

Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

**Etude de l'effet protecteur des
antioxydants contre les lésions du nerf
périphérique**

Présenté par :

ALIOUI Sabrina et BARA Chanez

Soutenu le : 26/06/2023

Devant le jury composé de :

Mme BOUREBABA Y.	MCB	Président
Mme BENSALÉM-BOURNINE S.	MCA	Promoteur
Mme SADAOUÏ-BOUGOUFFA K.	MCA	Examineur

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

- Mes chers parents*
- Ma chère sœur jumelle Sonia*
- Mes chers frères et sœurs et mes chers beaux-frères*
- Mes neveux et nièces*
- Ma chère amie et binôme Sabrina*
- Mes chères amis (es) et meilleurs (es) amis (es), ainsi qu'à toutes les personnes qui croient en moi.*

Chanez

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

- Mes chers parents*
- Mes chers frères et sœurs*
- Ma chère amie et binôme Chanez*
- Mes chères amis (es) et meilleurs (es) amis (es), ainsi qu'à toutes les personnes qui croient en moi.*

Sabrina

Remerciements

A dieu, le tout puissant

De nous avoir donné la foi, la force, la volonté et la patience pour réaliser ce modeste travail

A notre enseignante et promotrice Mme BENSALTEM-BOURNINE S.

D'avoir accepté d'être la dirigeante de ce travail, et pour la confiance qu'elle nous a accordé pour l'accomplissement de cette thématique.

Pour ses précieux conseils, son orientation, son dévouement, et sa modestie qui nous ont permis d'accomplir avec succès notre travail.

Nous exprimons également notre profonde gratitude envers les membres du jury, Mme BOUREBABA Y. et Mme SADAOUI-BOUGOUFFA K., pour l'attention qu'ils ont portée à notre travail et pour avoir accepté de l'évaluer.

Nous tenons également à exprimer toute notre reconnaissance envers notre co-promotrice Mme TSENIA Randa pour toute sa disponibilité, son aide, sa gentillesse et sa présence tout au long de notre travail.

Nous souhaitons également adresser nos remerciements chaleureux à l'ensemble du personnel du laboratoire LAEMA, laboratoire BPC4, laboratoire de biologie générale, laboratoire de chimie de la faculté de technologie et du laboratoire d'anatomopathologie de la faculté de médecine, en particulier à Hakima, Linda et Louiza pour leur soutien précieux.

Enfin, nous voulons exprimer notre profonde gratitude envers les membres de nos familles respectives pour leur soutien indéfectible, et surtout à nos parents pour leurs efforts constants et leurs encouragements.

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I-1. Système nerveux périphérique 3

I-1-1. Système nerveux autonome (SNA)..... 3

I-1-2. Système nerveux somatique..... 4

I-2. Nerfs périphériques 5

I-2-1. Organisation générale du nerf périphérique..... 5

I-2-2. Histologie du nerf périphérique 6

I-2-3. Physiologie du nerf périphérique 8

I-2-4. Nerf sciatique..... 8

I-2-4-1. Anatomie du nerf sciatique..... 8

I-3. Neuropathies périphériques 9

I-3-1. Etiologie..... 9

I-3-2. Grades de sévérité des lésions..... 10

I-3-3. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régénération nerveuse 11

I-4. Stress oxydant et lésions nerveuses 13

I-4-1. Stress oxydant 13

I-4-2. Définition d'un radical libre..... 13

I-4-3. Conséquences biochimiques du stress oxydant 14

I-5. Mécanismes de défense antioxydants 15

I-5-1. Systèmes de défense enzymatique 16

I-5-2. Systèmes de défense non enzymatique 17

I-6. Stress oxydatif dans les neuropathies périphériques..... 18

Chapitre II: Matériel et méthodes

II-1. Matériel..... 20

II-1-1. Equipement..... 20

II-1-2. Produits chimiques 20

II-1-3. Echantillons biologiques..... 20

II-2. Méthodes 21

II-2-1. Extraction du nerf sciatique	21
II-2-2. Conservation du nerf sciatique	21
II-2-3. Préparation des échantillons pour l'étude du stress oxydant.....	22
II-2-4. Dosage des marqueurs du stress oxydant	23
II-2-5. Evaluation du statut antioxydant total	24
II-2-6. Etude histologique	25
II-2-7. Etude statistique.....	31
Chapitre III: Résultats et discussion	
III-1. Résultats	32
III-1-1. Evaluation in vitro de la peroxydation lipidique par le dosage des malondialdéhydes	32
III-1-2. Evaluation in vitro du statut antioxydant total	33
III-1-3. Résultats de l'étude histologique.....	34
III-2. Discussion	38
<i>Conclusion et perspectives</i>	42
References bibliographiques	43

Liste des figures

Figure 1: Anatomie du système nerveux.....	3
Figure 2: Anatomie du nerf périphérique	5
Figure 3: Coupe axiale microscopique d'un nerf périphérique	7
Figure 4: Anatomie du nerf sciatique.....	9
Figure 5: Classification des LNP	11
Figure 6: Dégénérescence et régénération suite à une lésion du nerf périphérique.....	13
Figure 7: Sources des radicaux libres oxygénés et des espèces réactives de l'oxygène dans les processus biologiques	14
Figure 8: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	15
Figure 9: Vue d'ensemble des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des antioxydants régulant leur production	18
Figure 10 : Photographie originale de l'extraction du nerf sciatique chez le poulet.	21
Figure 11: Photographie originale montrant les étapes de conservation du nerf sciatique dans deux milieux de conservation distincts (solution de VitE+VitC et solution du NaCl (temoin).	22
Figure 12 : Photographie originale des étapes d'homogénéisation du nerf sciatique.....	23
Figure 13: Principe du dosage du Malondialdéhyde (MDA).....	24
Figure 14: Photographie originale de la préparation des histocassettes.....	25
Figure 15: Photographie originale de l'automate de déshydratation.....	26
Figure 16: Photographie originale de la station d'enrobage.....	27
Figure 17: Photographie originale de l'enrobage de l'échantillon avec de la paraffine.....	27
Figure 18 : Photographie originale de l'étape de démoulage et obtention des blocs.....	28
Figure 19: Photographie originale de l'étape de réalisation des coupes histologiques	28
Figure 20: Photographie originale de l'étalement des coupes histologiques.....	29
Figure 21: Photographie originale de l'étape de déparaffinage des lames	29
Figure 22: Photographie originale des étapes de coloration	30
Figure 23: Photographie originale de l'étape de montage et préparation des lames	30
Figure 24: Photographie originale du matériel utilisé pour l'observation microscopique	31
Figure 25: Effet protecteur de l'association VitE+VitC contre la peroxydation lipidique au niveau du nerf sciatique à différents temps.....	32

Figure 26: Evaluation de la capacité antioxydante totale des milieux de conservation du nerf sciatique en fonction du temps..	33
Figure 27: Photographie originale des coupes histologiques transversales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées au grossissement 4X.	34
Figure 28: Photographie originale des coupes histologiques transversales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées sous microscope au grossissement 20X.....	35
Figure 29: Photographie originale des coupes histologiques longitudinales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées sous microscope grossissement 4X..	36
Figure 30: Photographie originale des coupes histologiques longitudinales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées sous microscope grossissement 20X..	37

Liste des abréviations

AGPI : Acide gras polyinsaturé

CS : Cellule de Schwann

ERO : Espèces réactives oxygénées

GPxs : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion

LNP : Lésions nerveuses périphériques

MAG : *Myelin associated glycoprotein*

MBP : *Myelin basic protein*

MDA : Malondialdéhyde

Myéline P0 : *Myelin protein zero*

N : Nœuds de Ranvier

NS : Nerf sciatique

PEG : Polyéthylène glycol

PMP22 : *Peripheral myelin protein 22*

RL : Radicaux libres

SAT : Statut antioxydant total

SNA : Système nerveux autonome

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SOD : Superoxyde dismutase

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloracétique

TTH : Solution stock composée de TBA, TCA et HCL.

Vit C : Vitamine C

Vit E : Vitamine E

Introduction

Introduction

Les nerfs périphériques sont sensibles aux blessures et sont susceptibles de causer diverses maladies, en contribuant à différents processus pathologiques. Les neuropathies périphériques sont variées et peuvent résulter de différentes causes, telles que des traumatismes, des conditions génétiques, métaboliques, carencielles, infectieuses, immunitaires ou induites par des médicaments **(Caillaud et al., 2018)**.

Au cours des dernières années, les études réalisées ont principalement contribué à approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans la régénération nerveuse et des facteurs qui peuvent influencer ce processus. Actuellement, la méthode privilégiée pour traiter les lésions nerveuses périphériques (LNP) est la microchirurgie. Cependant si la lésion empêche une suture bout à bout, la greffe de nerf autologue demeure le traitement de choix recommandé **(Faroni et al., 2015)**. Néanmoins, la disponibilité limitée des nerfs donateurs et les conséquences négatives inévitables sur le site donneur sont des défis à prendre en compte **(Ikeguchi et al., 2003)**. Les greffes de nerfs allogéniques pourraient donc représenter une alternative intéressante aux greffes de nerfs autologues conventionnelles **(Evans et al., 1994)**. Récemment, une thérapie immunosuppressive a été mise au point afin de minimiser le rejet des greffes allogéniques, tout en présentant peu d'effets secondaires pour les receveurs **(Lees and McCabe, 2002)**. Cependant, étant donné que la conservation d'organes entiers n'est pas très développée, les organes prélevés chez les donateurs doivent être immédiatement transplantés chez les receveurs. Il est donc impératif de développer des méthodes pour la conservation à long terme des organes ou des tissus avec peu de changements dégénératifs. En ce qui concerne la chirurgie des NP, si une méthode de conservation optimale pouvait être mise au point, les greffes de nerfs allogéniques pourraient être privilégiées pour reconstruire les LNP, ouvrant ainsi la voie à la création de banques de tissus nerveux **(Ikeguchi et al., 2003)**.

Dans ce contexte, l'utilisation des antioxydants en particulier les vitamines E et C ont récemment attiré l'attention pour leurs effets biologiques protecteurs contre le stress oxydatif **(Riffel et al. 2016)**. Les antioxydants sont des composés qui protègent les cellules contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres (RL) et les espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui peuvent endommager les tissus et les cellules nerveuses **(Dumont and Beal, 2011)**.

L'objectif principal de cette étude consiste donc à examiner les effets protecteurs de l'association des vitamines E et C sur le nerf sciatique (NS), en vue d'améliorer la conservation des nerfs périphériques en luttant contre le stress oxydatif. Notre travail repose sur une approche *in vitro* et sur des analyses histologiques.

Nous avons structuré notre mémoire en deux parties distinctes :

- ❖ La première partie concerne une revue bibliographique qui présentait des informations générales sur le système nerveux périphérique, l'anatomie du nerf périphérique, les neuropathies périphériques, la dégénérescence et la régénération nerveuse, ainsi que sur le stress oxydatif et les antioxydants.
- ❖ La seconde partie est dédiée à la partie pratique, dans laquelle nous avons détaillé les protocoles expérimentaux que nous avons utilisés pour répondre à notre question de recherche. Nous avons ensuite présenté et interprété les résultats obtenus. Enfin, nous avons terminé par une conclusion générale pour notre étude et proposé des pistes de recherche intéressantes pour l'avenir.

Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I-1. Système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique (SNP) est considéré comme une partie relativement simple du système nerveux comparé au système nerveux central (SNC). Le SNP est constitué de racines, de troncs, de nerfs, de ganglions et de plexus situés à l'extérieur de l'encéphale et de la moelle épinière. Sa fonction principale est d'établir une connexion entre le SNC et les membres ainsi que les organes. Contrairement au SNC, le SNP ne bénéficie pas de la protection d'une enveloppe osseuse ni de la barrière hémato-encéphalique, ce qui le rends vulnérable aux toxines et aux traumatismes physiques. Le SNP comprend le système nerveux autonome et le système nerveux somatique (**Catala and Kubis, 2013**).

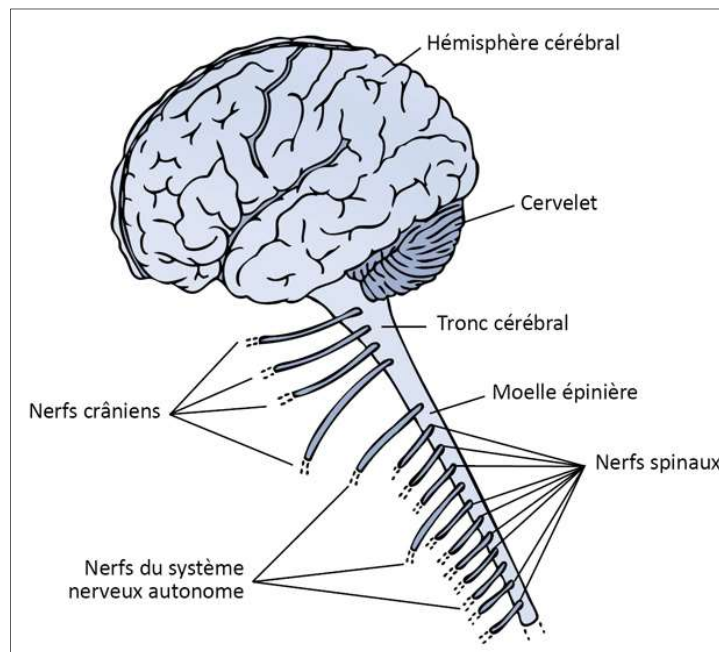


Figure 1: Anatomie du système nerveux (**Catala and Kubis, 2013**)

I-1-1. Système nerveux autonome (SNA)

Le système nerveux autonome (SNA), également appelé système nerveux viscéral ou involontaire, fonctionne de manière inconsciente et involontaire. Il innerve le muscle cardiaque, le muscle lisse et diverses glandes endocrines et exocrines, ce qui lui permet d'influencer l'activité de la plupart des tissus et des organes du corps. Le SNA est composé de deux divisions anatomiques et fonctionnelles distinctes, le système

sympathique et le système parasympathique, qui sont toniquement actifs, c'est-à-dire qu'ils fournissent en permanence un certain degré d'influx nerveux à un tissu donné. Ainsi, la fréquence de décharge des neurones dans les deux systèmes peut augmenter ou diminuer (McCorry, 2007).

I-1-1-1. Système sympathique : prédomine lors des réactions d'urgence de type 'lutte ou fuite' pendant l'exercice. L'effet global du système sympathique dans ces conditions est de préparer le corps à une activité physique intense. Pour être plus précis, le système sympathique favorise l'augmentation du débit sanguin vers les tissus qui ont un besoin accru d'oxygène et de nutriments, notamment les muscles squelettiques (McCorry, 2007)

I-1-1-2. Système parasympathique : prédomine dans des conditions de calme et de repos. L'effet global du système parasympathique dans ces conditions est de conserver et de stocker l'énergie et de réguler les fonctions corporelles de base telles que la digestion et la miction (McCorry, 2007).

I-1-2. Système nerveux somatique

Le système nerveux somatique est responsable de la transmission de signaux volontaires de l'encéphale aux organes cibles, notamment les muscles striés squelettiques. Ce système se compose d'une composante sensorielle et d'une composante motrice, qui comprend des nerfs sensitifs, des nerfs moteurs et de nombreux nerfs mixtes. En fonction de la zone du corps innervée, le système somatique est divisé en nerfs crâniens et rachidiens (Catala and Kubis, 2013).

I-1-2-1. Nerfs crâniens : Il existe douze paires de nerfs crâniens, dont dix émergent du tronc cérébral et sont responsables des fonctions des structures anatomiques de la tête et du cou en transportant des informations sensitivomotrices. Toutefois, les nerfs X et XI ont des fonctions différentes et ne sont pas exclusivement responsables des fonctions de la tête (Guthrie, 2007).

