

République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et

de la Recherche Scientifique



Université L'Arbi Ben M'hidi, Oum-El-Bouaghi

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre.....

N° de série.....

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue d'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biologie et Physiologie de la Reproduction

Thème

Evaluation de la capacité galactagogue du *Bunium incrassatum* (Talghouda) chez la lapine allaitante de population locale

Réalisé par :

Allouane Fayza

Bouarroudj Zineb

Membres du jury :

- **Président** : Mr Ouldjaoui Abdallah **Pr.** Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi
- **Encadreur** : Mme Boulehbel Souad **Pr.** Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi
- **Examineur** : Mr Redouane Salah A **MA.** Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi

Année universitaire: 2022-2023

Remerciement et Dédicaces

Mme Boulehbel .S , merci pour nous avoir fait l'honneur de diriger ce mémoire, soyez assurée de notre gratitude pour votre soutien et votre patience.

Membres de jury , merci à vous qui nous faites l'honneur de juger ce travail .

De façon plus générale, nous tenons à remercier tout le corps enseignant de l'SNV qui nous a offert une formation initiale diversifiée.

Dr Khalfaoui .A (Médecin en AnaPath), on ne pourra jamais vous remercier assez pour votre patience et générosité.

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que nous dédions ce modeste travail de fin d'étude à nos chères familles, tous nos professeurs qui nous ont enseigné et à tous ceux qui nous sont chers.



SOMMAIRE

Remerciement et Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale1

Partie I : Synthèse bibliographique

1. La glande mammaire	3
1.1.Rappel anatomo-histologique de la glande mammaire	3
1.1.1. Anatomie	3
1.1.2. Histologie.....	4
1.2.Développement de la glande mammaire.....	5
1.2.1. Période fœtale.....	5
1.2.2. Période post-natale.....	6
1.3.Facteurs impliquant dans le développement de la GM.....	7
1.3.1. Hormones ovariennes.....	7
1.3.2. La prolactine	7
1.3.3. Les glucocorticoïdes.....	7
1.3.4. Hormone de croissance.....	8
1.3.5. Incline-like Growth Factor.....	8
1.3.6. Epidermal Growth Factor.....	8
2. Structure de GM en lactation	11
3. Rôle des différents types cellulaires dans l'activité de GM.....	13
3.1.Adipocytes.....	13
3.2.Fibroblastes.....	14
3.3.Cellules souches mammaires.....	14
4. Rôle de la matrice extracellulaire dans la GM.....	15

5. Action des œstrogènes dans la division des cellules épithéliales mammaires...	16
6. Mécanismes d'action des hormones ovariennes.....	17
6.1.Voie classique génomique ou nucléaire.....	17
6.2.Voie non génomique ou membranaire.....	18
7. Utilisation des extraits de plantes pour stimuler la sécrétion lactée.....	19

Partie II : Matériel et méthodes

1. Matériel utilisé	21
1.1.Matériel végétal.....	21
1.2.Matériel animal.....	22
1.3. Matériel non biologique.....	22
2. Etudes histologiques	24
2.1.Prélèvement et fixation	24
2.2.Déshydratation.....	25
2.3.Imprégnation.....	25
2.4.Inclusion et mise en bloc	26
2.5.Confection des coupes et étalement (microtome).....	26
2.6.Coloration.....	27
2.7.Montage des lames histologiques.....	27
3. Études immunohistochimique	29
3.1.Déparaffinage ou réhydratation.....	29
3.2.Prétraitement – démasquage.....	30
3.3.Blocage des peroxydases endogènes.....	30
3.4.Application de l'anticorps primaire	30
3.5.Application de l'anticorps secondaire	30
3.6.La révélation par la di-amino-benzidine (DAB).....	30
3.7.La contre-coloration.....	31

