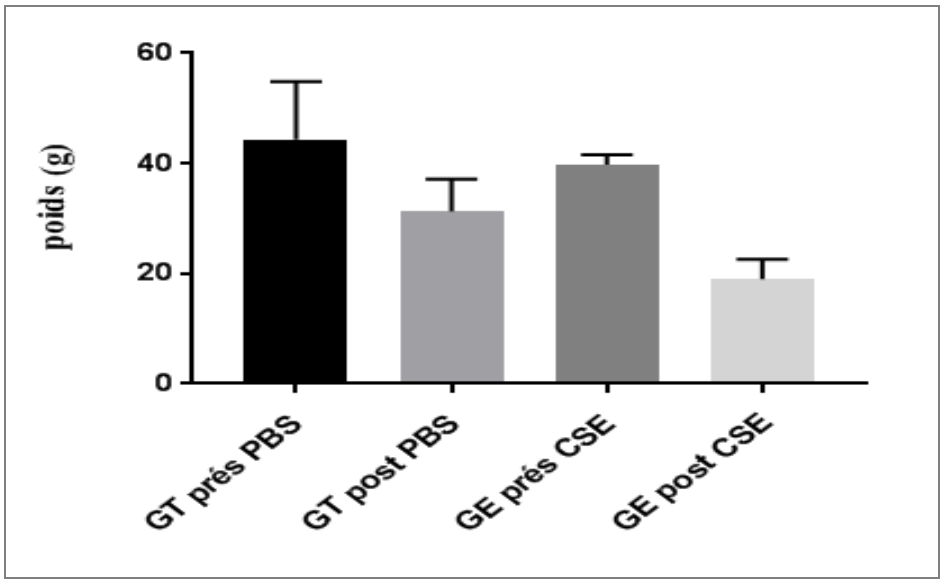


Figure010 : Evolution pondérale des différents groupes au début et à la fin de l'expérience ;

GT: groupe témoin, **GE** : groupe traité

L'analyse statistique a démontré que les deux groupes, étude et témoin, ne présentaient aucune différence significative au début de cette étude (P non significatif). Par contre, à la fin de l'expérimentation, nous avons observé une chute pondérale importante chez les souris du groupe d'étude avec un P <0.0001. Ceci suggère un effet important de l'extrait du tabac sur l'évolution pondérale des souris ce qui corrobore parfaitement avec les données de la littérature.

La perte de poids est l'une des caractéristiques de BPCO tel qu'indiquaient **Rodrigo de las Heras Kozma et *al* en 2014** dans leurs travaux. Ces derniers suggèrent que le fumé de tabac contribue à la perte de poids et le development de l'emphysème chez l'animal exposé **[Kozma et *al*, 2014]**. De même **Mineur et al** démontraient que la nicotine diminuait l'ingestion des aliments et donc une chute pondérale **[Mineur et *al*, 2011]**.

A l'inverse, le groupe contrôle traitait par une injection du PBS selon le même calendrier que le groupe d'étude, présentait une faible baisse pondérale. Cette perte du poids est expliqué probablement par une mauvaise adaptation de ces souris aux conditions environnementales principalement que la durée de l'expérimentation est relativement courte, pas plus de 29 jours.

III-2- Etude macroscopique

III-2-1 -L'aspect morphologique de la rate :

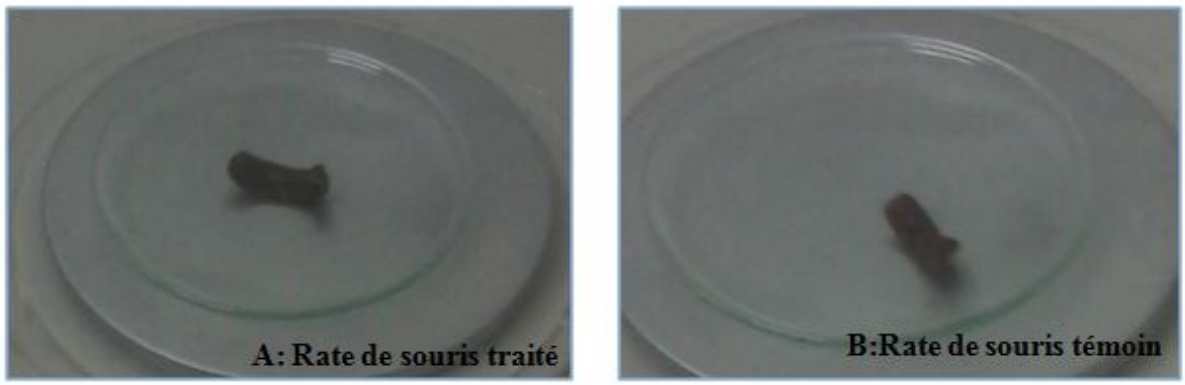


Figure 11 : Aspect morphologique de la rate chez les souris traité (A) souris témoin par CSE (B)

L'observation des rates des souris traitées par le cigarette smoke extract (CSE) après sacrifice nous a permis de constater des changements morphologiques par apport aux témoins :

Les rates de groupe contrôle ont une couleur marron et une taille normale de 1.5 cm en moyen, le poids varie de 0.069g à 0.111g, En revanche, les rates de groupe CSE ont une

couleur marron foncé, le poids de 0.140g à 0.227g et d'une taille de moyenne de 1.6 cm. Ce qui témoigne l'existence probablement une splénomégalie en raison d'une réaction inflammatoire causée par le concentré de tabac injecté.

	poids de la rate de groupe témoin(GT)	**poids de la rate de groupe traité (GE)**	**la taille de la rate (GT)**	**la taille de la rate (GE)**
MOYENNE	0.0824	0.176	1.5	1.6
ECARTYPE	0.017	0.085	0.07	0.72

Tableau 03 : mensuration des dimensions des rates de souris des deux groupes étudiés

III-3- Aspect morphologique des poumons :

L'analyse macroscopique des poumons des souris après sacrifice nous a permis de constater des changements morphologiques des poumons des souris traitées pas CSE par apport aux témoins :

Les poumons de souris de groupe témoin ont une couleur rosâtres claire, d'une taille normal entre 1cm à 1.3cm. Par contre, celle du groupe d'étude traité par l'extrait de tabac ont une couleur marron pale et une taille volumineuse entre 1.4cm à1.8cm, caractérisé par des taches blanches munie par des petites point noir.