I-1-2-2. Nerfs spinaux (rachidiens) : Chaque nerf spinal est composé de deux racines de la moelle épinière fusionnées : la racine ventrale est formée des radicules motrices, qui contiennent les axones des motoneurones, tandis que la racine dorsale renferme le ganglion de la racine dorsale, qui contient les corps cellulaires de tous les neurones sensoriels du SNP. Ces deux racines se combinent pour former un nerf spinal mixte. Les

nerfs rachidiens sont divisés en huit paires cervicales, douze paires thoraciques, cinq paires lombaires, cinq paires sacrées et une paire coccygienne, qui les répartissent à travers le corps (Catala and Kubis, 2013).

I-2. Nerfs périphériques

I-2-1. Organisation générale du nerf périphérique

Un nerf peut être considéré comme un organe distinct, composé de tissu nerveux, de tissu conjonctif et d'une irrigation sanguine. Les cellules nerveuses, ou neurones, sont constituées d'un corps cellulaire, de dendrites et d'un axone. Dans le SNP, la plupart des axones sont enveloppés d'une gaine de cellules de Schwann (CS) qui forme une couche de myéline autour de l'axone. Les CS sont interrompues par des espaces appelés nœuds de Ranvier (N), où se produisent les processus de dépolarisation et de repolarisation lors de la propagation saltatoire du potentiel d'action (Brull *et al.*, 2015). Les axones sont regroupés en faisceaux moteurs ou sensoriels, appelés fascicules (Grinsell and Keating, 2014), un nerf peut être constitué d'un à une centaine de fascicules dont le nombre et la distribution sont constamment variables (Rigoard and Lapierre, 2009). Chaque axone individuel est enveloppé dans une couche de tissu conjonctif appelé endoneurium, tandis que les fascicules sont séparés les uns des autres par le périneurium. Les groupes de fascicules, quant à eux, sont contenus dans un nerf périphérique qui est entouré par une couche de tissu conjonctif appelé épineurium (Grinsell and Keating, 2014).

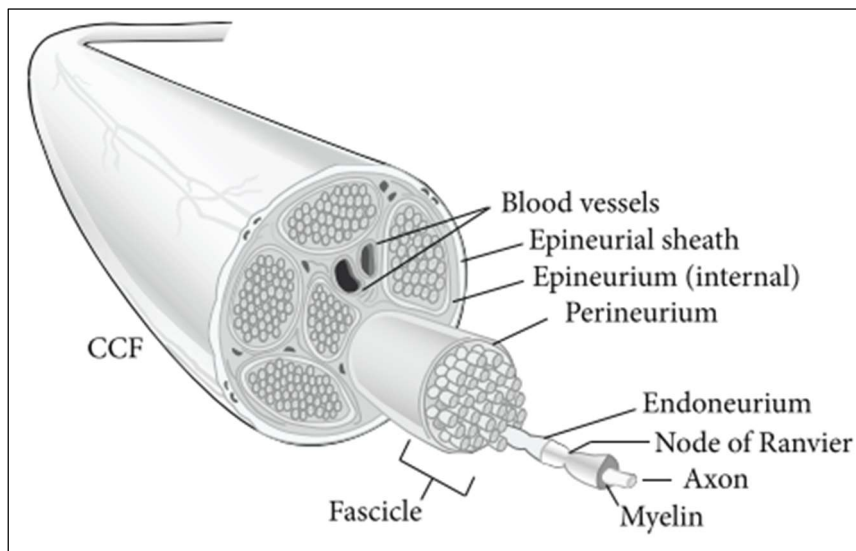


Figure 2: Anatomie du nerf périphérique (Siemionow and Brzezicki, 2009)

I-2-2. Histologie du nerf périphérique

I-2-2-1. Axones

L'axone est un prolongement cylindrique du cytoplasme du neurone dont le rôle principal est de transmettre l'influx nerveux. Le cytosquelette axonal est composé de trois groupes de protéines : Les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires, qui incluent les neurofilaments. Ensemble, ces protéines contribuent au maintien de la forme de l'axone ainsi qu'à sa croissance (**Rigoard and Lapierre, 2009**). Il existe deux types d'axones dans le SNP : Les axones non myélinisés et les axones myélinisés, ces derniers étant recouverts d'une gaine de myéline provenant des CS (**Debanne et al., 2011**). Les axones myélinisés du SNP ont une particularité qui est la présence d'une lame basale qui entoure complètement les CS. Cette lame basale joue un rôle important dans le guidage des axones pendant leur croissance (**Rigoard and Lapierre, 2009**).

I-2-2-2. Enveloppes protectrices des nerfs périphériques

➤ **Endonèvre (endoneurium)** : enveloppe de tissu conjonctif qui entoure les fibres nerveuses individuelles (ou axones). L'endonèvre est responsable de la protection et de la nutrition des fibres nerveuses, ainsi que de leur isolation électrique les unes des autres (**Richard et al., 2012**).

➤ **Périnèvre (périneurium)** : enveloppe conjonctivo-vasculaire qui entoure chaque fascicule nerveux. Cette gaine est formée de plusieurs couches concentriques de cellules périneurales qui ont une origine fibroblastique (**Greathouse et al., 2016**).

➤ **Epinèvre (épineurium)** : tissu conjonctif qui enveloppe le nerf et qui est composé de fibroblastes, de collagène et de tissu adipeux. Cette enveloppe représente 30 à 70% de la surface de section d'un nerf périphérique. La fonction de l'épinèvre consiste à assurer la liaison et le mouvement du nerf avec les structures environnantes, à absorber les forces de tension grâce à son élasticité ainsi qu' à protéger les axones (**Rigoard and Lapierre, 2009**) ; (**Peltonen et al., 2013**) .

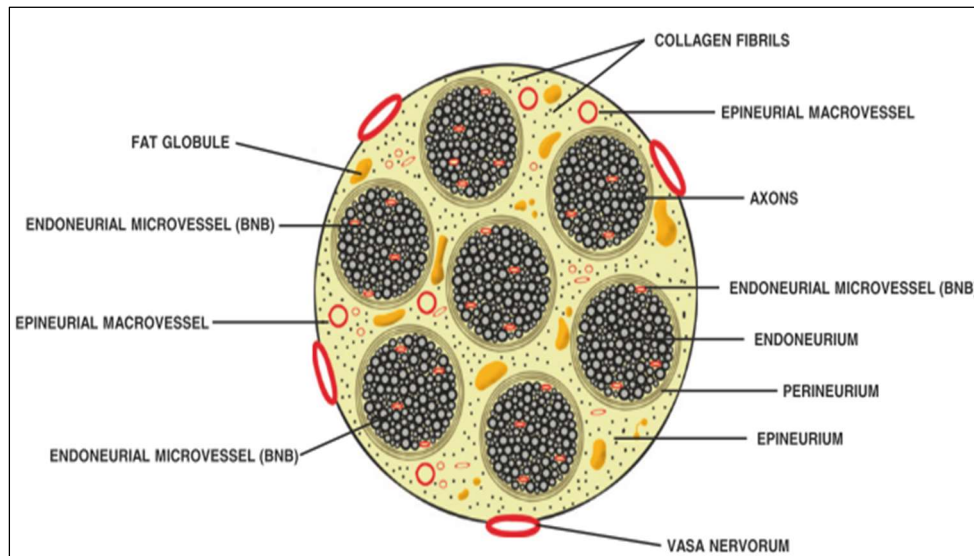


Figure 3: Coupe axiale microscopique d'un nerf périphérique (**Greathouse *et al.*, 2016**)

I-2-2-3. Myéline

➤ **Cellules gliales :** Les cellules de Schwann (CS) sont les cellules gliales les plus abondantes du SNP (**Lobsiger *et al.*, 2002**), elles sont à l'origine de la formation de la gaine de myéline. Il existe différents types de ces cellules, les CS myélinisantes et non-myélinisantes. Les CS myélinisantes entourent les axones de gros calibre pour former une gaine de myéline, avec une relation axone/CS de 1 :1. Les CS non-myélinisantes ne forment pas de gaine de myéline mais entourent plusieurs axones de petit calibre (**Salzer, 2008**).

➤ **Gaine de myéline :** La gaine de myéline est une structure multilamellaire qui entoure la plupart des axones dans le SNP et le SNC des vertébrés (**Boiko and Winckler, 2006**). La myélinisation accélère la conduction nerveuse. La propagation de l'influx nerveux est continue et elle est ininterrompue dans les fibres non myélinisées. En revanche, dans les fibres myélinisées, la membrane excitable se trouve uniquement au niveau des nœuds de Ranvier, car la myéline a des propriétés isolantes électriques. La conduction nerveuse devient alors saltatoire, c'est-à-dire de nœud en nœud, ce qui permet d'atteindre des vitesses jusqu'à dix fois supérieures (**Rigoard and Lapierre, 2009**). Lors de la myélinisation, l'axone périphérique est recouvert au niveau d'un internode par le cytoplasme de CS avoisinantes (**Scherer and Arroyo, 2014**). La majeure partie de la composition de cette myéline est constituée de lipides (environ 70%), tels que les

sphingomyélines, ainsi que de certaines protéines spécifiques, notamment les protéines de myéline P0 (protéine zéro de la myéline), PMP22 (protéine périphérique de la myéline 22), MBP (protéine basique de la myéline) et MAG (glycoprotéine associée à la myéline), qui jouent un rôle important dans la structure de la gaine **(Boiko and Winckler, 2006)**.

➤ **Nœuds de Ranvier** : La zone transitionnelle séparant deux segments myélinisés est appelée nœud de Ranvier (N). Au niveau des N du SNP, on trouve des microvillosités émanant des CS qui entrent en contact avec l'axolemme nodal (fine membrane entourant l'axone d'une fibre nerveuse) **(Rasband and Peles, 2016)**. Ces microvillosités contribuent à l'agrégation des canaux sodiques voltage-dépendants (Na⁺) et potassiques voltage-dépendants (K⁺) au niveau des N. La propagation des potentiels d'action dépend de la dépolarisation et de la repolarisation rapides de l'axolemme **(Devaux et al., 2004)**.

I-2-3. Physiologie du nerf périphérique

Le nerf périphérique est une structure qui ressemble à un "câble" et permet le transport des axones des neurones moteurs, sensitifs et végétatifs du SNP. Il transporte l'information dans les deux sens entre ces neurones et leurs effecteurs, tels que les récepteurs sensitifs, les muscles squelettiques et les viscères. Les afférences qui se dirigent vers la périphérie correspondent au contingent moteur du nerf, tandis que les efférences qui remontent de la périphérie et qui transportent les informations vers le SNC correspondent au contingent sensitif du nerf. Les caractéristiques intrinsèques du nerf ont une influence sur les propriétés des influx nerveux qui transmettent l'information **(Rigoard and Lapierre, 2009)**.

I-2-4. Nerf sciatique

I-2-4-1. Anatomie du nerf sciatique

Le NS est formé dans le bassin par la jonction des ramifications ventrales des racines du NS L4-S3. D'une largeur de 2cm, il quitte le bassin par le grand foramen sciatique sous le piriforme et descend entre le grand trochanter et la tubérosité ischiatique dans la région fessière. Le nerf se divise ensuite en deux branches terminales au niveau de l'angle supérieur du creux poplité: le nerf péronier commun et le nerf tibial. Il s'agit d'un nerf mixte contenant à la fois des fibres motrices et sensitives. Les branches motrices alimentent la loge postérieure des muscles de la cuisse ainsi que l'articulation de la hanche

et du genou, tandis que les branches sensorielles alimentent l'ensemble des régions du tibia et du pied, à l'exception de la région tibiale antéro-médiale et du bord médial du pied (Adibatti and Sangeetha, 2014).

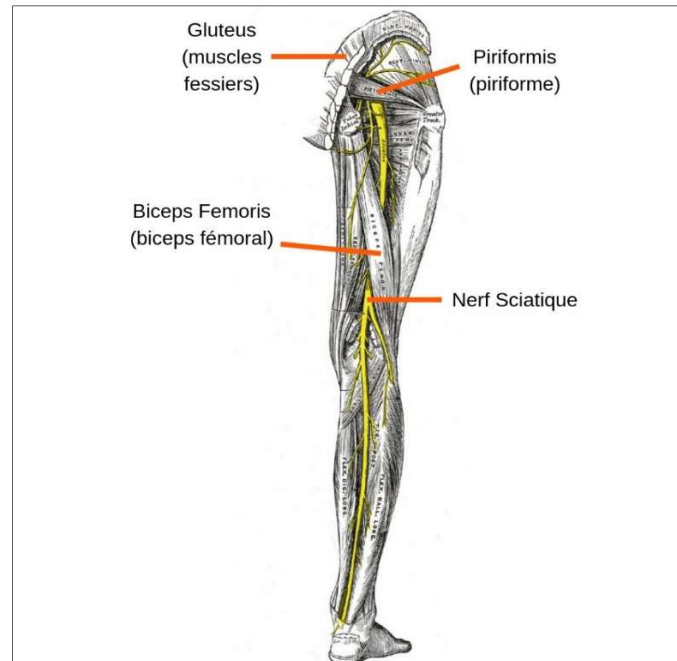


Figure 4: Anatomie du nerf sciatique (Adibatti and Sangeetha, 2014)

I-3. Neuropathies périphériques

I-3-1. Etiologie

Les neuropathies, également connues sous le nom de lésions nerveuses périphériques (LNP), sont des traumatismes courants qui touchent environ 300 000 patients en Europe et 200 000 aux États-Unis chaque année (Ichihara *et al.*, 2008). Bien que le SNP possède des capacités de régénération spontanée supérieures à celles du SNC, une récupération complète n'est constatée que pour les lésions les moins graves. Les conséquences des LNP dépendent du type de lésion (compressions, section, lacération, élongation), de leur emplacement (par rapport au soma du neurone) ainsi que de leur gravité (Richner *et al.*, 2011). Les lésions des nerfs périphériques sont principalement causées par des accidents de la route, la résection de tumeurs, les interventions orthopédiques, l'aspiration intraveineuse et les chirurgies esthétiques du visage (Ichihara *et al.*, 2008).

I-3-2. Grades de sévérité des lésions

I-3-2-1. Classification de Seddon

La première classification des LNP a été présentée par Seddon en 1943 (Seddon, 1947). Dans cette classification, trois niveaux ont été définis (Caillaud *et al.*, 2018):

➤ Neurapraxie : Elle se caractérise par un blocage de la conduction nerveuse sans aucune atteinte neuronale. La lésion affecte uniquement la gaine de myéline et se limite à la zone touchée. Ce type de lésion est généralement causé par une compression ou un étirement excessif du nerf (Campbell, 2008). Du point de vue clinique, cette condition se manifeste par une perte temporaire de fonction, mais une récupération complète et spontanée est généralement constatée (Walsh and Midha, 2009).

➤ Axonotmésis : Elle se caractérise par une interruption totale de l'axone nerveux et de la gaine de myéline qui l'entoure, tout en préservant les structures mésenchymateuses environnantes telles que le périnévre et l'épinévre (Burnett and Zager, 2004). Bien que la perte de fonction et la récupération soient plus lentes que dans le cas de la neurapraxie, la guérison est habituellement complète (Caillaud *et al.*, 2018).

➤ Neurotmésis : Représente la situation la plus sévère, caractérisée par une section totale des trois structures du nerf (endonévre, périnévre et épinévre), entraînant une interruption complète de la conduction nerveuse. À ce stade, une récupération complète n'est plus possible et seul un traitement chirurgical peut offrir une récupération partielle (Burnett and Zager, 2004).

I-3-2-2. Classification de Sunderland

Après quelques années, Sunderland a perfectionné cette classification en la divisant en cinq étapes distinctes (figure 5) (S, 1951). Les lésions sont alors classées selon la répartition suivante :

➤ Premier degré : identique à la neurapraxie de Seddon (Burnett and Zager, 2004)

➤ Deuxième degré : identique à l'axonotmésis de Seddon (Burnett and Zager, 2004)

➤ Troisième degré : résulte d'un traumatisme plus grave, qui, en plus de provoquer une rupture axonale, perturbe la structure interne des faisceaux nerveux (S,

1951). Ce stade est caractérisé par des lésions des tubes endoneuraux (Caillaud *et al.*, 2018).

➤ Quatrième degré : toutes les parties du nerf sont perturbées sauf l'épinèvre qui reste intact. La récupération n'est possible qu'avec une intervention chirurgicale (Burnett and Zager, 2004).

➤ cinquième degré : Correspond au neurotmésis, Dans ce type de lésion, il y a une perte totale de la continuité du tronc nerveux (Caillaud *et al.*, 2018).

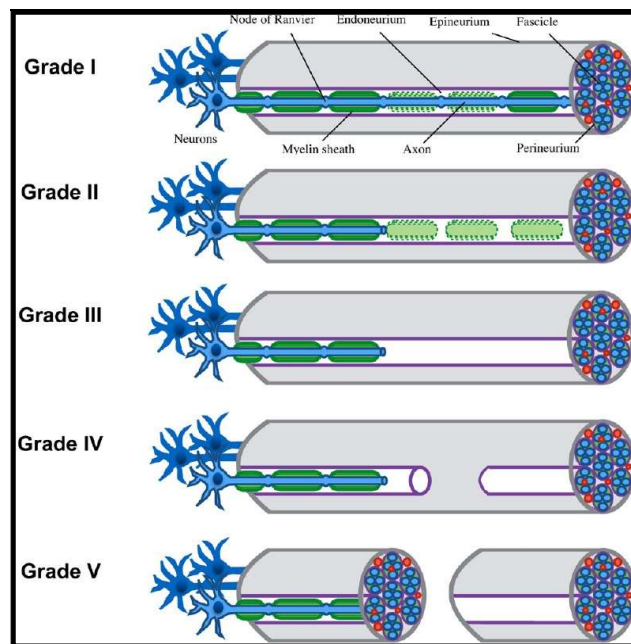


Figure 5: Classification des LNP (Caillaud *et al.*, 2018)

I-3-3. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régénération nerveuse

I-3-3-1. Dégénérescence Wallerienne

La dégénérescence Wallerienne, terme qui regroupe les changements observés en aval de la lésion, elle a été décrite pour la première fois en 1850 par Augustus Volney Waller (Yan, 2020). La dégénérescence Wallerienne est une forme unique et structurée de la dégénérescence de l'axone, Au cours des premiers stades de la dégénérescence Wallerienne, des débris axonaux et de myéline sont produits. Les macrophages résidents dans le tissu nerveux se différencient ensuite en macrophages activés capables de phagocyter les débris cellulaires (Caillaud *et al.*, 2018). Les CS sont également

responsable de cette élimination ce qui permet une action rapide et prolongée (**Perry and Brown, 1992**). Lorsque les axones du rameau distal sont séparés de leur soma, cela déclenche la dégénérescence Wallerienne au niveau de la lésion (**Guertin et al., 2005**). Lorsque l'axone perd son contact avec la myéline, cela entraîne une dédifférenciation des CS (**Hung et al., 2015**). Celles-ci éliminent les débris de myéline, prolifèrent et forment les bandes de Büngner. Ces bandes ont pour fonction de guider la repousse axonale en reliant les extrémités proximale et distale (**Yan, 2020**).

I-3-3-2. Régénération axonale

Après une lésion nerveuse, la régénération axonale commence à partir du nœud de Ranvier le plus éloigné de la blessure. Environ 50 à 100 pousses axonales émergent de ce point et se transforment en cônes de croissance. Ces derniers s'allongent en réponse à des signaux provenant des tissus environnants et des récepteurs moteurs et sensoriels endommagés (facteurs neurotrophiques et neurotropes) (**Grinsell and Keating, 2014**). Le cône de croissance libère également des protéases pour faciliter la régénération axonale à travers les tissus. De nombreux prolongements axonaux s'étendent à partir du cône de croissance jusqu'à ce qu'ils se connectent à un récepteur. Ensuite, un élagage axonal se produit, ne laissant que les neurites restants (figure 6). Si un récepteur ou un tube endoneurial n'est pas atteint, les branches du cône de croissance continuent de croître de manière désorganisée, produisant un névrôme, qui peut se manifester cliniquement sous la forme d'une masse douloureuse (**Siemionow and Brzezicki, 2009**).

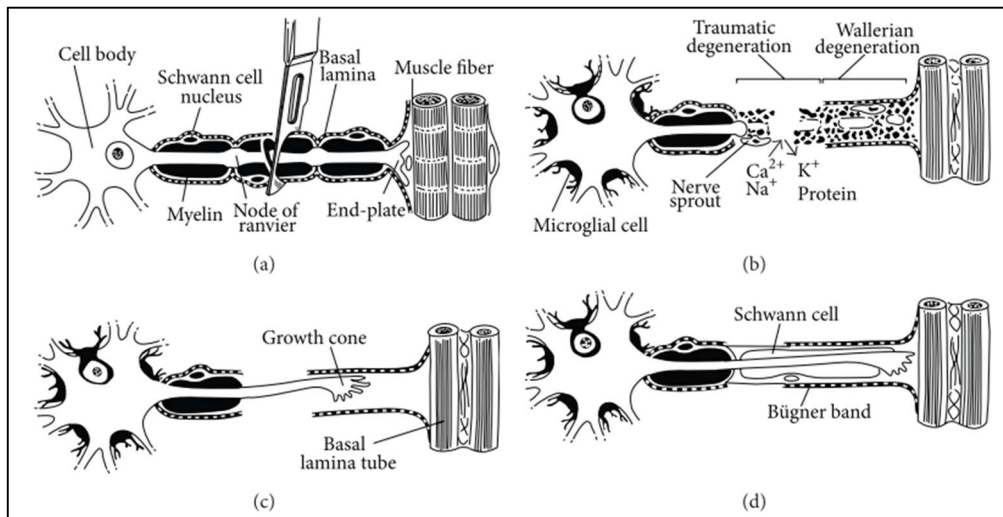


Figure 6: Dégénérescence et régénération suite à une lésion du nerf périphérique. (a) correspond à une lésion axonale, (b) dégénérescence Wallerienne, (c) formation du cône de croissance, (d) régénération axonale (Grinsell and Keating, 2014)

I-4. Stress oxydant et lésions nerveuses

I-4-1. Stress oxydant

Dans des conditions physiologiques normales, il existe un équilibre parfait entre la production des ERO et les systèmes de défense antioxydants. En effet, les ERO peuvent jouer un rôle physiologique important, comme dans le processus de phagocytose des bactéries par les cellules polymorphonucléaires (Swain *et al.*, 2002). Cependant, un stress oxydant peut se produire lorsque le déséquilibre entre les antioxydants et les pro-oxydants est en faveur de ces derniers. Ce déséquilibre peut être causé par plusieurs facteurs tels qu'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), l'activation des systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), ou l'oxydation de certaines molécules telles que le glucose, l'hémoglobine et les catécholamines. En outre, une alimentation pauvre en antioxydants peut également contribuer à l'apparition d'un stress oxydant (Pincemail *et al.*, 2002).

I-4-2. Définition d'un radical libre

Il y a moins de 50 ans, la présence de radicaux libres (RL) a été mise en évidence dans les composés biologiques (Dröge, 2002). Les RL sont des molécules qui présentent

un ou plusieurs électrons non appariés dans leurs orbitales atomiques ou moléculaires ce qui leur confère une réactivité importante (Valko *et al.*, 2007). Il existe différentes espèces radicalaires qui peuvent se former dans les cellules, mais certaines jouent un rôle particulier en physiologie et sont appelées radicaux primaires. Les autres RL, connus sous le nom de radicaux secondaires, sont créés lorsque les radicaux primaires réagissent avec des composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires sont générés à partir de l'oxygène par une réduction d'un électron, comme c'est le cas pour l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$, le radical hydroxyle OH^{\bullet} et le monoxyde d'azote NO^{\bullet} qui provient de l'azote (figure 7). Certaines espèces dérivées de l'oxygène, telles que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas considérées comme des RL, elles sont dites réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. Dans l'ensemble, les RL et leurs précurseurs sont souvent appelés ERO (Favier, 2003).

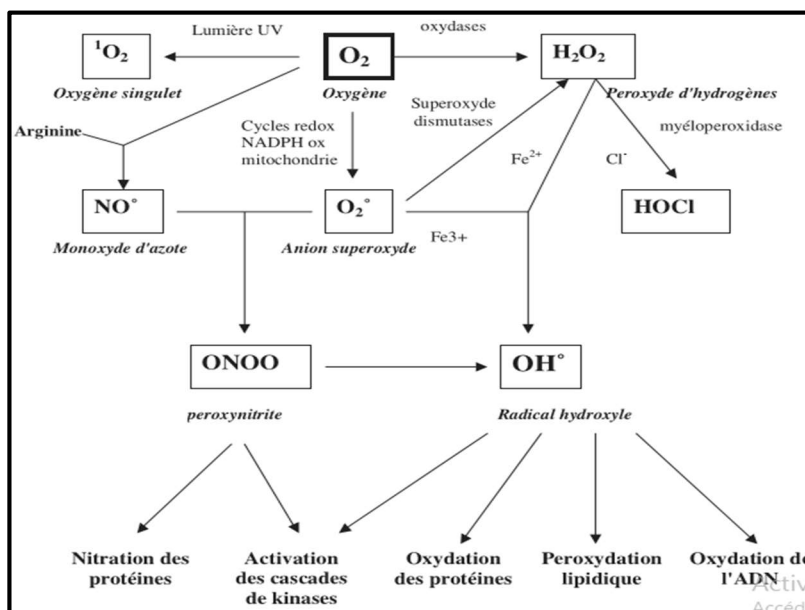


Figure 7: Sources des radicaux libres oxygénés et des espèces réactives de l'oxygène dans les processus biologiques (Favier, 2003)

I-4-3. Conséquences biochimiques du stress oxydant

L'excès de production de RL entraîne des dommages directs aux molécules biologiques, notamment l'oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides (Favier, 2003). Cependant, les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés

(AGPI) sont particulièrement vulnérables à l'attaque du radical hydroxyle. Cette réaction est connue sous le nom de peroxydation lipidique (Esterbauer *et al.*, 1992).

I-4-3-1. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un processus en chaîne, initié par le radical hydroxyle qui arrache un hydrogène des carbones situés entre deux doubles liaisons des AGPI (figure 8). Ensuite, ce radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène, produisant ainsi un radical peroxyde (ROO•) très réactif, qui peut arracher un hydrogène d'un AGPI voisin et ainsi propager la réaction. Cette réaction altère la fluidité membranaire, ce qui entraîne inévitablement la mort cellulaire. Les peroxydes produits peuvent être éliminés grâce à l'action de la glutathion peroxydase, ou ils peuvent poursuivre leur oxydation et se fragmenter en aldéhydes, tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal, qui sont connus pour favoriser le développement de l'athérosclérose en raison de leurs propriétés pro-athérogènes (Haleng *et al.*, 2007).

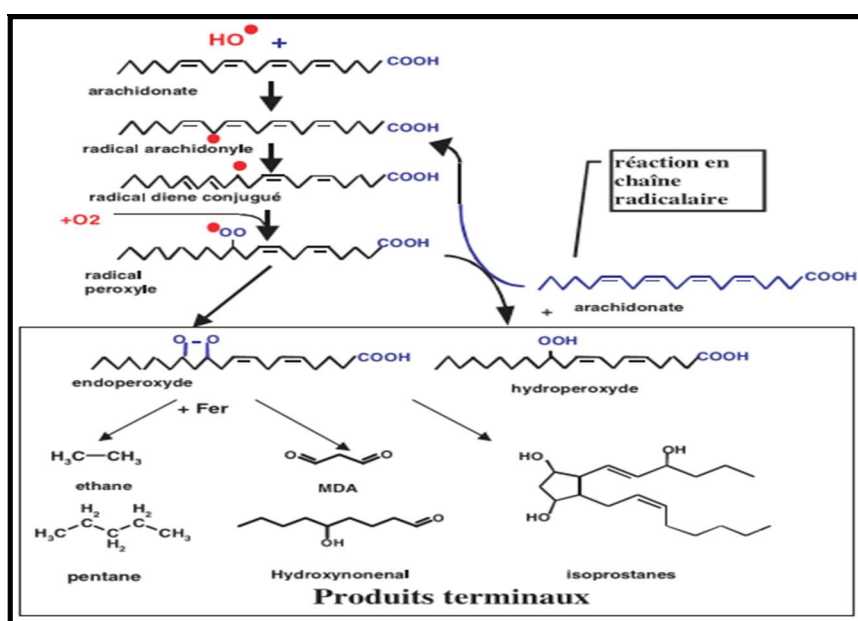


Figure 8: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003)

I-5. Mécanismes de défense antioxydants

L'organisme possède un système complexe de défenses antioxydantes (figure 9) pour se protéger contre les effets nocifs des ERO. Il existe deux sources d'antioxydants : ceux présents dans l'alimentation (fruits et légumes), tels que les vitamines C et E, les

caroténoïdes, l'ubiquinone, les flavonoïdes, le glutathion et l'acide lipoïque ; ceux produits par l'organisme tels que des enzymes comme la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase, des protéines telles que la ferritine, la transferrine, la céruléoplasmine et l'albumine, ainsi que des systèmes de réparation des dommages oxydatifs tels que les endonucléases. De plus, l'organisme utilise des oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc en tant que cofacteurs pour les enzymes antioxydantes (**Haleng et al., 2007**).

I-5-1. Systèmes de défense enzymatique

I-5-1-1. Superoxydes dismutases(SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines, qui jouent un rôle clé dans la défense initiale contre le stress oxydatif, éliminent les anions superoxyde (O_2^-) par une réaction de dismutation, transformant ainsi l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène (O_2) (figure9) (**Haleng et al., 2007**).

I-5-1-2. Glutathions peroxydases

La glutathions peroxydases (GPx) est une sélénoprotéine qui se compose de cinq isoformes différentes. Elle réduit les peroxydes en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme substrat (figure 9). Son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques qui résultent de l'oxydation des AGPI sous l'effet du stress oxydatif (**Haleng et al., 2007**).

I-5-1-3. Catalase

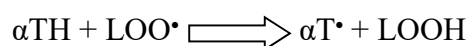
La catalase (CAT) est une enzyme capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2). Le H_2O_2 est un oxydant très réactif et peut causer des dommages aux cellules s'il s'accumule en quantités excessives (**Dröge, 2002**). La catalase est donc essentielle pour protéger les cellules contre les dommages oxydatifs en éliminant le (H_2O_2). Cette enzyme est particulièrement importante dans les cellules qui produisent de grandes quantités d'oxygène, telles que les globules rouges et les cellules hépatiques (**Favier, 2003**).

*I-5-2. Systèmes de défense non enzymatique**I-5-2-1. Vitamine C*

La plupart des mammifères ont la capacité de produire cette vitamine, sauf pour certains animaux et primates (y compris les humains). Ainsi, l'acide ascorbique, qui est crucial pour le bon fonctionnement de notre organisme, doit être obtenu à travers notre régime alimentaire (**Halliwell, 1994**). La vitamine C est principalement connue pour sa capacité de neutraliser les ERO telles que les radicaux hydroxyles (HO[•]) ou les radicaux superoxydes (O₂^{•-}) (figure 9). De plus, la vitamine C peut inhiber la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de sa forme radicalaire produite lors de la réaction avec les radicaux lipidiques (**Haleng et al., 2007**), Plus précisément en réduisant le radical tocophéroxyle de la vitamine E (αT[•]), permettant ainsi à cette dernière de fonctionner à nouveau comme un antioxydant brisant la chaîne des RL (**Halpner et al., 1998**). Cependant, en présence d'ions de métaux de transition tels que le fer et le cuivre, l'ascorbate peut se comporter comme un pro-oxydant, agissant comme un agent réducteur et générant des anions superoxyde (O₂^{•-}), du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des radicaux hydroxyles (OH[•]) (**Halliwell, 1994**).