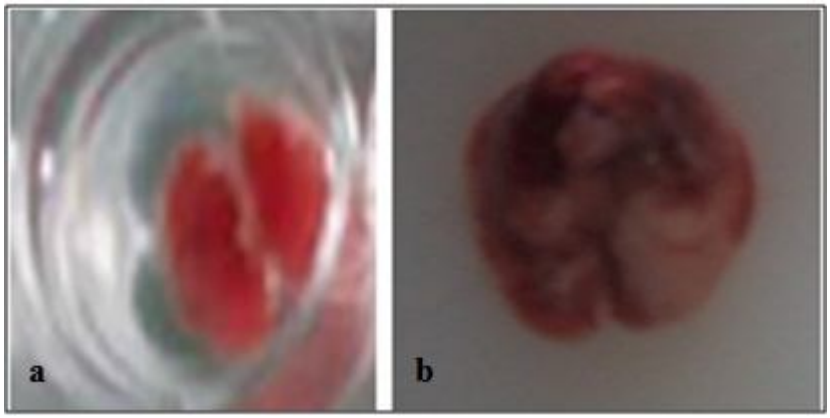
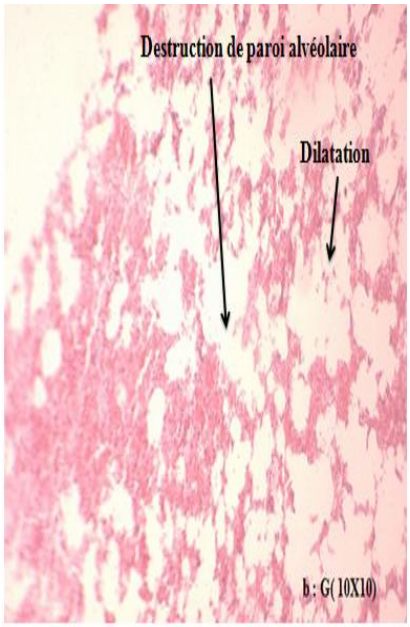
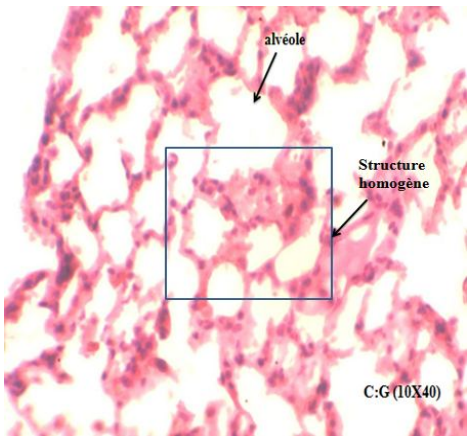
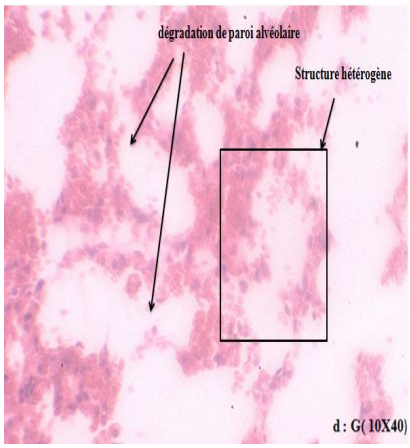


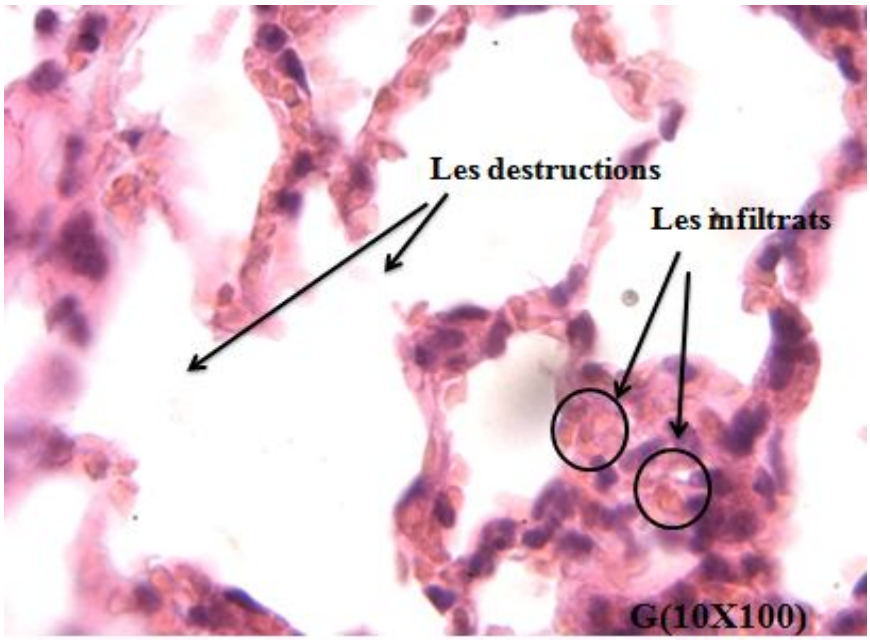
Figure 12 : Aspect morphologique de poumons chez les souris témoins(a) souris traité par CSE (b)

III-4- Analyse histologique des poumons :

Les coupes histologiques de différents fragments de poumons des souris témoins traitées par le PBS montrent une architecture tissulaire ou alvéolaire normale sans aucune altération **(figure13.a ,14.c),** les mêmes observations ont été notées par **Zhang et *al* en 2013.**

Par contre chez les souris traitée par le PBS-CS **(Figure13 .b, 14.d et Figure 15),** on a remarqué l'existence d'une grande distension des voies aériennes des alvéoles pulmonaires, destruction du parenchyme pulmonaire, la dégradation et désorganisation de paroi alvéolaire. Aussi, on note la présence d'une infiltration des cellules inflammatoires autour des bronchioles. Ces mêmes observations ont été soulevées par **He et *al* en 2015.**

Grossissement	Les coupes de groupe témoin	Les coupes de groupe traité
G 10x10		
	Figure 13 : Coupe Transversale au niveau de lobe droite supérieur de poumon de souris témoins et traités (coloration HE observées au microscope photonique à G (10 x10)	
G 40 x10		
	Figure 14: Coupe Transversale au niveau de lobe gauche supérieur de poumon de souris traité et témoins (coloration HE observées au microscope photonique à G (10×40).	

G10x100	
	Figure15: Coupe Transversale au niveau de lobe gauche supérieur de poumon de souris CSE (coloration HE observées au microscope photonique à G(10x100).

Dans l'ensemble, l'analyse histologique a démontrait que le traitement des souris BALB/c par l'extrait de tabac endommageait les parois alvéolaires, l'Epithélium de vaisseaux pulmonaires et les capillaires, ce qui favorise l'installation d'un emphysème pulmonaire qui reste clairement représentant dans notre cas. Ces premiers signes d'emphysème sont ressemblable, dans ses caractéristiques anatomiques et histologiques, à celui observé chez les patients atteint de BPCO. Ceci rejoint les observations déjà faites par **Zhang et *al* en 2013**
En outre, on a observé l'infiltration de cellules inflammatoires vers le tissu pulmonaire **(figure 15)**. Afin d'expliquer cette infiltration, **Zhang et *al*** ont réalisé des études in vitro. Ils affirment que le CSE induisait l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ce qui permis la migration des leucocytes à partir de circulation sanguine **[Zhing et *al*, 2013].**

L'infiltration des cellules inflammatoires au niveau des poumons a été souvent notée dans la littérature **(He et al ,2015 / Zhing et *al*, 2013).**

La présence des macrophages alvéolaires au niveau des espaces alvéolaires est souvent corrélée avec une réponse inflammatoire sévère. L'activation de ces cellules est induite par les

composants du tabac, à l'exemple du lipopolyscchacaride (LPS), qui stimule les voies de signalisation intracellulaires des cellules inflammatoire au niveau des poumons menant à l'activation du

facteur de transcription NF-kβ responsable de la transcription des gènes qui code pour les cytokines proinflammatoires tel que le TNF-α et les Chimiokines impliquées dans l'exacerbation et le recrutement des autre cellules au niveau pulmonaire. Parmi les cellules qu'on peut aussi observer les neutrophiles. Ces cellules jouent un rôle crucial dans la sécrétion des médiateurs proinflammatoires et des enzymes comme les protéases et les cathepsines. Tous ces éléments sont impliqués dans l'installation d'emphysème (Lee **et *al*) [Lee et *al*, 2012]**.