I-5-2-2. vitamine E

La vitamine E est un micronutriment crucial pour le bon fonctionnement du corps humain. Les besoins quotidiens pour un adulte sont d'environ 12 mg. Les huiles végétales et les produits dérivés de ces huiles sont les principales sources alimentaires de vitamine E (**Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996**). La forme de vitamine E la plus couramment trouvée est l'α-tocophérol qui est une molécule liposoluble, c'est le piègeur de RL le plus important au sein des membranes et des lipoprotéines (figure 9). L'alpha-tocophérol (αTH) inhibe la peroxydation lipidique en capturant les radicaux peroxyde, qui sont les intermédiaires dans la réaction en chaîne.



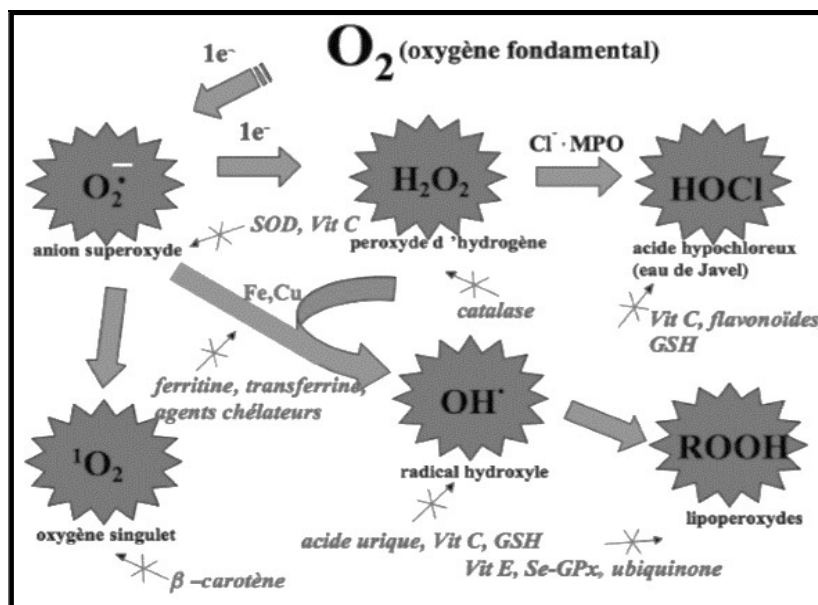


Figure 9: Vue d'ensemble des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des antioxydants régulant leur production (Haleng *et al.*, 2007)

I-6. Stress oxydatif dans les neuropathies périphériques

Bien que l'évaluation précise du rôle des RL dans les lésions nerveuses périphériques (LNP) soit difficile à ce jour, plusieurs études indiquent qu'ils sont impliqués dans les processus de régénération (Zhou *et al.*, 2016). Des études menées sur des rongeurs ont démontré qu'une lésion du nerf sciatique entraîne une augmentation des niveaux de H_2O_2 , une oxydation des lipides membranaires et une expression accrue d'enzymes antioxydantes telles que SOD1 et Gpx1 au niveau du muscle dénervé (Bhattacharya *et al.*, 2009). Après une axotomie, il se produit un influx rapide de calcium provenant du site de la lésion, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du calcium au niveau des rameaux proximaux et distaux de l'axone. Cette augmentation de calcium entraîne à son tour un gonflement des mitochondries et une production de H_2O_2 (Rodella *et al.*, 2016). En outre, une analyse par microarray a révélé une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le transfert d'électrons, en particulier du cytochrome P450, au niveau du rameau distal d'un nerf sciatique sectionné (Kubo *et al.*, 2002). Le H_2O_2 se diffuse ensuite à travers la membrane axonale et contribue à l'activation des cellules de Schwann (CS) avoisinantes pour favoriser la dégénérescence Wallerienne (Duregotti *et al.*, 2015). Il est bien établi que les EROs influencent également la myélinisation. Une démyélinisation, telle que celle observée

dans les cas de neurapraxie, entraîne une réduction de la production d'ATP mais, en revanche, une augmentation des niveaux de H₂O₂ au niveau des mitochondries des axones (van Hameren *et al.*, 2019).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II-1. Matériel

II-1-1. Equipement

Agitateur (VELP), bain-marie (BUNSEN), balance de précision (OHAUS), centrifugeuse (SIGMA), hotte (HSBP-180), rota-vapeur (BUCHI), sonicateur (SONICS), spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING), trousse à dissection (ciseaux, pinces, bistouri...), ultra turrax (IKA T10 basic), vortex (VELP), automate de déshydratation (LEICA TP1020), station d'enrobage (LEICA EG1150H), plaque réfrigérante (LEICA EG1150G), microtome (LEICA RM21125 RTS), plaque chauffante (LEICA HI1220), incubateur (BINDER), microscope assisté par ordinateur (LEICA DM1000LED), distillateur (NUVE), porte lames, histocassettes, moules pour inclusion-histologie.

II-1-2. Produits chimiques

Ethanol 96%, formol 10 %, chlorure de sodium (NaCl), alpha-tocophérol (vitamine E), Acide ascorbique (vitamine C), polyéthylène glycol (PEG), chlorure de potassium (KCl), acide chlorhydrique (HCl), acide thiobarbiturique (TBA), acide trichloroacétique (TCA), persulfate de potassium (K₂S₂O₈), acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), eau distillée (H₂O), xylène, paraffine, hématoxyline, éosine.

La plupart des solvants et acides utilisés dans cette étude proviennent principalement de la marque SIGMA et BIOCHEM.

II-1-3. Echantillons biologiques

Notre étude a été portée sur les nerfs sciatiques provenant des cuisses des poulets de chair.

II-1-3-1. Choix de l'organe d'étude

Le nerf sciatique est largement privilégié dans les recherches portant sur les LNP chez différents animaux, tels que le rat, la souris, le lapin, les modèles animaux plus grands ou encore les espèces non mammifères. Cette préférence s'explique par plusieurs facteurs tels que la taille considérable du nerf, sa composition mixte en fibres sensorielles et motrices, ainsi que sa facilité d'évaluation chirurgicale (Li *et al.*, 2021).

II-1-3-2. Choix du poulet

Le poulet est un animal d'élevage couramment utilisé dans l'industrie alimentaire, ce qui le rend relativement facile à obtenir. Les poulets sont généralement moins coûteux

à acheter et à entretenir par rapport à d'autres modèles animaux plus grands ou moins accessibles. En outre, les poulets partagent de nombreuses similitudes anatomiques et physiologiques avec les mammifères y compris les humains. Leur système nerveux, leurs organes et leurs tissus présentent des caractéristiques comparables, ce qui le rend un bon modèle pour étudier divers aspects de la biologie, de la pathologie et des réponses aux traitements.

II-2. Méthodes

II-2-1. Extraction du nerf sciatique

Nous avons procédé à une dissection de sept (07) poulets pour chacun des trois essais effectués, afin de prélever le nerf sciatique (figures 10.a et 10.b). Ce dernier a été placé dans une boîte de Pétri contenant du NaCl (milieu physiologique) afin de le maintenir hydraté (figure 10.c). Les nerfs de chaque cuisse de poulet ont été conservés dans deux tubes distincts, un tube témoin et un tube traité.

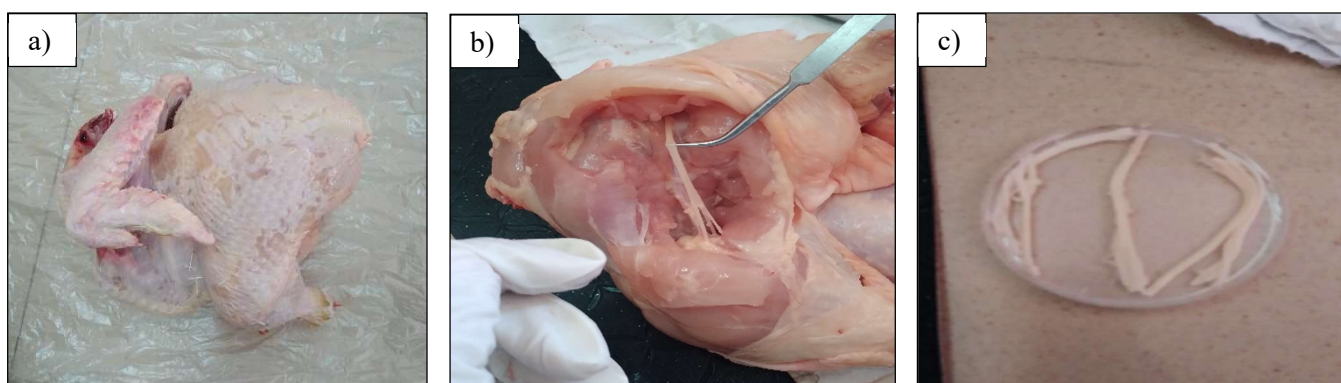


Figure 10 : Photographie originale de l'extraction du nerf sciatique chez le poulet. (a) dissection du poulet, (b) extraction du nerf sciatique et (c) récupération du nerf sciatique dans du NaCl.

II-2-2. Conservation du nerf sciatique

II-2-2-1. Préparation de la solution de conservation

a. Encapsulation de la vitamine E dans le PEG

Le but de cette encapsulation consiste à rendre la Vit E soluble dans l'eau. Pour ce faire, une quantité de PEG a été mélangée dans de l'éthanol à 96%. Ensuite, une quantité de la vitamine E a été ajoutée au milieu et laisser sous agitation pendant 20 minutes. Enfin,

la poudre de vit E a été obtenue après évaporation à l'aide d'un rota-vapeur (Fatmi *et al.*, 2022).

b. Préparation de la solution de vitamines

La solution des vitamines a été préparée dans de l'eau physiologique à une concentration de 1 mg/ml de Vit C et de 0,25 mg de Vit E qui a été encapsulée dans du PEG.

La solution contenant les vitamines a été répartie dans des tubes opaques tandis que les tubes témoins (sans vitamines) ont été remplis avec de l'eau physiologique.

II-2-2-2. Etude de l'effet protecteur des vitamines sur le nerf sciatique

Afin de déterminer l'effet protecteur des vitamines, les nerfs de chaque cuisse de poulet ont été conservés dans deux tubes distincts. L'un des tubes contient la solution de Vit E + Vit C, tandis que l'autre tube sert comme témoin (NaCl). Puis les échantillons ont été conservés séparément à 4° C pendant 1 jour, 2 jours, 3 jours, 4 jours, 5 jours, 6 jours et 7 jours (figure 11).

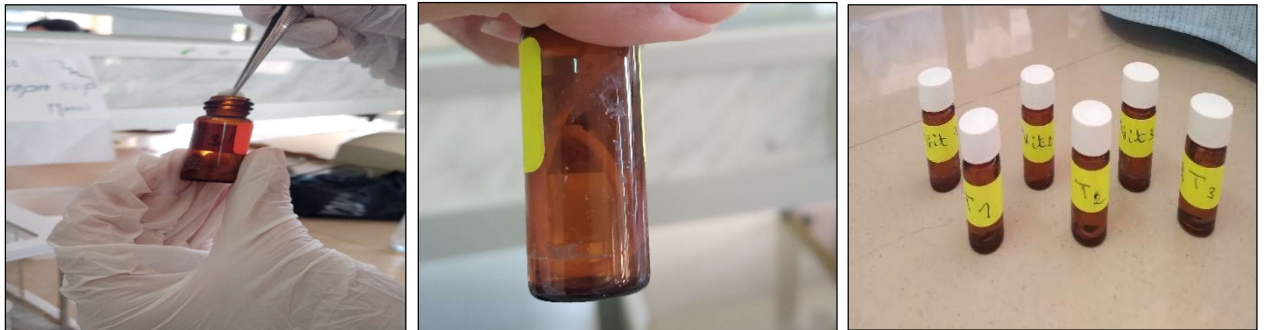


Figure 11: Photographie originale montrant les étapes de conservation du nerf sciatique dans deux milieux de conservation distincts (solution de VitE+VitC et solution du NaCl (témoin)).

II-2-3. Préparation des échantillons pour l'étude du stress oxydant

II-2-3-1. Récupération des milieux de conservation

Les milieux de conservation des nerfs (traités ou sans traitement) ont été récupérés dans des tubes distincts à fin de réaliser les tests du stress oxydant.

II-2-3-2. Préparation des homogénats

Les nerfs contrôles et traités avec les vitamines ont été pesés et broyés dans une solution de KCl (1,15%). Ensuite, les tissus ont été finement broyés en utilisant un ultraturax (figure12.a). Une sonication des homogénats a été réalisée en utilisant un sonicateur avec une amplitude de 53% pendant 30 secondes (figure 12.b), cette étape permet de fragmenter davantage les particules d'homogénat. Enfin, les échantillons obtenus ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 15min (à froid) puis conservés à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation (figure12.c).

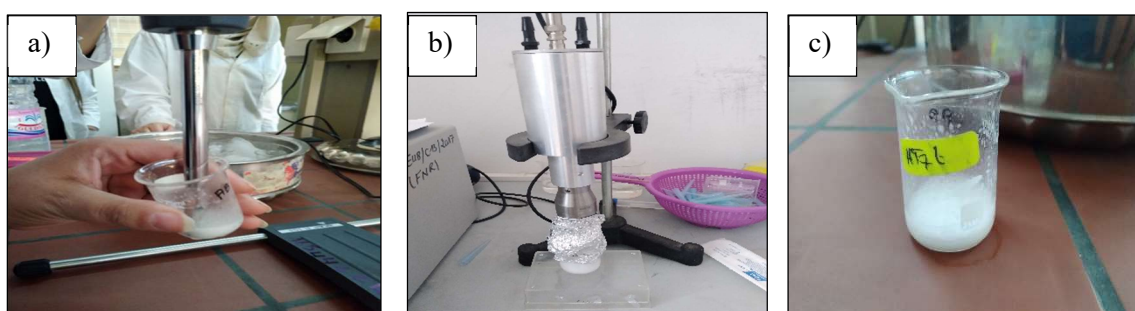


Figure 12 : Photographie originale des étapes d'homogénéisation du nerf sciatique. (a) étape de broyage, (b) étape de sonication et (c) homogénat prêt à utiliser

II-2-4. Dosage des marqueurs du stress oxydant

II-2-4-1. Principe du dosage des malondialdéhydes

La méthode d'évaluation de la peroxydation lipidique consiste à mesurer le malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Buege et Aust (1978). Le MDA est un produit final de dégradation des acides gras polyinsaturés (AGPI) qui se forme sous l'effet des RL engendrés lors d'un stress oxydant. Cette méthode consiste à faire réagir une molécule de MDA avec deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100°C) pour former un complexe coloré rose dont la lecture se fait à une longueur d'onde de 532 nm. Le principe de cette méthode est synthétisé ainsi (Buege and Aust, 1978) (figure13).

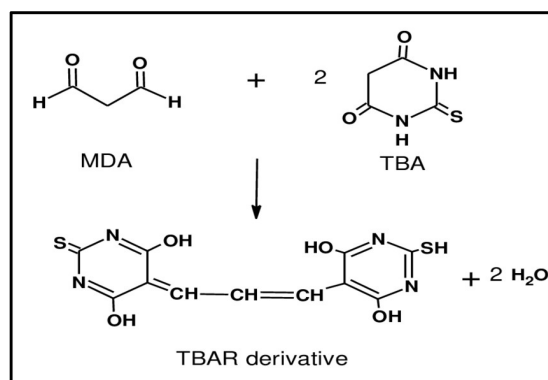


Figure 13: Principe du dosage du Malondialdéhyde (MDA)
(Buege and Aust, 1978)

II-2-4-2. Mode opératoire

Un volume de la solution TTH (TCA, TBA, HCl) a été mélangé avec l'échantillon. Ensuite, le mélange a été incubé dans un bain-marie à une température de 95°C pendant une heure. Après refroidissement, les mélanges ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 20 minutes. Les surnageants ont été récupérés et une mesure des absorbances a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre en utilisant une longueur d'onde de 532 nm (Buege and Aust, 1978).

II-2-5. Evaluation du statut antioxydant total

L'estimation du statut antioxydant total (SAT) est réalisée en utilisant le test ABTS.

II-2-5-1. Principe

Le principe de cette méthode repose sur la capacité d'une molécule à réduire le radical cationique ABTS⁺ en ABTS. Ce radical ABTS⁺ est stable et de couleur bleu-vert. Il est généré la veille du test par la réaction entre une solution d'ABTS (7mM) et une solution de persulfate de potassium (2,45Mm) préalablement préparée. Pendant le test, les antioxydants présents dans l'échantillon réduisent la concentration d'ABTS⁺ qui peut être mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 734 nm (Stämpfli et al., 2007).

II-2-5-2. Mode opératoire

Un millilitre de la solution ABTS⁺ diluée a été mélangé avec 10 µl de l'échantillon, puis le mélange a été incubé pendant 6 minutes à l'obscurité. La mesure des absorbances

a été effectuée à une longueur d'onde de 734 nm. Le pourcentage du SAT a été déterminé en utilisant l'équation suivante : $SAT (\%) = 100 - \left[\frac{Abs \text{ échantillon} \times 100}{Abs \text{ ABTS}} \right]$

II-2-6. Etude histologique

L'examen histologique a été effectué au sein du service anatomopathologique de la faculté de médecine de l'université de Bejaia.

Trois échantillons distincts sont soumis à une étude histologique standard à savoir le nerf sciatique à temps initial (T0), le nerf sciatique conservé dans une solution de VitE+VitC pendant 4 jours (T4 vit) ainsi que son témoin (T4 témoin). Pour cela, différentes étapes ont été réalisées pour réussir le protocole de l'étude histologique (Hould, 1984) :

II-2-6-1. Fixation

La fixation a été réalisée en utilisant le formol à 10% pendant 48h, son but est de préserver la morphologie cellulaire et les composants cellulaires, tout en évitant l'autolyse. Cette étape de fixation doit être réalisée immédiatement après le prélèvement.

Pour commencer, les nerfs sciatiques sont d'abord immergés dans de l'éosine afin de les colorer en rose, ce qui facilite leur repérage et leur manipulation. Chaque fragment d'échantillon est placé dans une histocassette (figure 14) contenant des informations spécifiques sur l'échantillon, telles que le nom et la position (longitudinale ou transversale).



Figure 14: Photographie originale de la préparation des histocassettes

II-2-6-2. Déshydratation

La déshydratation a pour objectif de retirer le fixateur et l'eau présents dans les tissus, afin de les préparer pour l'étape suivante d'inclusion (imprégnation) dans la paraffine. La paraffine, étant hydrophobe et non miscible dans l'eau, nécessite une déshydratation préalable des échantillons fixés pour occuper l'espace laissé par l'eau éliminée.

L'automate de déshydratation (figure 15) effectue automatiquement la déshydratation des échantillons pendant une durée de 11 heures et 27 minutes. Il est composé de 12 cuves en verre, dont 8 sont remplies d'éthanol à des concentrations croissantes allant de 70 à 100%. Deux cuves contiennent du xylène, tandis que les deux dernières sont remplies de paraffine.



Figure 15: Photographie originale de l'automate de déshydratation

II-2-6-3. Enrobage et préparation des blocs

L'enrobage des échantillons est une étape essentielle qui permet d'assurer un positionnement précis de l'échantillon dans le bloc de paraffine, et donc, sur la lame après la découpe. Cette étape est réalisée au moyen d'une station d'enrobage (figure 16) équipée d'un bain à cassettes chauffé à 60°C permettant ainsi de préserver les échantillons inclus en paraffine avant leur montage. La station est également dotée d'un réservoir de paraffine et d'un bac contenant les moules d'inclusion.



Figure 16: Photographie originale de la station d'enrobage

Dans cette étape, chaque échantillon est inclus dans un moule contenant de la paraffine chauffée. La paraffine est utilisée comme médium dans cette étude, agissant comme un support pendant le découpage ultérieur. L'organe spécifique est positionné dans le moule selon une position déterminée (figure 17), permettant ainsi de réaliser des coupes dans l'orientation souhaitée (longitudinale ou transversale). Cette orientation est choisie pour faciliter l'examen microscopique et permettre l'accès à toutes les structures recherchées.

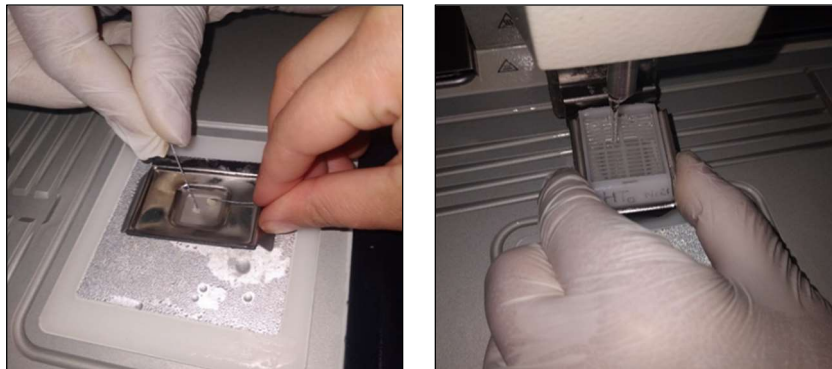


Figure 17: Photographie originale de l'enrobage de l'échantillon avec de la paraffine

Les moules contenant l'échantillon sont ensuite disposés sur une plaque réfrigérante pour faciliter le démoulage et obtenir des blocs (figure 18).



Figure 18 : Photographie originale de l'étape de démoulage et obtention des blocs

II-2-6-4. Réalisation des coupes histologiques et préparation des lames

Les coupes histologiques ont été réalisées en utilisant un microtome (figure 19). Avant de commencer le découpage, les blocs obtenus sont préalablement dégrossis au microtome avec une épaisseur de 15 μm afin de retirer l'excès de paraffine et d'atteindre l'organe inclus. Ensuite, des coupes de 4 μm d'épaisseur sont réalisées pour chaque échantillon.



Figure 19: Photographie originale de l'étape de réalisation des coupes histologiques

II-2-6-5. Etalement et déparaffinage des échantillons

Les rubans obtenus sont étalés dans un bain-marie sur des lames préalablement identifiées (figure 20). Ensuite, ces dernières sont placées le plus longtemps possible dans une étuve chauffée à 75°C pour leur déparaffinage.

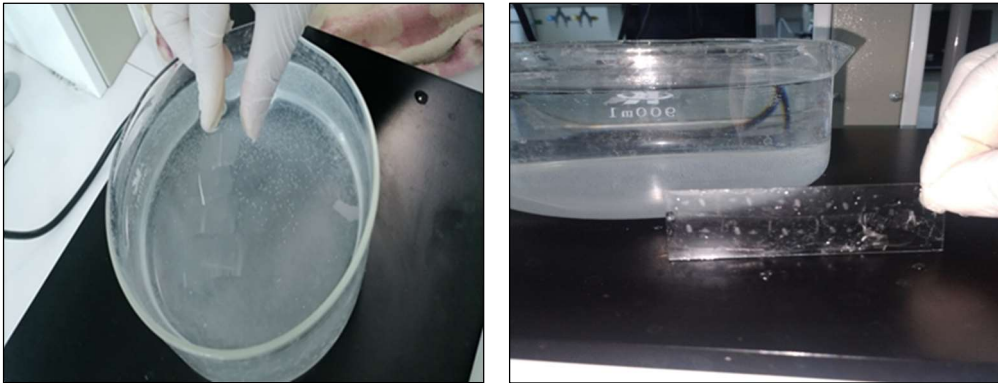


Figure 20: Photographie originale de l'étalement des coupes histologiques

Une fois l'incubation terminée, les lames sont plongées dans du xylène pendant une durée de 30 minutes afin d'éliminer les résidus de paraffine, puis trempées dans de l'éthanol pendant 10 minutes, et enfin dans de l'eau pendant 10 minutes pour la réhydratation de l'échantillon (figure 21).



Figure 21: Photographie originale de l'étape de déparaffinage des lames

II-2-6-6. Coloration

Cette étape a pour but de mettre en évidence certaines structures, cellules ou composants présents sur les lames et donc d'améliorer la visibilité des échantillons et faciliter l'observation microscopique. Dans cette étude, une coloration dite "de routine" est réalisée en utilisant deux colorants : l'hématoxyline et l'éosine. Afin de réaliser cette coloration, les lames sont immergées dans l'hématoxyline pendant une durée de 3

minutes, puis elles sont soigneusement rincées à l'eau. Ensuite, elles sont plongées dans de l'éosine pendant 1 minute, suivies d'un rinçage à l'eau (figure 22).

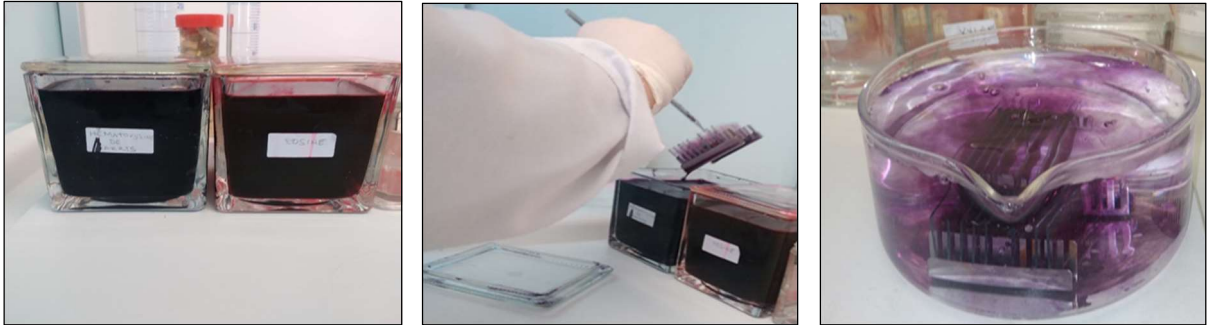


Figure 22: Photographie originale des étapes de coloration

II-2-6-7. Montage des lames

Avant de procéder au montage des lames, il est essentiel de les soumettre à une série de bains successifs d'éthanol, d'éthanol-xylène et de xylène. Cette étape vise à éliminer l'excès de colorants (hématoxyline, éosine) présents sur les lames, assurant ainsi une préparation optimale pour l'observation et la préservation des échantillons.

Pour le montage des lames, chacune de ces dernières est recouverte avec une lamelle à l'aide d'une colle spéciale dans le but de protéger l'échantillon contre les influences extérieures. Enfin, laisser sécher les lames avant de passer à l'observation.



Figure 23: Photographie originale de l'étape de montage et préparation des lames

II-2-6-8. Observations microscopique

Pour l'observation microscopique, un microscope optique de marque Leica équipé d'une caméra Leica MC170 HD a été utilisé. Les images capturées par cette caméra sont visualisées sur l'écran d'un ordinateur à l'aide du logiciel Leica Application EZ (LASEZ) (figure 24). Chaque échantillon est observé à différents niveaux de grossissement, notamment 4X, 10X, 20X, 40X et 100X, et plusieurs photos sont prises à chaque grossissement pour des analyses ultérieures. Cette approche permet une exploration détaillée des échantillons.

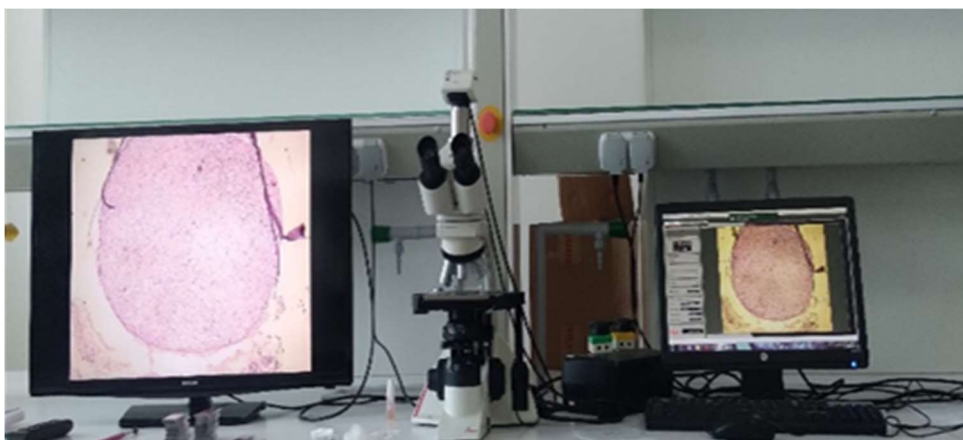


Figure 24: Photographie originale du matériel utilisé pour l'observation microscopique

II-2-7. Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5.3. Les résultats sont présentés comme moyenne \pm écart type ($n = 3$). Les valeurs sont données en * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Le test ANOVA two-way a été utilisé pour comparer la différence entre chaque groupe. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Chapitre III :

Résultats et

Discussion

III-1. Résultats

III-1-1. Evaluation *in vitro* de la peroxydation lipidique par le dosage des malondialdéhydes

Le MDA est un marqueur couramment utilisé pour évaluer le stress oxydant et la peroxydation lipidique qui sont des processus impliqués dans les dommages cellulaires, tandis que l'évaluation du potentiel d'inhibition du radical ABTS⁺ est utilisée pour estimer la capacité antioxydante totale (SAT) des échantillons. Ces mesures permettent d'évaluer l'effet protecteur de la combinaison des vitamines E et C contre les lésions du nerf sciatique notamment le stress oxydant et la peroxydation lipidique.