III-5 - DOSAGE DE MONOXYDE D'AZOTE :

III-5-1 Etude de la production du monoxyde d'azote ex vivo par la méthode de Griess modifié :

Le dosage des nitrites au niveau des plasmas des souris (groupe traités et le groupe témoins) a donné les résultats suivant :

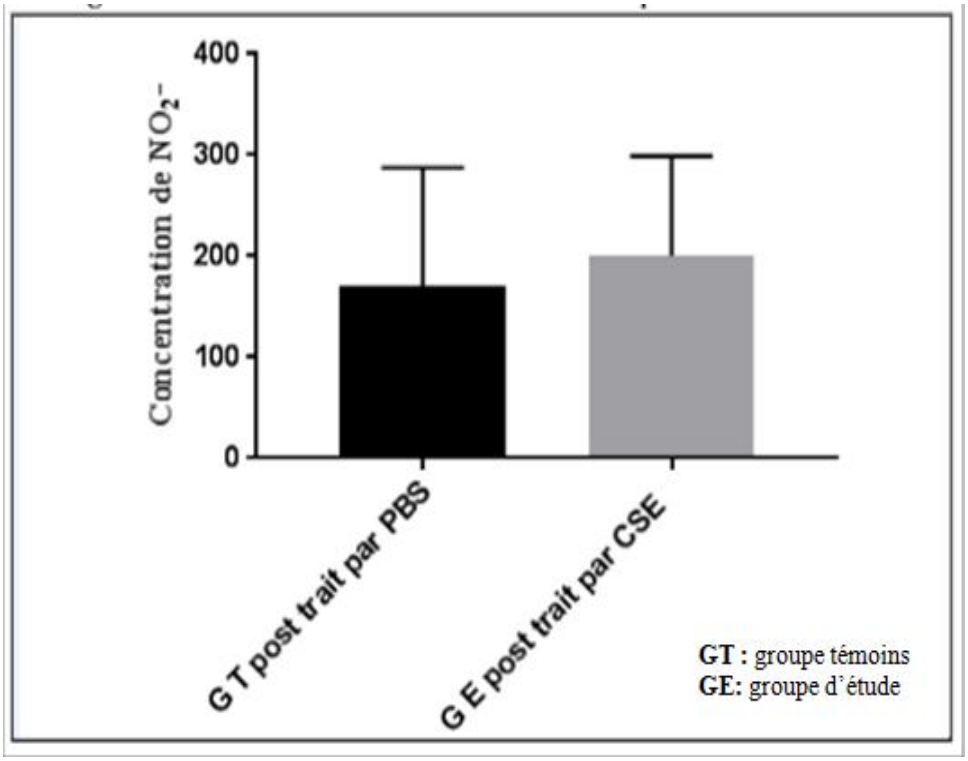


Figure 16 : la teneur plasmatique des Nitrites résiduels

La production de NO_2^- est plus élevé chez le groupe traité (CSE) (200.6±.25.86µM) par rapport au groupe contrôles (170.3±52.57µM). Les résultats obtenus révèlent une différence non significative entre les souris traitées par CSE et les témoins.

La production importante des NO_2^- chez les souris du groupe témoin s'oppose aux données de la littérature. Dans notre cas, le groupe témoin présentait des valeurs non homogènes traduites par un Ecartype élevée.

L'analyse profonde de ce groupe révèle une production maximales chez certains souris témoins (294.6±1.44µM), tandis que d'autre exprimées un niveau plus bas du NO_2^- au niveau plasmatique (87.5±15.9µM).

Nous avons donc subdivisé ce groupe en deux sous groupes :

Témoins type 1 avec une forte expression du NO2- et témoins 2 avec une faible expression du NO_2^- .

Les résultats obtenus sont représentaient graphiquement en figure 17.

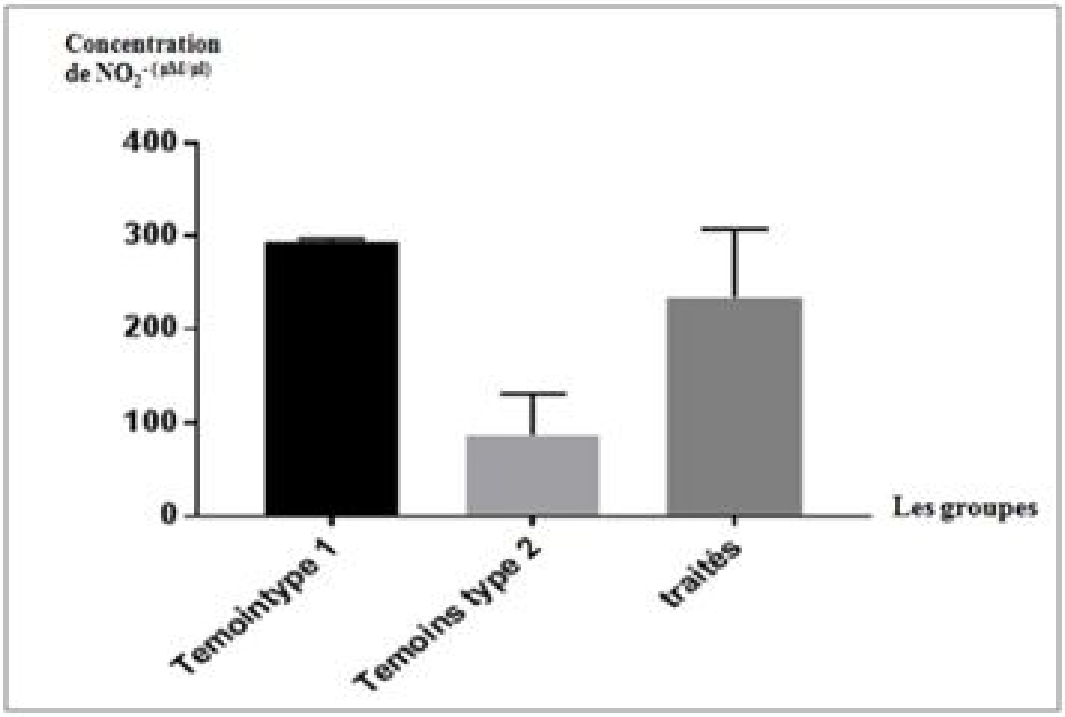


Figure17: classification des souris étudiées en fonction de la teneur plasmatique des nitrites résiduels **GT** : groupe témoins, **GE** : groupe d'etude.

Une différence significative entre la teneur du NO_2^- est observés entre les souris témoins de type2 (87.5±15.9µM) et les souris de groupe traité (234.6±36.34µM) avec un
P value =0.0402. Ceci confirme que l'induction de l'emphysème par le concentré du tabac est associée à une production importante du NO. Ce dernier étant produit par plusieurs types cellulaires, à savoirs les cellules immunitaires ainsi que les cellules épithéliales pulmonaires peuvent avoir un rôle pro-inflammatoire et vasodilatateur au niveau local.
Le taux élevé du $NO2^-$ observés chez les souris témoins du type 1 est de (294.6±1.44µM) est expliqué par l'effet que ces souris pourraient présenter des signes inflammatoires, même après sacrifice, avec un changement de comportement (manque de mouvement, fatigue, perte d'appétit).