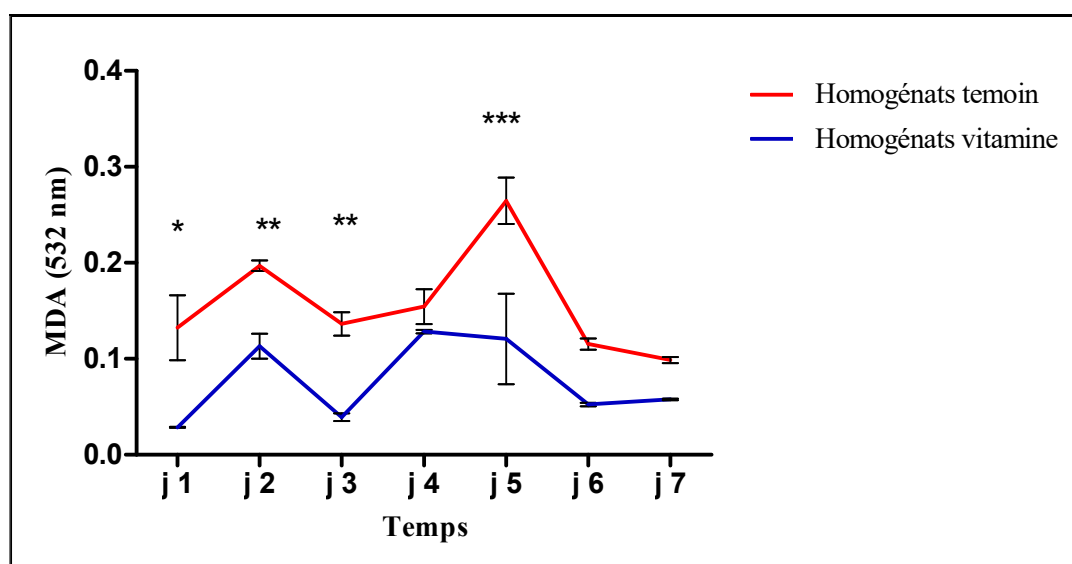


Figure 25: Effet protecteur de l'association VitE+VitC contre la peroxydation lipidique au niveau du nerf sciatique à différents temps. * : comparaison avec l'homogénat témoin. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La Figure 25 illustre l'effet protecteur de l'association VitE+VitC contre la peroxydation lipidique au niveau du nerf sciatique à différents temps d'incubation. Il est observé que le niveau des MDA, un produit de la peroxydation lipidique, mesuré à 532 nm, est élevé dans les homogénats témoins par rapport aux homogénats traités avec les vitamines (Vit E+ Vit C) tout au long des (7) jours de conservation. En effet, les résultats ont révélé un effet très significatif après le deuxième et le troisième jour de conservation ($*p < 0,05$) avec des valeurs de MDA ($0,113 \pm 0,013$ et $0,039 \pm 0,004$; respectivement) en comparaison au témoin qui sont respectivement de ($0,197 \pm 0,006$ et $0,136 \pm 0,012$). Aussi, une différence très significative

(*** $p < 0,001$) a été constatée après le cinquième jour de conservation ($0,121 \pm 0,0471$) en comparaison avec le témoin ($0,265 \pm 0,024$). Cependant, les résultats des quatrième, sixième et septième jours ne présentent pas de différences significatives ($p > 0,05$).

III-1-2. Evaluation *in vitro* du statut antioxydant total

Les résultats de la figure 26 représentent l'évolution de la capacité antioxydante totale dans les deux milieux de conservation du nerf sciatique à savoir le milieu témoin et le milieu vitamine en fonction du temps. Les résultats montrent que le statut antioxydant total dans les milieux vitamine est considérablement plus élevé qui est en moyenne de ($45,84 \pm 2,74$) que celui dans les milieux témoin ($21,41 \pm 1,17$) pendant les sept (7) jours de conservation. Les résultats présentent une signification très élevée pendant les six premiers jours de conservation (** $p < 0,001$), tandis qu'une différence significative est observée le septième jour de conservation ($*p < 0,05$).

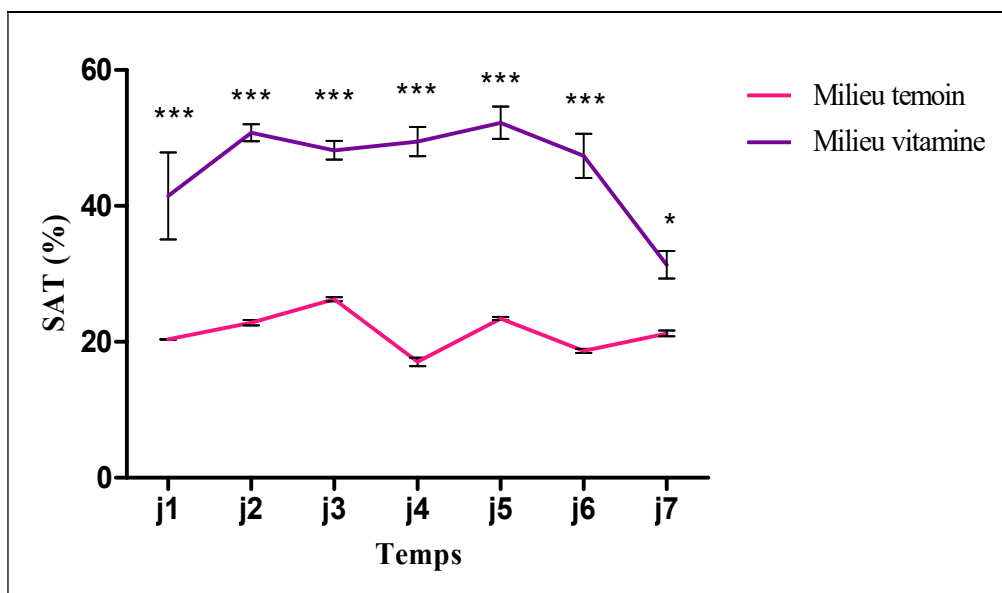


Figure 26: Evaluation de la capacité antioxydante totale des milieux de conservation du nerf sciatique en fonction du temps. * : comparaison avec le milieu témoin. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM des différentes expérimentations (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

III-1-3. Résultats de l'étude histologique

Suite à l'examen de toutes les images obtenues à différents niveaux de grossissement, nous avons sélectionné celles prises à un grossissement de 4X et de 20X, car elles sont les plus représentatives des échantillons.

Les coupes histologiques transversales au niveau du nerf sciatique témoin (T4) révèlent une atrophie et un début de disparition des fibres myélinisées, observée dans certains endroits du nerf (figures 27.b et 28.b). Cependant, le nerf sciatique à T0 présente des fibres myélinisées abondantes et clairement visibles et intactes (figures 27.a et 28.a). En outre, au niveau du nerf sciatique incubé pendant 4 jours en présence des vitamines T4 (figures 27.c et 28.c), une morphologie de ce tissu est quasiment similaire à celle du nerf à T0. Des différences importantes sont observées entre le nerf sciatique témoin à T4 et le nerf sciatique vitamine à T4, notamment en ce qui concerne la présence ou l'absence des fibres myélinisées.

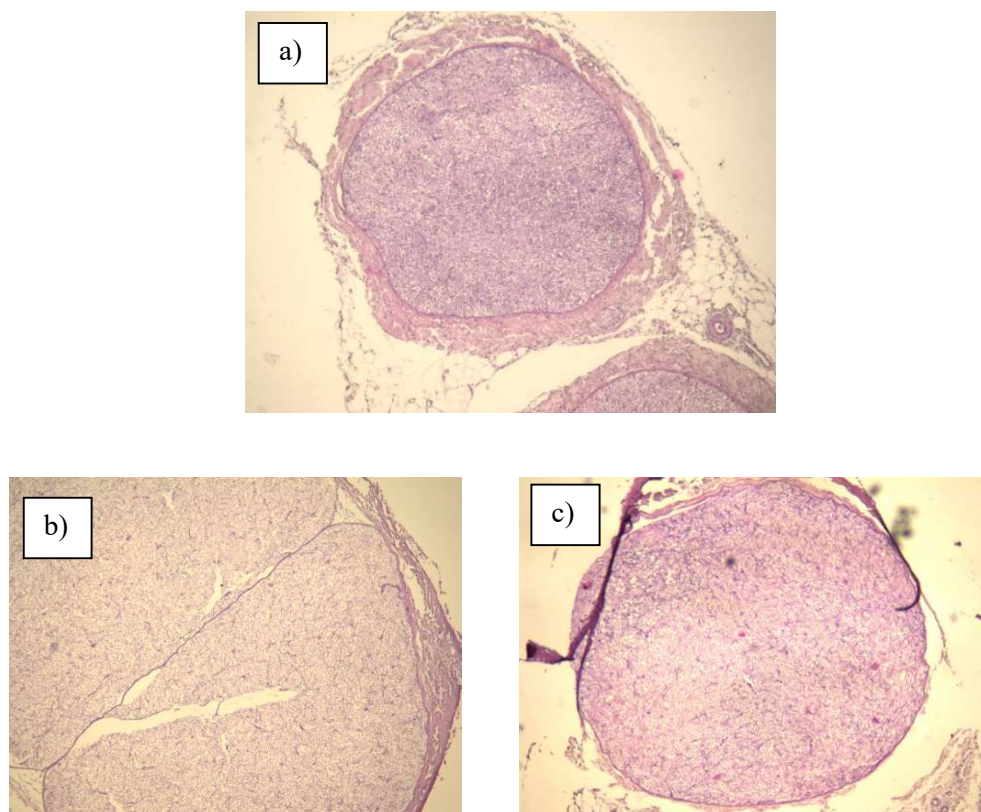


Figure 27: Photographie originale des coupes histologiques transversales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées au grossissement 4X. (a) T0, (b) T4 témoin et (c) T4 vitamine.

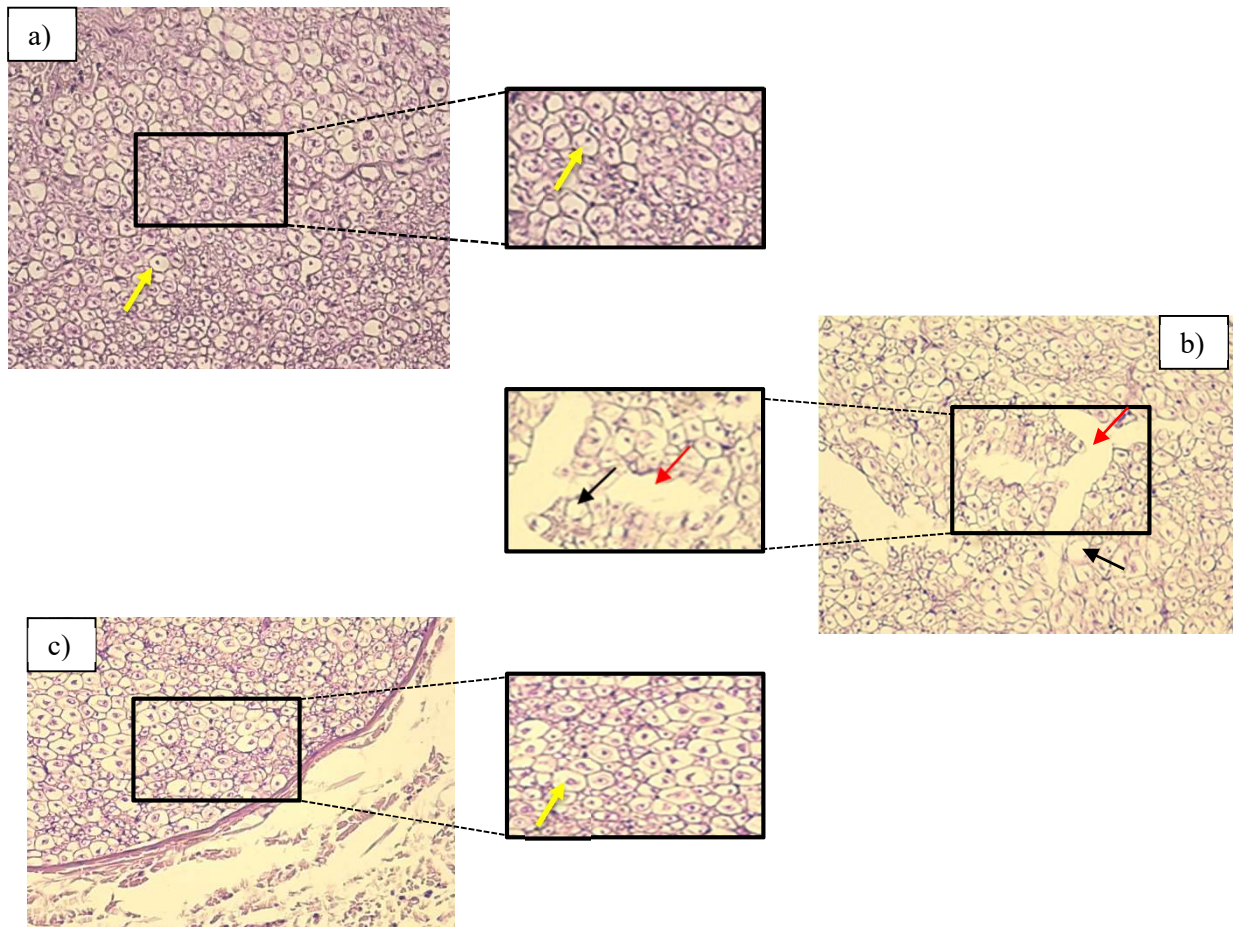


Figure 28: Photographie originale des coupes histologiques transversales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées sous microscope au grossissement 20X. (a) T0, (b) T4 témoin et (c) T4 vitamine. Les flèches noires indiquent des fibres nerveuses démyélinisées, les flèches rouges indiquent une disparition des fibres myélinisées et les flèches jaunes indiquent fibres nerveuses myélinisées

Les coupes longitudinales révèlent une interruption de la continuité des fibres nerveuses dans certains endroits du nerf sciatique témoin T4 (figure 29.b). Néanmoins, le nerf sciatique T0 présente une continuité constante des fibres nerveuses (figure 29.a). Aussi, les résultats montrent une conservation de l'épinévre dans le nerf sciatique T0 et T4 vitamine (figure 29.a et c) et sa disparition dans le nerf sciatique T4 témoin (figure 29.b) ce qui indique la dégradation du nerf.

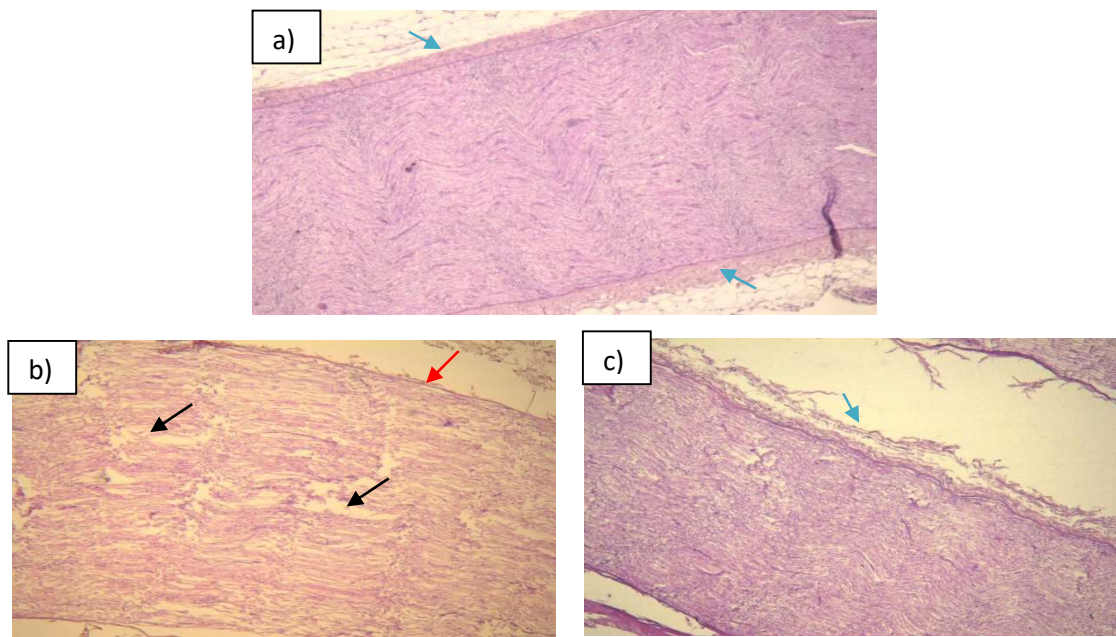


Figure 29: Photographie originale des coupes histologiques longitudinales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées sous microscope grossissement 4X. (a) T0, (b) T4 témoin et (c) T4 vitamine. Les flèches noires indiquent la discontinuité des fibres nerveuses, les flèches bleues indiquent un épinevres intact, la flèche rouge indique une disparition de l'épinevres.

Par ailleurs, dans le cas du nerf sciatique T4 vitamine, on remarque une préservation de la morphologie du nerf qui est similaire à celle du nerf sciatique T0 qui se manifeste par diminution de la discontinuité des fibres nerveuses (figure 29.c) et une clarté visible des cellules de Schwann (figure 30.c). Des différences importantes sont observées entre le nerf sciatique T4 témoin et le nerf sciatique T4 vitamine, notamment en ce qui concerne la continuité des fibres nerveuses et la présence des cellules de Schwann.

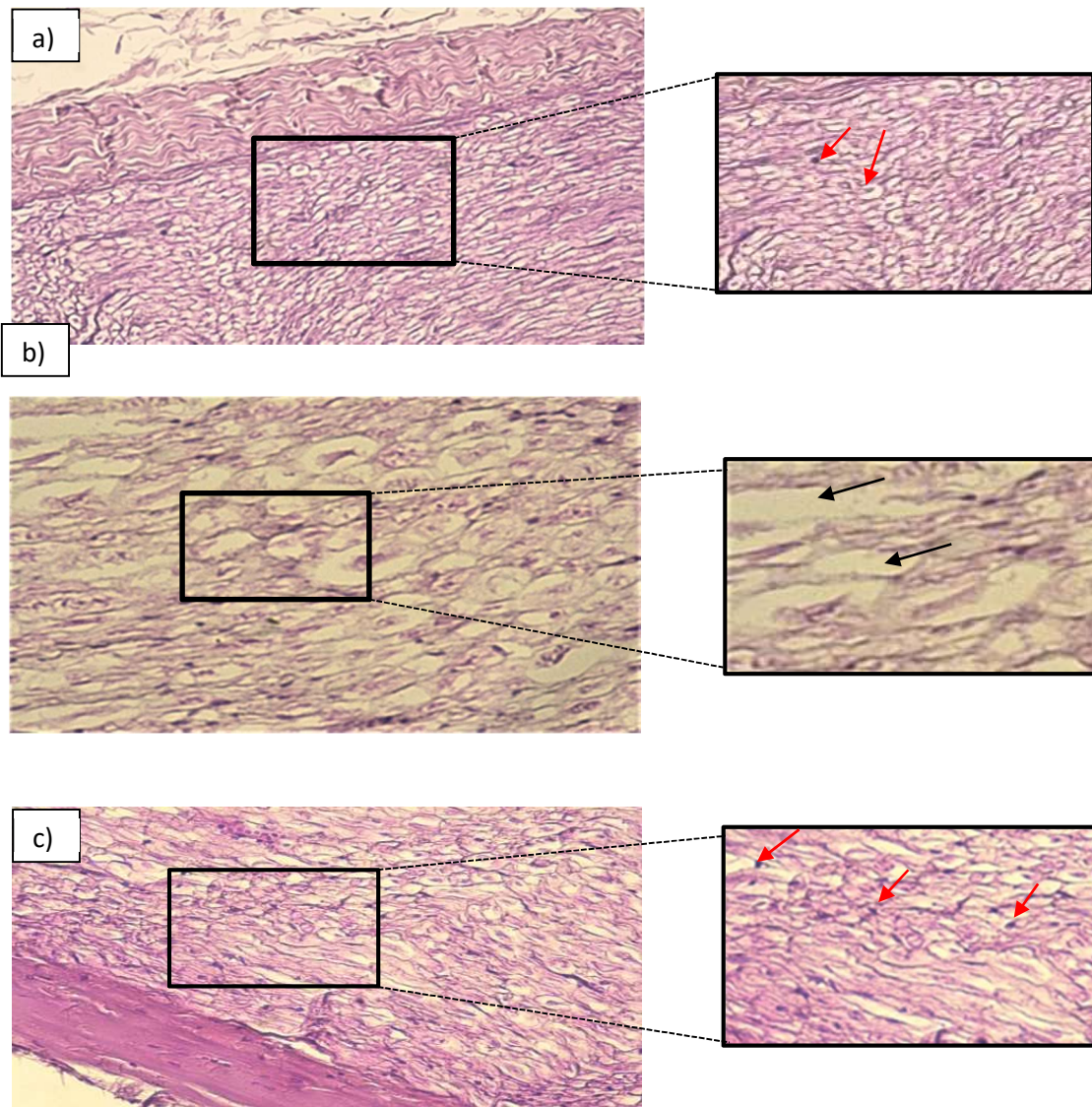


Figure 30: Photographie originale des coupes histologiques longitudinales illustrant l'état des nerfs sciatiques observées sous microscope grossissement 20X. (a) T0, (b) T4 témoin et (c) T4 vitamine. Les flèches rouges indiquent les cellules de Schwann, les flèches noires indiquent la disparition de cellules de Schwann.

III-2. Discussion

Cette étude consiste à déterminer l'effet protecteur des vitamines E et C sur le nerf sciatique de poulet, dans l'objectif principal est d'améliorer la conservation des nerfs périphériques en minimisant le stress oxydant engendré. La démarche expérimentale entreprise dans cette étude consiste à déterminer le stress oxydant engendré dans les lésions du nerf périphérique via la mesure des taux de MDA ainsi que le SAT dans les milieux de conservation et les homogénats des tissus témoins et traités avec les vitamines. Aussi, une étude histologique a été réalisée a fin de visualiser les structures du tissu du nerf sciatique et d'explorer les changements morphologiques liés au traitement.

Notre étude a dévoilé d'une part, que les niveaux des MDA sont nettement plus élevés dans les homogénats témoins par rapport aux homogénats traités avec les vitamines tout au long des sept jours de conservation. Cela suggère que l'association VitE+VitC exerce un effet protecteur contre la peroxydation lipidique au niveau du nerf sciatique pendant toute la période de conservation.

Une analyse plus détaillée des résultats révèle des différences significatives à des temps spécifiques. En effet, au deuxième jour de conservation, nous avons noté une différence très significative (** $p < 0,05$), ce qui suggère que les vitamines ont commencé à exercer leur effet protecteur à ce stade. Cet effet est accentué après le cinquième jour de conservation où nous avons constaté un effet encore plus prononcé de l'association VitE+VitC. Cela suggère que l'effet protecteur des vitamines contre la peroxydation lipidique atteint son maximum à ce stade. Cependant, à partir du sixième jour nous n'avons noté aucune différence significative entre les tissus témoins et traités avec les vitamines, cela suggère qu'il y'a un épuisement des substrats réactifs car la peroxydation lipidique nécessite la présence des substrats réactifs tel que les AGPI (Haleng *et al.*, 2007), qui peuvent diminuer au fil du temps. Si les réserves de ces substrats sont épuisées, cela peut entraîner une diminution de la production des MDA. En outre, il a été démontré que d'autres facteurs peuvent également influencer la production de MDA, tel que l'activité des enzymes antioxydantes endogènes (Haleng *et al.*, 2007).

D'autre part, l'évolution de la capacité antioxydante totale dans deux milieux de conservation différents du nerf sciatique a été aussi explorée. Ces milieux concernent le milieu témoin, qui est un milieu physiologique, ne contient aucune substance ajoutée et le milieu vitamine, qui contient les deux vitamines E et C combinées. Dans ce contexte cette partie vise

à déterminer si le traitement avec ces vitamines pouvait améliorer le statut antioxydant total du nerf sciatique lorsqu'il est conservé.

Les résultats ont montré que le statut antioxydant total dans les milieux vitamines est considérablement plus élevé que dans les milieux témoin tout au long des sept jours de conservation. Cette différence est statistiquement significative avec une importance très élevée pendant les six premiers jours de conservation (***) $p < 0,001$). Cela suggère que l'ajout de vitamines au milieu de conservation a un effet bénéfique sur la capacité antioxydante du nerf sciatique, ce qui augmente ainsi sa protection contre les dommages oxydatifs.

Les résultats obtenus montrent une corrélation entre l'augmentation du statut antioxydant total du milieu de conservation et la diminution des MDA dans les tissus de cellules nerveuses du nerf sciatique. Sur cette base nous suggérons que cette corrélation est en parfaite adéquation avec la capacité antioxydante des milieux de conservation qui est un facteur clé dans la protection contre la peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs observés dans les tissus du nerf sciatique, tout en diminuant la production des MDA.

Il est à noter que les résultats de cette étude peuvent être expliqués par le fait que l'association de la (VitE) et de la (VitC) exerce un effet complémentaire dans la protection contre la peroxydation lipidique car la vitamine E reste toujours sous sa forme réduite. En effet, la vitamine E, en tant qu'un antioxydant liposoluble, joue un rôle clé dans la protection contre les dommages oxydatifs. Elle agit en neutralisant les radicaux libres et en interrompant la propagation de la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides. En régénérant la vitamine E, la vitamine C assure un flux constant d'antioxydants actifs dans les membranes cellulaires, renforçant ainsi la protection contre la peroxydation lipidique. Une étude a été réalisée sur les effets antinociceptifs de la combinaison de la vitamine C et de la vitamine E suite à une lésion nerveuse périphérique ; il a été démontré que lorsque ces deux vitamines sont associées, agissent en synergie pour fournir une protection antioxydante plus efficace que lorsqu'elles sont utilisées individuellement (Lu *et al.*, 2011) .

La vitamine E réagit en capturant les radicaux peroxy, plus précisément en conférant à ce dernier un hydrogène phénolique. Cependant, lorsqu'elle neutralise les radicaux libres, la vitamine E devient elle-même un radical tocophéroxyle, ce qui nécessite une régénération pour maintenir son efficacité. C'est à ce niveau que la vitamine C joue son rôle. La vitamine C, est un antioxydant hydrosoluble qui joue un rôle crucial dans la régénération de la vitamine E. Elle

a la capacité de réduire le radical tocophéroxyde formé par la vitamine E, permettant ainsi à cette dernière de continuer à neutraliser les radicaux libres (**Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996**) ; (**Lu et al., 2011**).

Une étude *in vivo* portant sur une lésion d'ischémie-reperfusion du nerf sciatique chez le rat réalisée par **Apostolopoulou et al., (2018)** a démontré, que la combinaison de la Vitamine E et de la Vitamine C joue un rôle protecteur contre le stress oxydant. Les résultats ont montré que les taux de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ dans les groupes traités avec la combinaison des vitamines sont restés faibles, indiquant que ce prétraitement protège les tissus neuronaux contre un stress oxydant important.

Dans une autre étude *in vivo* menée par **Riffel et al., (2016)** sur des rats atteints d'une lésion chronique par constriction du nerf sciatique, il a été suggéré que l'association de la vitamine E et de la vitamine C avait un effet plus bénéfique sur le stress oxydant. Les résultats ont montré qu'une augmentation d'environ 30% de la capacité antioxydante totale, a été observée chez les rats traités uniquement avec la vitamine C ou avec la vitamine E. Cependant, chez les rats traités avec la combinaison de vitamine E et vitamine C (VitE+VitC), l'augmentation du SAT était d'environ 45%. De plus, il a été observé une diminution d'environ 22% des hydroperoxydes lipidiques chez les rats traités avec la vitamine C et une diminution de 8% chez ceux traités avec la vitamine E ainsi qu'une diminution de 38% chez ceux traités avec la combinaison de vitamine C et E. Ces différents résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sur la combinaison des deux vitamines confirment les effets prometteurs sur la protection du nerf sciatique contre les lésions du stress oxydant obtenus dans notre étude.

En ce qui concerne les résultats obtenus à partir des coupes histologiques longitudinales et transversales du nerf sciatique T0, du nerf sciatique T4 témoin et du nerf sciatique T4 vitamine soulèvent des observations significatives concernant la morphologie et la continuité des fibres nerveuses.

En premier lieu, dans le cas du nerf sciatique T4 témoin, l'observation de ce dernier suggère une altération ou une dégénérescence des fibres nerveuses, ce qui peut entraîner une altération de la transmission des influx nerveux. En revanche, le nerf sciatique T0 présente des fibres myélinisées clairement visibles et intactes, ce qui suggère un état normal du nerf. Ces résultats prometteurs sont en parfaite adéquation avec ceux trouvés dans l'étude réalisée par **Wang et al., (2015)** sur le rôle du stress oxydatif dans une lésion chirurgicale du nerf caverneux

chez un modèle de rat. Il a été observé chez le groupe contrôle qui n'a pas subi de lésion, une abondance des axones myélinisés. Cependant, nos résultats obtenus au niveau du nerf sciatique T4 traité avec les vitamines, suggèrent que l'administration des deux vitamines a un effet protecteur sur les fibres nerveuses, en empêchant ou en ralentissant leur dégénérescence. Il a été rapporté dans une étude menée sur la préservation des nerfs périphériques avant transplantation chez des rats en utilisant des extraits de polyphénols du thé vert, qu'au niveau histologique le groupe ayant reçu la greffe du nerf sciatique traité avec les polyphénols présentait un nombre élevé des axones myélinisés par rapport aux deux autres groupes témoins (un groupe témoin où le nerf a été transplanté immédiatement après son extraction, et un autre groupe témoin où le nerf a été conservé sans aucun traitement avec du polyphénol) (**Ikeguchi et al., 2003**).

Les analyses biochimiques et histologiques de notre étude ont révélé une concordance significative et pertinente, mettant en évidence l'effet protecteur de la combinaison des vitamines E et C contre les lésions du nerf périphérique tout en prévenant de manière conséquente le stress oxydant et la peroxydation lipidique. Les nerfs traités avec les vitamines ont montré une diminution de la production des MDA et donc la réduction de la peroxydation lipidique. Ces résultats ont été confirmés par l'étude histologique dont nous avons constaté une préservation de la morphologie et de l'intégrité des fibres nerveuses, empêchant ainsi la fragmentation de la myéline et la dégénérescence axonale.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

À l'heure actuelle, la microchirurgie est la méthode préférée pour traiter les LNP. Lorsqu'une lésion ne permet pas une suture bout à bout, la greffe de nerf autologue reste le traitement recommandé. Toutefois, il est important de prendre en compte les limites de ce type de greffe. Une alternative possible est la greffe nerveuse allogéniques, combinée à des immunosuppresseurs. Cependant, les greffes nerveuses allogéniques nécessitent souvent une transplantation en situation d'urgence. Par conséquent, il est crucial de développer des méthodes de stockage efficaces spécifiquement adaptées aux greffes nerveuses allogéniques périphériques.

Dans cette étude, nous avons entrepris d'évaluer l'effet protecteur de la combinaison de la vitamine E et de la vitamine C contre les lésions des nerfs périphériques. Pour ce faire, nous avons réalisé des analyses biochimiques afin de quantifier la peroxydation lipidique et le statut antioxydant total, ainsi qu'une analyse morphohistologique du tissu nerveux périphérique.

Au terme de notre travail nous pouvons conclure que l'association de la vitamine E et de la vitamine C dans la préservation des nerfs périphériques est très prometteuse tout en diminuant le stress oxydant (diminution des taux de MDA) et en augmentant le statut antioxydant total.

Aussi, les résultats de l'étude morphohistologique confirme l'effet bénéfique de l'association des deux vitamines où nous avons constaté une meilleure préservation de la morphologie et de l'intégrité des fibres nerveuses en empêchant la fragmentation de la myéline et la dégénérescence axonale.

Les résultats de cette étude ouvrent la voie à plusieurs perspectives prometteuses dans le domaine de la préservation et de la régénération des nerfs périphériques. Il est donc envisageable d'approfondir la recherche sur l'effet protecteur des combinaisons de vitamine E et de vitamine C pour comprendre les mécanismes moléculaires spécifiques par lesquels la combinaison de ces vitamines peut protéger les nerfs périphériques. Il est également envisageable de réaliser des études sur des modèles animaux pour valider les résultats obtenus *in vitro* et d'évaluer l'efficacité de la combinaison de la vitamine E et de la vitamine C dans la conservation et la protection contre les lésions du nerf périphérique.

Références

bibliographiques

References bibliographies

Adibatti, M. and V. Sangeetha. "Study on variant anatomy of sciatic nerve." *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014; **8**(8): 8-10.