Nos résultats obtenus indiquent que l'extrait de tabac induit une production accrue du NO à l'origine d'une inflammation pulmonaire comme il a été affirmé par **Rennard et *al*, 2004**
La fumée d'une cigarette contient plus de 45.000 produits chimiques, qui ont divers effets toxiques, mutagènes et cancérigènes. Ces données ont été soutenus aussi par les travaux de

Lee et *al* ,qui ajoutaient que les constituants de fumé de tabac (particulièrement ROS) activant les cascades de signalisation intracelleulaires de cellules épithéliales. qui mène à l'activation des gènes des molécules inflammatoires à l'exemple du IL-8 et TNF-α.
La sécretion de ces médiateurs inflammatoires conduisait au recrutement des cellules immunitaires et enfin une inflammations chronique **[Lee et *al* ,2012] .**
Cette augmentation d'expression du NO serait donc liée à NOSII inductible. Cette isoformes aurait alors un rôle clé dans l'activité des macrophages alvéolaire en produisant du NO en réponse à un stimulus par des particules de tabac lors de l'inflammation pulmonaire.

Nos résultats confirment que l'augmentation de monoxyde d'azote a été impliquée dans la réponse inflammatoire au cours de l'emphysème. Les travaux de **McMicking *et al*** ont montré que la NOSII est inductible dans les macrophages murins par les LPS et certaine cytokines comme l'IL1ß, IFNγ, TNFα. Cette activation génère la production de grandes quantités de NO **[McMicking *et al* ,1997]**
En revanche la diminution de taux du NO_2^- serait associée à une régulation négative de la NOSII par les particules de l'extrait de tabac qui activerait la voie TH2 productrice d'IL-10 et IL4. En plus, il a été montré par **Drapier et al** que les cytokines de la voie TH2 à savoir l'Il-4 possèdent un effet inhibiteur sur la NOS **[Drapier et *al*, 1997].**
Ceci renforce aussi le rôle du NO dans la physiopathologie de la BPCO sachant que ce dernier est de profil Th1.

III-6 -Analyse de l'association entre l'emphysème et la production de NO :

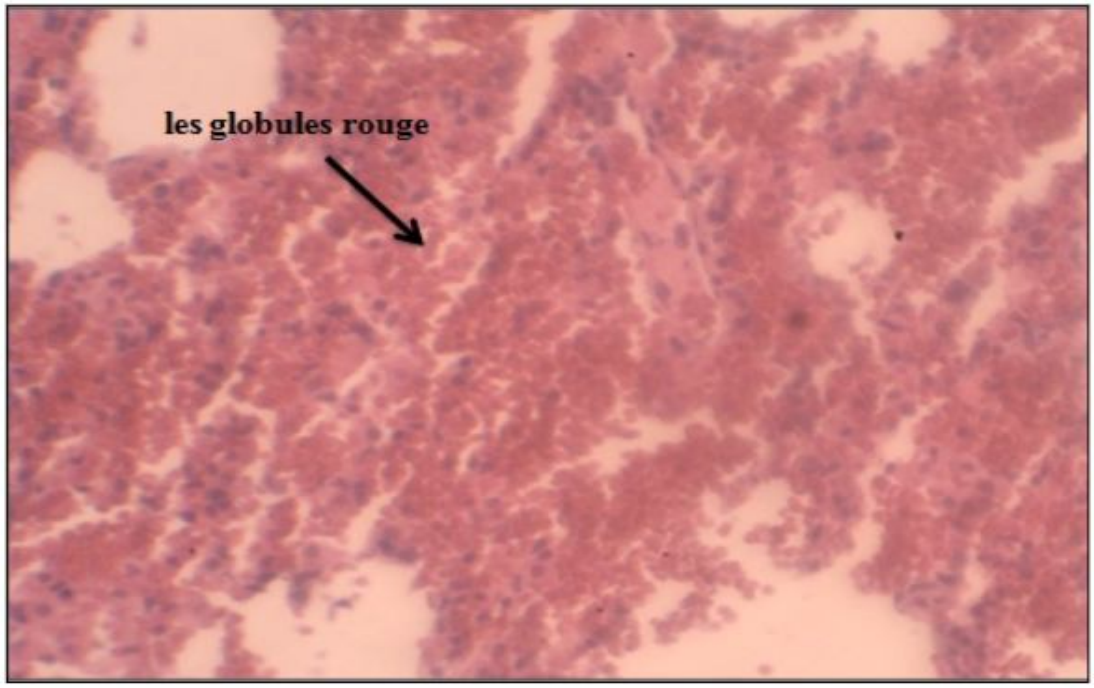


Figure18 : Coupe transversale au niveau de lobe gauche supérieur de poumon de souris CSE (coloration HE observé au microscope optique (G :10 x40)

On note la présence d'un infiltrat des cellules surtout les erythrocytes au niveau des poumons des souris traités par CSE .

Nos résultat, indiquent la présence d'une hémorragie au niveau des poumons à l'origine d'une hypertension pulmonaire . l'hypertension pulmonaire est fréquente dans une BPCO en stade sévère. La fumée du tabac elle-même pourrait provoquer un dysfonctionnement endothélial dans les vaisseaux pulmonaires, probablement médiatisé par un facteur relaxant dérivé de l'endothélium. Ces observations renforcent le rôle vasodilatateur du NO au niveau pulmonaire **[Szilasi et *al*, 2006].**

Conclusion

Conclusion :

La Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une des maladies pulmonaires les plus répondues, elle est caractérisée par une limitation obstructive partiellement réversible des débits aériens. L'inflammation est une caractéristique de la Broncho-pneumopathie chronique obstructive.

Après avoir traité les souris par l'extrait de tabac(CSE) par voie intrapéritoniales. Les résultats de dosage de NO : ont démontré que l'extrait de tabac induisait une augmentation de production de monoxyde d'Azote au niveau systémique et probablement locale confirmant ainsi l'infiltration importante et diffuse des cellules inflammatoires.
Enfin à l'issue de l'examen histologique, viennent appuyer nos suggestions confirmant l'induction de l'Emphysème après le traitement par le CSE ainsi qu'une désorganisation de l'architecture tissulaires de poumons.

Bien que il n'ya aucun model animal (BPCO) capable de mimer la pathologie humains, les différent types de modèle disponible nous offrons des informations fiable non seulement sur la complexité et la physiopathologie hétérogènes de la maladie mais aussi de mécanisme de leur progression et exacerbations.

Une grande compréhension de ces mécanismes peut aider pour améliorer le statut clinique des patients et dans le développement de nouvelles thérapies ainsi que pour prévenir le déclin accéléré de la fonction du poumon et le taux de mortalité.

Nos résultats préliminaires suggèrent que ce modèle d'étude de l'emphysème pulmonaire pourrait constituer un bon exemple d'étude des différentes manifestations histologiques.
Nous avons pu observer quelques signes précis d'emphysème à savoir des lésions, une infiltration importante et diffuse des cellules inflammatoires.