Apostolopoulou, K., D. Konstantinou, R. Alataki, I. Papapostolou, D. Zisimopoulos, E. Kalaitzopoulou, V. Bravou, I. Lilis, F. Angelatou, H. Papadaki, C. D. Georgiou and E. Chroni. "Ischemia–Reperfusion Injury of Sciatic Nerve in Rats: Protective Role of Combination of Vitamin C with E and Tissue Plasminogen Activator." *Neurochemical Research* 2018; **43**(3): 650-658.

Bhattacharya, A., F. L. Muller, Y. Liu, M. Sabia, H. Liang, W. Song, Y. C. Jang, Q. Ran and H. Van Remmen. "Denervation induces cytosolic phospholipase a 2-mediated fatty acid hydroperoxide generation by muscle mitochondria." *Journal of Biological Chemistry* 2009; **284**(1): 46-55.

Boiko, T. and B. Winckler. "Myelin under construction - Teamwork required." *Journal of Cell Biology* 2006; **172**(6): 799-801.

Brull, R., A. Hadzic, M. A. Reina and M. J. Barrington. "Pathophysiology and Etiology of Nerve Injury Following Peripheral Nerve Blockade." *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 2015; **40**(5): 479-490.

Buege, J. A. and S. D. Aust. "Biomembranes - Part C: Biological Oxidations." *Methods in Enzymology* 1978; **52**: 302-310.

Burnett, M. G. and E. L. Zager. "Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review." *Neurosurgical focus* 2004; **16**(5): 1-7.

Caillaud, M., L. Richard, J.-m. Vallat, A. Desmoulière and F. Billet. "Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization."(2018).

Campbell, W. W. "Evaluation and management of peripheral nerve injury." *Clinical Neurophysiology* 2008; **119**(9): 1951-1965.

Catala, M. and N. Kubis. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system, Elsevier B.V. (2013)

Debanne, D., E. Campanac, A. Bialowas, E. Carlier and G. Alcaraz. "Axon physiology." *Physiological Reviews* 2011; **91**(2): 555-602.

Devaux, J. J., K. A. Kleopa, E. C. Cooper and S. S. Scherer. "KCNQ2 Is a Nodal K⁺ Channel." *Journal of Neuroscience* 2004; **24**(5): 1236-1244.

Dröge, W. "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiological Reviews* 2002; **82**(1): 47-95.

Dumont, M. and M. F. Beal. "Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease." *Free Radical Biology and Medicine* 2011; **51**(5): 1014-1026.

Duregotti, E., S. Negro, M. Scorzeto, I. Zornetta, B. C. Dickinson, C. J. Chang, C. Montecucco and M. Rigoni. "Mitochondrial alarmins released by degenerating motor axon terminals activate perisynaptic schwann cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; **112**(5): E497-E505.

Esterbauer, H., J. Gebicki, H. Puhl and G. Jürgens. "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL." *Free Radical Biology and Medicine* 1992; **13**(4): 341-390.

Evans, P. J., R. Midha and S. E. Mackinnon. "The peripheral nerve allograft: A comprehensive review of regeneration and neuroimmunology." *Progress in Neurobiology* 1994; **43**(3): 187-233.

Faroni, A., S. A. Mobasser, P. J. Kingham and A. J. Reid. "Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives." *Advanced Drug Delivery Reviews* 2015; **82**: 160-167.

Fatmi, S., L. Taouzinet, A. Benslimane, N. Chibani and D. Hammiche. "Drug release and sperm motility protection studies of vitamin E encapsulated in liposome, cyclodextrin or polyethylene glycol." *Materials Today: Proceedings* 2022; **53**: 71-75.

Favier, A. "Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique." *Actualite Chimique* 2003;(11-12): 108-115.

Greathouse, K. M., S. P. Palladino, C. Dong, E. S. Helton and E. E. Ubogu. "Modeling leukocyte trafficking at the human blood-nerve barrier in vitro and in vivo geared towards targeted molecular therapies for peripheral neuroinflammation." *Journal of Neuroinflammation* 2016; **13**(1): 1-11.

Grinsell, D. and C. P. Keating. "Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies." *BioMed Research International* 2014.

Guertin, A. D., D. P. Zhang, K. S. Mak, J. A. Alberta and H. A. Kim. "Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration." *Journal of Neuroscience* 2005; **25**(13): 3478-3487.

Guthrie, S. (2007). "Patterning and axon guidance of cranial motor neurons." **8**(november).

Haleng, J., J. Pincemail, J. O. Defraigne, C. Charlier and J. P. Chapelle. "Le stress oxydant." *Revue Medicale de Liege* 2007; **62**(10): 628-638.

Halliwell, B. "Free Radicals and Antioxidants: A Personal View." *Nutrition Reviews* 1994; **52**(8): 253-265.

Halpner, A. D., G. J. Handelman, J. M. Harris, C. A. Belmont and J. B. Blumberg. "Protection by vitamin C of loss of vitamin E in cultured rat hepatocytes." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1998; **359**(2): 305-309.

Hould R.. Technical on histopathology and cytopathology. Maloine. 1984; 19-21:225–227

Hung, H. A., G. Sun, S. Keles and J. Svaren. "Dynamic regulation of Schwann cell enhancers after peripheral nerve injury." *Journal of Biological Chemistry* 2015; **290**(11): 6937-6950.

Ichihara, S., Y. Inada and T. Nakamura. "Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts." *Injury* 2008; **39**(SUPPL.4): 29-39.

Ikeguchi, R., R. Kakinoki, T. Okamoto, T. Matsumoto, S. H. Hyon and T. Nakamura. "Successful storage of peripheral nerve before transplantation using green tea polyphenol: An experimental study in rats." *Experimental Neurology* 2003; **184**(2): 688-696.

Kamal-Eldin, A. and L. Å. Appelqvist. "The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols." *Lipids* 1996; **31**(7): 671-701.

Kubo, T., T. Yamashita, A. Yamaguchi, K. Hosokawa and M. Tohyama. "Analysis of genes induced in peripheral nerve after axotomy using cDNA microarrays." *Journal of Neurochemistry* 2002; **82**(5): 1129-1136.

Lees, V. C. and S. J. McCabe. "The rationale for hand transplantation." *Transplantation* 2002; **74**(6): 749-753.

Li, A., C. Pereira, E. E. Hill, O. Vukcevic and A. Wang. "In Vitro, In Vivo and Ex Vivo Models for Peripheral Nerve Injury and Regeneration." *Current Neuropharmacology* 2021; **20**(2): 344-361.

Lobsiger, C. S., V. Taylor and U. Suter. "The early life of a Schwann cell." *Biological Chemistry* 2002; **383**(2): 245-253.

Lu, R., W. Kallenborn-Gerhardt, G. Geisslinger and A. Schmidtko. "Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury." *PLoS ONE* 2011; **6**(12): 1-9.

McCorry, L. K. "TEACHERS ' TOPICS Physiology of the Autonomic Nervous System." 2007; **71**(4).

Peltonen, S., M. Alanne and J. Peltonen. "Barriers of the peripheral nerve." *Tissue Barriers* 2013; **1**(3): e24956-e24956.

Perry, V. H. and M. C. Brown. "Macrophages and nerve regeneration." *Current Opinion in Neurobiology* 1992; **2**(5): 679-682.

Pincemail, J., K. Bonjean, K. Cayeux and J. O. Defraigne. "Physiological action of antioxidant defences." *Nutrition Clinique et Metabolisme* 2002; **16**(4): 233-239.

Rasband, M. N. and E. Peles. "The nodes of Ranvier: Molecular assembly and maintenance." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2016; **8**(3): 1-16.

Richard, L., P. Topilko, L. Magy and P. Charnay. "Endoneurial Fibroblast-Like Cells." 2012; **71**(11): 938-947.

Richner, M., O. J. Bjerrum, A. Nykjaer and C. B. Vaegter. "The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice." *Journal of Visualized Experiments* 2011;(54): 3-5.

Riffel, A. P. K., J. A. de Souza, M. d. C. Q. Santos, A. Horst, T. Scheid, C. Kolberg, A. Belló-Klein and W. A. Partata. "Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats." *Brain Research Bulletin* 2016; **121**: 169-177.

Rigoard, P. and F. Lapiere. "Rappels sur le nerf périphérique." *Neurochirurgie* 2009; **55**(4-5): 360-374.

Rodella, U., M. Scorzeto, E. Duregotti, S. Negro, B. C. Dickinson, C. J. Chang, N. Yuki, M. Rigoni and C. Montecucco. "An animal model of Miller Fisher syndrome: Mitochondrial hydrogen peroxide is produced by the autoimmune attack of nerve terminals and activates Schwann cells." *Neurobiology of Disease* 2016; **96**: 95-104.

S, S. "A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function." *Brain* 1951; **74**(4): 491-516.

Salzer, J. L. "Switching myelination on and off." *Journal of Cell Biology* 2008; **181**(4): 575-577.

Scherer, S. S. and E. J. Arroyo (2014). Myelin: Molecular Architecture of CNS and PNS Myelin Sheath☆, Elsevier Inc.

Seddon, R. J. "Surgical experiences with peripheral nerve injuries." *Quarterly bulletin. Northwestern University (Evanston, Ill.). Medical School* 1947; **21**(3): 201-210.

Siemionow, M. and G. Brzezicki (2009). Chapter 8 Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair, Elsevier Inc.

Stämpfli, R., P. Brühwiler, S. Mourad, R. Verdejo and M. Shaffer. "Development and characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams." *EMPA Activities* 2007; **26**(2007): 51-51.

Swain, S. D., T. T. Rohn and M. T. Quinn. "Neutrophil priming in host defense: Role of oxidants as priming agents." *Antioxidants and Redox Signaling* 2002; **4**(1): 69-83.

Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur and J. Telser. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007; **39**(1): 44-84.

van Hameren, G., G. Campbell, M. Deck, J. Berthelot, B. Gautier, P. Quintana, R. Chrast and N. Tricaud. "In vivo real-time dynamics of ATP and ROS production in axonal mitochondria show decoupling in mouse models of peripheral neuropathies." *Acta neuropathologica communications* 2019; **7**(1): 86-86.

Walsh, S. and R. Midha. "Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair." *Neurosurgical Focus* 2009; **26**(2): 1-8.

Wang, H., X. G. Ding, S. W. Li, H. Zheng, X. M. Zheng, S. Navin, L. Li and X. H. Wang. "Role of oxidative stress in surgical cavernous nerve injury in a rat model." *Journal of Neuroscience Research* 2015; **93**(6): 922-929.

Yan, J. "REVIEW ARTICLE C ANADIAN A SSOIATION OF N EUROSCIENCE R EVIEW : Development and Plasticity of the Auditory Cortex." 2020; 189-200.

Zhou, H., Y. Yan, X. Ee, D. A. Hunter, W. J. Akers, M. D. Wood and M. Y. Berezin. "Imaging of radicals following injury or acute stress in peripheral nerves with activatable fluorescent probes." *Free Radical Biology and Medicine* 2016; **101**(September): 85-92.

Résumé

Les lésions des nerfs périphériques sont fréquentes et nécessitent une prise en charge appropriée. Actuellement, les greffes allogéniques combinées à des immunosuppresseurs sont recommandées. Cependant, ces greffes doivent souvent être réalisées immédiatement, ce qui souligne la nécessité de développer de meilleures méthodes de conservation des nerfs périphériques pour prévenir les dommages oxydatifs pouvant affecter leur préservation. L'objectif de ce travail est donc d'évaluer *in vitro* l'effet protecteur antioxydant de l'association de la vitamine E (Vit E) et de la vitamine C (Vit C) contre les lésions des nerfs périphériques. Ceci est réalisé à travers des explorations histologiques et des analyses biochimiques effectués sur le nerf sciatique du poulet de chair, en mesurant deux paramètres distincts à des temps variables, à savoir le niveau des malondialdéhydes (MDA), produit de la peroxydation lipidique, ainsi que le statut antioxydant total (SAT). Les résultats de l'étude biochimique montre des taux de MDA très faibles après traitement avec les deux vitamines après le troisième jour de conservation ($*p<0,05$) avec une valeur de $(0,039\pm 0,004)$ en comparaison avec le témoin $(0,136\pm 0,012)$. Aussi, les résultats du SAT montrent des valeurs très élevées après traitement avec les vitamines $(45,84\pm 2,74)$ en comparaison aux résultats du témoin $(21,41\pm 1,17)$. Les résultats de l'étude histologique ont montré que les vitamines exercent une meilleure préservation de la morphologie et de l'intégrité des fibres nerveuses en empêchant la fragmentation de la myéline et la dégénérescence axonale.

Mots clés : lésions des nerfs périphériques, conservation, stress oxydant, vitamine E, vitamine C.

Abstract

Peripheral nerve damage is common and requires appropriate management. Currently, allogeneic transplants combined with immunosuppressants are recommended. However, these transplants often have to be performed immediately, which highlights the need to develop better methods for preserving peripheral nerves to prevent oxidative damage that could affect their preservation. The aim of this study is therefore to evaluate the *in vitro* antioxidant protective effect of the combination of vitamin E (Vit E) and vitamin C (Vit C) against peripheral nerve damage. This was achieved through histological explorations and biochemical analyses carried out on the sciatic nerve of broiler chickens, by measuring two distinct parameters at different times, namely malondialdehydes (MDA) level, a product of lipid peroxidation, and total antioxidant status (TAS). The results of the biochemical study showed very low levels of MDA after treatment with the two vitamins after the third day of storage ($*p<0.05$) with a value of (0.039 ± 0.004) compared to the control (0.136 ± 0.012) . Also, the TAS results show very high values after treatment with vitamins $(45.84\pm 2.74\%)$ compared to the control results $(21.41\pm 1.17\%)$. The results of the histological study showed that the vitamins provided a better preservation of the morphology and the integrity of the nerve fibres by preventing myelin fragmentation and axonal degeneration.

Keywords : peripheral nerve damage, conservation, oxidative stress, vitamin E, vitamin C.

ملخص

يعد تلف الأعصاب المحيطية أمرًا شائعًا ويتطلب إدارة مناسبة. حاليًا، يوصى بعمليات الزرع الخفيفة جنبًا إلى جنب مع مثبطات المناعة. ومع ذلك، غالبًا ما تحتاج هذه الطعوم إلى إجراء فوري، مما يؤكد الحاجة إلى تطوير طرق أفضل للحفاظ على الأعصاب المحيطية لمنع الضرر التأكسدي الذي قد يؤثر على الحفاظ عليها. لذلك فإن الهدف من هذا العمل هو تقييم التأثير الوقائي المضاد للأكسدة في المختبر لمزيج فيتامين هـ وفيتامين ج ضد تلف الأعصاب المحيطية. يتم ذلك من خلال الاستكشافات النسيجية والتحليلات الكيميائية الحيوية التي يتم إجراؤها على العصب الوركي للفروج، من خلال قياس معلمتين متميزتين في أوقات متغيرة، وهما مستوى المالنديالدهد منتج التفوق الدهني، والحالة الكلية لمضادات الأكسدة. أظهرت نتائج الدراسة الكيميائية الحيوية مستويات منخفضة جدًا من المالنديالدهد بعد العلاج بكل الفيتامينات بعد اليوم الثالث من التخزين بقيمة (0.004 ± 0.039) مقارنة بالشاهد (0.012 ± 0.136) . أيضًا، تظهر نتائج الحالة الكلية لمضادات الأكسدة قيمًا عالية جدًا بعد العلاج بالفيتامينات (2.74 ± 45.84) مقارنة بنتائج الشاهد (1.17 ± 21.41) . أظهرت نتائج الدراسة النسيجية أن الفيتامينات تمارس حفاظًا أفضل على مورفولوجيا وسلامة الألياف العصبية عن طريق منع تجزئة المايلين والتفكك المحوري.

الكلمات الرئيسية: تلف الأعصاب المحيطية، الحفظ، الإجهاد التأكسدي، فيتامين هـ، فيتامين ج.