Annexes

Annexe1: les matériels non biologiques

Appareillage	**Verrerie et accessoires**	**Les réactifs et les colorants**
-Agitateur magnétique -Balance -Centrifugeuse -Microscope photonique - PH mètre -Réfrigérateur -Spectrophotomètre -Vortex -Glacière -Microtomes -Bain marie -Plaque chauffante -appareil photo de microscope -étuve -pompe à Vide	-Tube Falcon -Cuve de spectrophotomètre -Lames et lamelles -Eppendorf -Becher -Fiole -Barreau magnétique -Seringue stérile à l'usage unique -L'eau distillée -verre de montre -Entonnoir -Papiers filtre -Micropipette et ampoules -trousse à dissection -Cuvette à dissection -Les cassettes d'inclusion -le moule d'inclusion -Cole(Ekit) -Blanche de découpe	1. Les boites de poudre Nacl. NaH2Po4. KH_2Po4. Kcl 2. Hcl. NaOH 3. boite de cigarette (Marlboro Red) 4. Formol 5. L'alcool 6. xylène 7. Paraffine 8.colorants Hématoxyline et Eosine 9. Griess A et B

Annexes 2: Solutions et tampons

Il est composé de 3×10^{-2} mol de Nacl, 0.53×10^{-3} mol de Kcl, $2\times^{10-3}$ mol de Na_2H_2Po4, Et $3\times^{10-4}$ mol de KH_2PO_4 sont mis dans de l'eau distillé et homogénéisé sous agitateur magnétique. Le PH doit être compris entre [7.2 ,7.4].

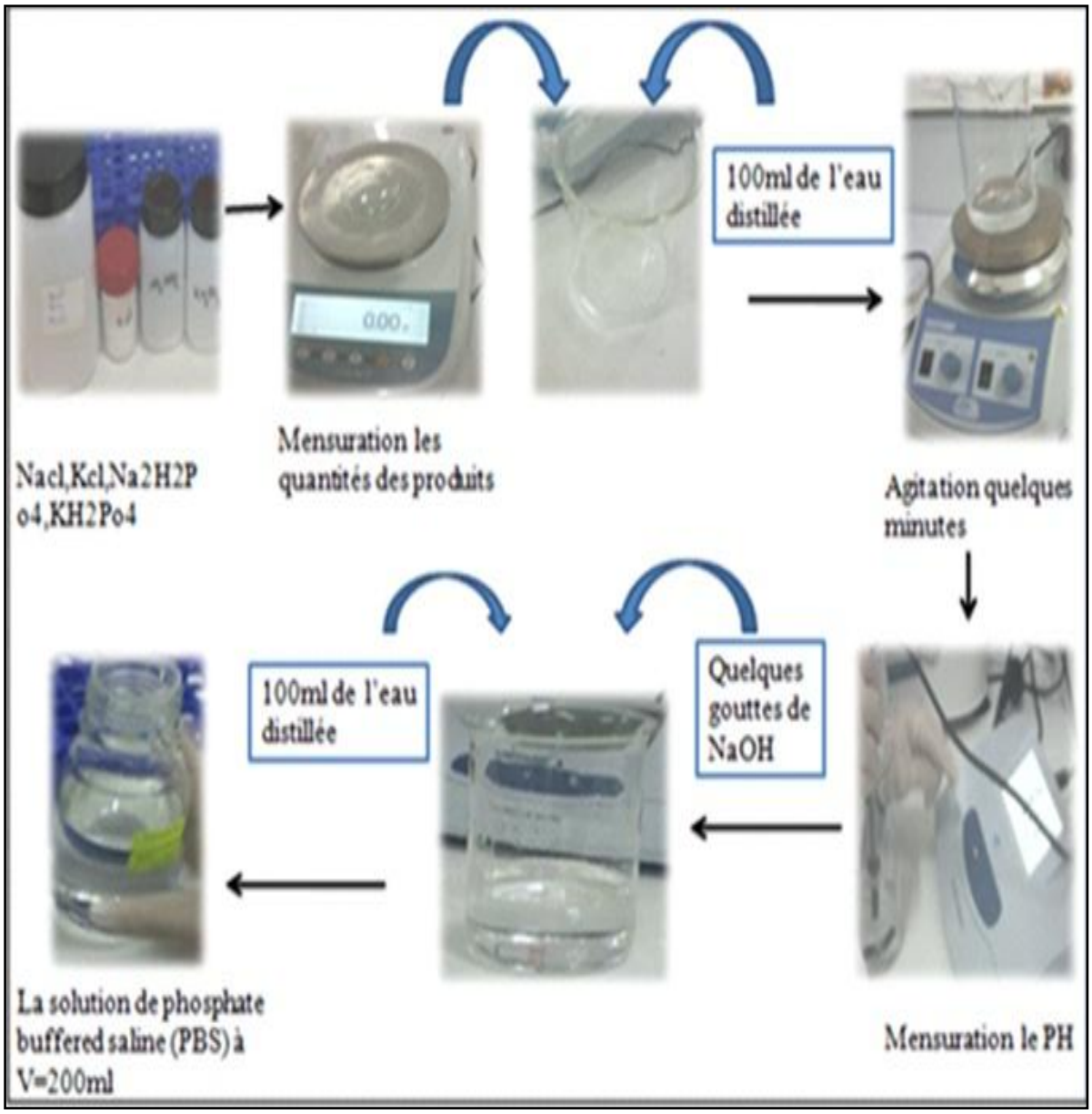
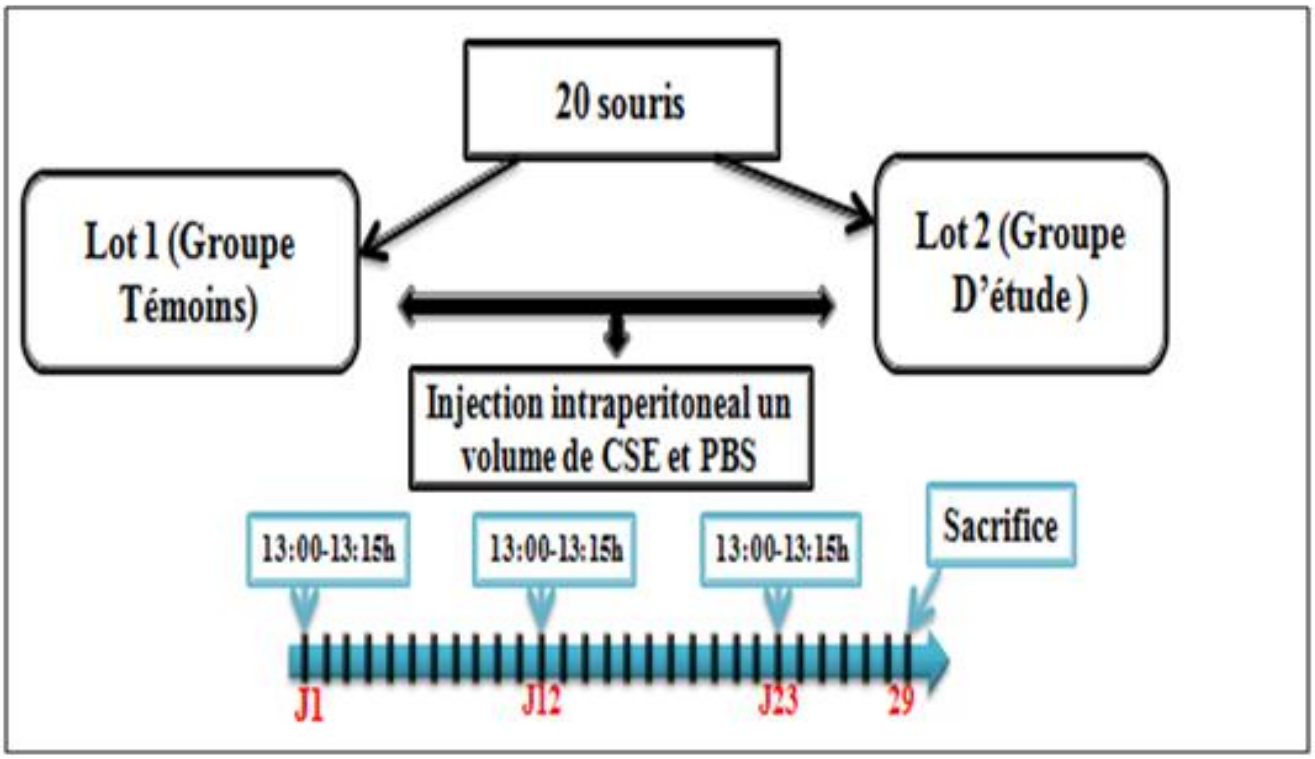


Figure : Protocole de préparation de solution phosphate Buffered salin (PBS)

Annexe3 : le calendrier d'injection de CSE et PBS



Annexes4: courbe d'étalon pour le dosage de NO

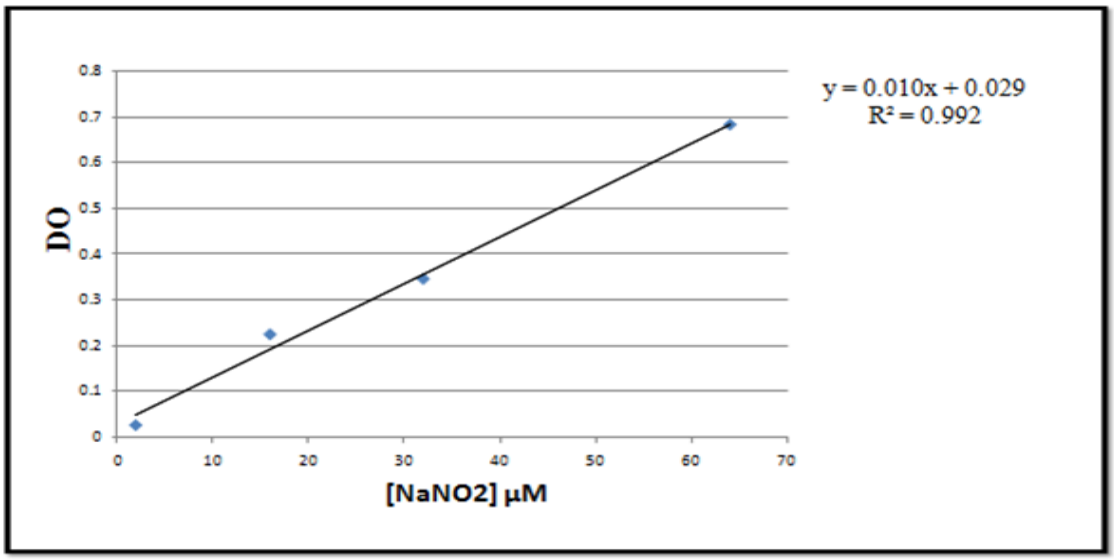


Figure : courbe étalon DO=f ([NaNO2] µM) des nitrites

Annexes 5 : **Réactifs de Griess:**

Griess A et Griess B sont des réactifs jouent un role dans la detection les nitrite résiduels.

Références bibliographiques

Liste des réferences :

A:

Aarbiou J,Rabe Kf,Hiemstra Ps.Role Of Defensins In Inflammatory Lung Disease .Ann Med 2002 ,34:96-101.

Adler Kb,Li Y.Airway Epithelium And Mucus : Intracellular Signaling Pathoways For Gene Expression Ans Secretion .Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ,25 :397-400.

Almirall, J. Gonzalez, Ca. Balanzo, X.Bolibar, I. Proportion Of Community Acquired Pneumonia Cases Attributable To Tobacco Smoking .Chest 1999, 116:375-37.

Atsoun, K.Annesi Maesano, I.Ghouaid, C.Bpco : Définition , Prévalence ,2tiologie Et Evaluation Médico-Economique .J Fran Viet Pneu .2012,03(08):1-65.

B:

Barnes Pj,Shapiro Sd,Pauwels Ra.Chronic Obstructive Pulmonary Disease :Molecular Ans Cellular Machanisms .Eurrespirs J2003,22:672-88

Barnes Pj .Small Airway In Copd. N Engl J Med 2004,350(26) :2635-7

Boczkowski, J. (2012). Les Modèles Animaux De Bpco Animal Models Of Copd.J. Franviet Pneu ,03(08) ,1-65).

Boyer, L. (2011).Rôle De Monoxyde D'azote (No) Et Des No Synthases Dans La Physiopathologie De La Bpco Et De Ces Complications Cardiovasculaires .Thèse De Doctorat : Science De La Vie Et De La Santé. Paris : Université Paris –Est Créteil.120p.

Burnner And Suddart. Soins Infermiers En Médecine Et En Chirurgie, Vol 2, 4^{éme} Ed, De Boeck, 2006 .P133.

C :

Celli Br, Snider Gl, Heffner J, Et Al. Standards For The Diagnosis And Care Of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. 1995; 152:S77-S121.

Coulter ;Mccarthy,A ;Xiang,J ;Roedl,W ;Wargner,E ;Robson,T ;Hirst.(2008).Nitricoxide A Noveltherapeutic For Cancer. Nitricoxide; 19:192-198.

Cross, Rk; Wilson, Kt. (2003).Nitricoxide In Inflammatory Bowel Disease ; 9 :179-189.

D:

Dagouassat, M. Boczkowski, J. (2012). Les Modèles Animaux De Bpco Animal Models Of Copd.J. Franviet Pneu ,03(08) ,1-65.

Daheshia, M. Pathogenisis Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Copd).Clin Appl Immunol Rev.2005,5 :339-351 .

Dekhuijzen Pn. Antioxidant Properties Of N-Acetylcysteine: Their Relevance In Relation To Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Eur Respir J 2004;23:629-636

Deslee G, Woods Jc, Moore C, Conradi Sh, Gierada Ds, Atkinson Jj, Battaile Jt, Liu L,Patterson Ga, Adair-Kirk Tl, Et Al. Oxidative Damage To Nucleic Acids In Severe Emphysema. Chest 2009;135:965-974.

Djelili,H.(2013).Effets Pharmacologiques Pulmonaires Des Flavoides:Caractérisation In Vitro Des Effets De La Quercétique Et De La Génitstéine .Thèse Doctorat:Sciences Option Biochimie .Departement De Biochiùmie:Université Ferhat Abbas Sétif 1,142p.

Drapier J.C.- Monoxyde D'azote Et Macrophage. Path. Biol, 1997, P 110-114 Rennard Si. Cigarette Smoke In Research. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 31: 479–480?

F:

Fazio, Let et *al* .(2014).Longitudinal Analysis Of Inflammation And Microbiotadynamics In Model Of Mildchronicdextran Sulfate Sodium-Induced Colitis In Mice .World J Gastroenterol;20(8):2051-2061.

Floreani Aa,Wyatt Ta,Stoner T,Et Al .Smoke And C5a Induce Airway Epithelial Icam-1 And Cell Adhesion .Am J Respir Cell Mol Biol 2003 (In Press).

Fugenaktan.(2004).Inos-Mediated Nitricoxide Production And Its Regulation.Life Sciences75(2004)639-653.

Fujimoto ,K.Kubo ,K.Yamamoto ,H Et Al .Eosinophilic Inflammation In The Airwayis Related To Glycocorticoid Reversibility In Patients With Pulmonary Emphysema .Chest 1999,115:697-702.

G:

Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy For The Diagnosis, Management, And Prevention Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Updated 2005 (Based On An April 1998 Nhlbi/Who Workshop).

Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy For The Diagnosis, Management, And Prevention Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Updated 2006). Www.Goldcopd.Org. Accessed March 7, 2007.

Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease (Gold).Global Strategy For The Diagnosis Management, And Prevention Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Updated 2009).

Global Strategy For Asthma Management And Prevention .The Gina Reports .Revised 2006.Www.Ginasthma.Org.

H:

He, Zh. Chen, P. Chen,Y.He ,Sd.Ye, Jr. Zhang, Hl. Cao, J. (2015).Comparison Between Cigarette Smoke Induced Emphysema And Cigarette Smoke Extract Induced Emphysema. Tobacco Induced Disease, 13(1):6.7.

Hogg Jc,Chu F,Utokaparch S,Et Al .The Nature Of Small Airway Obstruction In Chronic Obstructive Pulmonary Disease .N Engl J Med 2004,350:2645-53.

Hogg Jc ,Timens W .The Pathology Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease .Annu Rev Pathol.2009,4:435-59.

I:

Institut De Veille Sanitaire.Aide Mémoire:Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (Bpco).Juin 2006 .

K :

Kasahara Y,Tuder Rm,Taraseviciene-Stewart L,Et Al.Inhibition Of Vegf Receptors Causes Lung Cell Apoptotis And Emphysema .J Clin Invest 2000,106:1311-1319.

Kirkham Pa,Spooner G,Rahman I,Rossi Ag.Macrophage Phagocytosis Of Apoptotic Neutrophils Is Compromised By Matrix Proteins Modified By Cigarette Smoke And Lipid Peroxidation Products .Biochem Biophy Res Commun .2004 May 21,318(1):32-7.

Kinoshita T, Hoshino T, Imaoka H, Ichiki H, Okamoto M, Kawayama T, Yodoi J, Kato S, Aizawa H. Thioredoxin Prevents The Development And Progression Of Elastase-Induced Emphysema. Biochem Biophys Res Commun 2007; 354:712-719.

Kluchová Z. Petrášová D. Joppa P. Dorková Z. Tkáčová R. .(2007)The Association Between Oxidative Stress And Obstructive Lung Impairment In Patients With Copd .*Physiol. Res. 56: 51-56.*

Kozma R, E Alves, V -De-Oliveira, F Lopes, R Guardia, H De Faria, C Yamashita, M Júnior, F Frei, M Ribeiro-Paes, J Ribeiro-Paes A New Experimental Model Of Cigarette Smoke-Induced Emphysema In Wistar Rats .Bras Pneumol. 2014;40(1):46-54

Kolios, G; Valates, V; Wards, S, (2004).Nitricoxide In Inflammatory Bowel Disease: Auniversalmessenger In An Unsolved Puzzle. Immunology; 113:427-437.

Kratzer A, Salys J, Nold-Petry C, Et Al. Role Of Il-18 In Second-Hand Smoke Induced Emphysema. Am J Respir Cell Mol Biol 2013; 48(6):725-32.

Kronck, K, D ; Fehsel,K ;V ;Kolb-Bachofen .(1998).Inductible Nitricoxide Synthase In Humandiseases,Clin.Exp.Immunol.113 :147-156.

L:

Lamb et *al* (2012). Characterization Of A Mouse Model Of Cigarette Smoke Extract-Induced Lung Inflammation Pulmon Resp Med, 2:3

Lames, Be. Sousa, Ar. Rees, Jp. Lee, Th. Subepithelial Immunopathology Of The Large Airways In Smokers Woth And Without Chronic Obstructive Pulmonary Disease .Eur Respir J.2000, 15: 512-516.

Lee et *al , 2012*. J Dent Res 91(2):142-149.Cigarette Smoking And Inflammation :Cellular And Molecular Mechanisms.

M:

Mineur Ys, Abizaid A, Rao Y, Salas R, Dileone Rj, Gündisch D,et *al*. Nicotine Decreases Food Intake Through Activation Of Pomc Neurons. Science.2011;332(6035):1330-2.

Macmacking ,J.Xie ,Qw,Nathan,C.(1997).Nitric Oxyde And Macrophage Function .Annu Rev.Immunol,15:323-50

Macnee, W .Pulmonary Ans Systemic /Antioxidant Imbalance In Chronic Obstructive Pulmonary Disease .Proc Am Thorax Soc.2006, 2:50-60.

Mapel, D. Chen, Jc.George, D.And Haldert Rj. The Cost Chronic Obstructive Pulmonary Disease And Its On Managed Care. Manag Care Interface .2004, 17:61-66.

March ,Th. Wilder, Ja. Esparza ,Dc Et Al. Modulators Of Cigarette Smoke Induced Pulmonary Emphysema In A/J Mice. Toxicol Sci 2006; 92(2):545-59.

Mehta H, Nazzalk And Sadikot R. T.(2008). Cigarette Smoking And Innate Immunity. Inflamm. Res. 57 :497–503.

Molfinona And Jeffery Pk .Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Histopathology, Inflammation And Potential Therapies.Pul Pham Therap.2006.

Molinie F, Kauffman F .Epidémiologie Et Conséquence Socio-Economiques. Epidémiologie Descriptive. In: Margaux.Paris: Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive .2003, Pp15-34.

Muller Nl. Clinical Value Of High-Resolution Ct In Chronic Diffuse Lung Disease. *Air* 1991:157: I 163-1 170.

Murry, Cj. Lopez, Ad .Alternative Progression Of Mortality And Disability By Cause 1990-2020: Global Burden Of Disease Study .Lancet 1997,349:1498-504.

N:

Nadel Ja.Role Of Mast Cell And Neutrophil Proteases In Airway Secretion.Am Rev Respir Dis 1991,144;S48-51.

Nikoletta R, Antonia K,And Nikolaos G,Koulouris .Inflammation And Immune Response In Copd :Where Do We Stand ? Hindawi Publishing Corporation Mediators Of Inflammation Volume 2013, Article Id 413735, 9 P.

O:

O'donnell Ra,Peebles C,Ward Ja,Et Al .Relationship Between Peripheral Airway Dysfunction, Airway Obstruction,And Neutrophilic Inflammation In Copd .Thoraw 2004,59:837-42.

P:

Palmer, Rm; Ferrige, Ag; Moncada, S. (1987).Nitricoxide Releaseaccounts For The Bilogicalactivity Endothelium- Derivedrelaxing Factor .Nature; 327; 524-6.

Panzner P,Lafitte Jj,Tsicopoulos Apanzner P, Laffitte Jj,Tsicopoulos A,Et Al .Marked Up-Regulation Of T Lymphocytes And Expression Of Interleukin-9 In Bronchial Biopsies From Patients With Chronic Bronchitis Obstruction .Chest 2003,124:1909-15.

Pesci A,Balbi B,Majori M, Et Al .Inflammatory Cells And Mediators In Bronchial Lavage Of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease ?Eur Respir J 1998,12:380-6.

Pratt Pc. Role Of Conventional Chest Radiography In Diagnosis And Exclusion Of Emphysema. *Am J Med* 1987:82:998-1006.

R:

Rahman I, Van Schadewijk Aa, Crowther Aj, Hiemstra Ps, Stolk J, Macnee W, De Boer Wi. 4- Hydroxy-2-Nonenal, A Specific Lipid Peroxidation Product, Is Elevated In Lungs Of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166:490-495

Reychler, C. Delguste, P. Kinesitherapie Respiratoire Chronique .Elsevier Masson 2007.13 :129-242.

Rubio Ml, Martin-Mosquero Mc, Ortega M, Peces-Barba G, Gonzalez-Mangado N. Oral Nacetylcysteine Attenuates Elastase-Induced Pulmonary Emphysema In Rats. Chest 2004;125:1500-1506.

S :

Senn O, Russ Ew, Imboden M, Probst-Hensch Nm. Alpha Antitrypsin Deficiency And Lung Disease: Risk Modification By Occupational And Environmental Inhalants .Eur Respir J.2005 Nov, 26(5):909-17.

Sethi S. New Developments In Pathgenesis Of Acute Exacerbation Of Chronic Obstructivr Pulmonary Disease. Curr Opin Infect Dis. 2004; 17 : 698-702.

Schroeder, R; Kuo, P. (1995) .Nitricoxide: Physiology And Pharmacology. Anesthanalg81, 1052-9.

Similoswski, T.Muir, Jf.Derrene, Jp. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive 2ème Edition Révisée Et Augmentée, John Libbey Eurotext, 2004.

Sin Dd,Anthonisennr,Sorianojb,Agustiag.Mortality In Copd:Role Of Comorbidities .Eurorespir J2006,28(6): 1245-1257.

SPLF .Pbco Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive :Guide A L'usage Des Patients Et Leur Entourage ,Edition Bash 2004 .

Strober, W, W; Fuss, Ij; Blumberg, Rs (2002). The Immunology Of Mucosalmodels Of Inflammation; 20:495-549.

T:

Takzawa H,Tanaka M,Takami K,Et Al .Inceased Expression Of Transforming Growth Factor Beta1 In Small Airway Epithelium From Tabacoo Smokers And Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Copd).Am J Respir Crit Care Med 2001,163:1476-1483.

W:

World Health Organisation Chronique Obstructive Pulmonary Disease (Copd).Fact Sheet N0 315.November 2006.

Z:

Zidouni, N .Symposium Bpco Comment Mener Une Enquête Opérationnelle : Les Cas Des Bpco. Juin2005, Faculté De Medicine, Annaba.

Zhang, Y et *al.* (2013). Intraperitoneal Injection Of Cigarette Smoke Extract Induced Emphysema, And Injury Of Cardiac And Skeletal Muscles In Balb/C Mice. Experimental Lung Research, 39, 18–31.

Zhu Jie,Qiu Ys,Majumadar S,Et Al .Exacerbations Of Bronchitis,Bronchial Eosinophilia And Gene Expression For Interleukin-4,Interleukin-5,And Eosinopjil Chemoattractants .Am J Respir Crit Care Med 2001,164:109-16.

Abstract:

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a pulmonary disorder which the first risk factor is smoking .It is Characterized by a gradual decrease in air flow not totally reversible associated with destruction of the alveolar walls and a chronic inflammation. This disease is a real public health problem, could, According to WHO, become the 3rd Cause of death by 2020.

The objective of our study is to establish COPD mouse model in BALB / c male in order to study, on the one hand the histological and anatomic changes of emphysema during COPD.On the other hand an analysis of the expression of plasmatic Nitric oxide was achieved.

The experimental approach was as follows: a type control study based on three intra-peritoneal of freshly prepared tobacco extract (CSE) for each administration for the batches of treated mice and injection of the sterile PBS for the batches of the control mice, according to a precise schedule during a month of experiment (day1,day12,day23 and sacrifice in day29).

By soot a macroscopic study of spleen and lung was achieved as well as a histological analysis of the transversal sections of the lungs was proceeding by staining of hematoxylin and eosin (HE).Finally, the dosage of Nitric oxide (NO) was made using the Griess method to evaluate its contents and its association with inflammatory processes and histopathological changes observed.

The results obtained reveal the destruction of the pulmonary walls and tissues lesions testify the installation of pulmonary emphysema. Also, a systemic expression of NO was noted and this association with inflammatory cell infiltration to the lung and sometimes local hemorrhage signs of pulmonary hypertension.

At last, these observations have similarities with physiopathological mechanisms observed in patients with COPD, suggesting that this experimental model is a good example of study for this disease.

Key words: murin model, COPD, Emphysema, Tobacco concentrate, Nitric oxide.

ملخص:

مرض انسداد القصبات الرئوية المزمن(COPD)هو مرض رئوي حيث يشكل التدخين عامل الخطر الأول. و يتميز هذا المرض بانخفاض تدريجي وغير رجعي في تدفق الهواء مرتبط بتدمير جدار الحويصلات الهوائية والالتهاب المزمن.

هذا المرض هو مشكلة صحية عامة خطيرة قد يصبح وفقا لمنظمة الصحة العالمية ثالث سبب للوفاة نحو2020.

الهدف من دراستنا هو انشاءنموذج مرض الانسداد الرئوي عند الفئران من نوع BALB/c من جنس ذكر و ذلك من أجل دراسة : من جهة التغيرات النسيجية و التشريحية لانتفاخ الرئة خلال مرض انسداد القصبات الرئوية المزمن و من جهة أخرى تحليل ظهور أكسيد النيتريت في البلازما .

تبعا لذلك اجراء التجارب يكون على النحو التالي:

دراسة حالات شاهدة ترتكزعلى ثلاث حقن من مستخلص التبغ داخل الصفاق المعد عند كل حقنة لأجل فئةالفئران المعالجة وحقن ال PBS المعقم لفئة الفئران الشاهدة وفقا لجدول زمني محدد خلال شهرمن التجريب(اليوم 1,اليوم 12.اليوم23 وقتلهم كان في اليوم (29) . لاحقا تم اجراء دراسة بالعين المجردة للطحال و رئات الفئران و كذلك تم تحليل نسيجي للمقاطع العرضية للرئة بطريقة التلوين الهيماتوكسيلين و الايوزين (HE).وأخيرا معايرة مونوكسيد الآزوت في البلازما بواسطة طريقة Griess من أجل تتبع محتواه وارتباطه مع العمليات الالتهابية والتغيرات التشريحية الملاحظة .

النتائج المتحصل عليها تكشف عن تدمر جدران الرئة و تلف الأنسجة و هذا دليل عن انتفاخ الرئة و أيضا لوحظ ظهور نظامي لل NO, و هذا مرتبط مع تسلل الخلايا الالتهابية الى الرئة و أحيانا نزيف محلي علامة ارتفاع ضغط الدم الرئوي.

و في النهاية كل هذه الملاحظات تعرض أوجه التشابه مع الآليات الفيزيولوجية الملاحظة عند مرضى الانسداد الرئوي مما يشير الى أن هذا النموذج التجريبي هو أفضل مثال لدراسة هذا المرض .

مفاتيح البحث: نموذج الفأر,مرض انسداد القصبات الرئوية المزمن ,انتفاخ الرئة,مستخلص التبغ ,أكسيد النيتريت .