3.8.Montage	31
-------------------	----

Partie III : Résultats et discussions

1. Résultats des paramètres hormonaux.....	32
1.1. 10 ^{ème} -20 ^{ème} j de lactation	32
1.1.1. Les œstrogènes et la progestérone.....	32
1.1.2. FSH et LH.....	32
1.2.Effet du <i>B incrassatum</i> sur les paramètres hormonaux	33
1.2.1. Les œstrogènes et la progestérone.....	33
1.2.2. FSH et LH.....	33
2. Etude histologique.....	34
2.1.Histologie de la glande mammaire	34
2.2.Effet du <i>BI</i> sur l’histologie de la glande mammaire	36
2.3.Effet du <i>BI</i> sur l’ovaire.....	37
3. Etude immunohistochimique.....	38
3.1.Immunoexpression et localisation des récepteurs PR, ER.....	38
3.2.Effet du <i>BI</i> sur l’immunoexpression des récepteurs à la progestérone.....	39
3.3.Effet du <i>BI</i> sur l’immunoexpression des récepteurs au œstrogènes	40
Discussion.....	41
Conclusion	44

Références bibliographiques

Résumé / Abstract

Liste des figures

Figure 01	Anatomie de la glande mammaire	page 03
Figure 02	Organisation architecturale d'une mamelle	page 04
Figure 03	Formation de la GM pendant la période fœtale	page 05
Figure 04	Principaux facteurs mammaires contrôlant la croissance des cellules épithéliales	page 09
Figure 05	Principales étapes du développement de GM	page 10
Figure 06	Structure d'une alvéole mammaire et canaux galactophores	page 11
Figure 07	Représentation symbolique d'une cellule épithéliale mammaire différenciée	page 12
Figure 08	Organisation des cellules et la matrice extracellulaire dans la GM	page 13
Figure 09	Modèle hiérarchie épithéliale mammaire	page 15
Figure 10	Action des œstrogènes sur MEC et GF mammaire	page 17
Figure 11	Intégration des voies de signalisation des RE,PR	page 18
Figure 12	Description morphologique de Bunium incrassatum	page 21
Figure 13	Matériel non biologiques	page 22
Figure 14	Schéma récapitulatif du protocole expérimental	page 23
Figure 15	Dissection de la lapine	page 24
Figure 16	Prélèvement sanguin, prélèvement et fixation de la glande mammaire	page 25

Figure 17	Inclusion au paraffine	page 26
Figure 18	microtomie et étalement des coupes sur les lames	page 26
Figure 19	lame montée et colorée (histologie)	page 28
Figure 20	Le protocole expérimental de l'étude histologique	page 28
Figure 21	lame montée et colorée (immunohistochimie)	page 31
Figure 22	Le protocole expérimental de l'étude immunohistochimie	page 31
Figure 23	Représentation graphique des variations des taux de la progestérone et des oestrogenes(TM).	page 32
Figure 24	Représentation graphique des variations de FSH et LH (TM).	page 32
Figure 25	Représentation graphique des variations des taux de la progestérone et des oestrogenes(TR) et (TM).	page 33
Figure 26	Représentation graphique des variations de FSH chez les deux lapines TR et TM.	page 33
Figure 27	Aspect morphologique de GM de lapine allaitante	page 34
Figure 28	Démonstration histologique de GM en pleine lactation	page 35
Figure 29	Effet du BI sur le diamètre et la sécrétion lacté (histologie)	page 36
Figure 30	Effet du BI sur l'ovaire (histologie)	page 37
Figure 31	Démonstration immunohistochimique des RE, PR dans la GM de lapine allaitante	page 38
Figure 32	Démonstration immunohistochimique des PR dans la GM de lapines allaitantes TR et TM.	page 39
Figure 33	Démonstration immunohistochimique des RE dans la GM de lapines allaitantes TR et TM	page 40

Liste des tableaux

Tableaux 01	Le processus de la déshydratation	page 26
Tableaux 02	Les solutions d'imprégnation	page 26
Tableaux 03	Le processus de la coloration	page 28
Tableaux 04	Le processus de déparaffinage	page 29
Tableaux 05	Type et lieu de l'immunoexpression des ER et PR dans la glande mammaire de lapine allaitante	page 38
Tableaux 06	La concentration et le pourcentage IHC DAB (PR) dans la GM	page 39
Tableaux 07	La concentration et le pourcentage IHC DAB (ER) dans la GM	page 40

Liste des abréviations.

FSH	Folliculo-Stimulated Hormone.
IHC	Immunohistochimie
LH	Hormone lutéinisante.
ER	Récepteurs des œstrogènes
PR	Récepteurs de progestérone
<i>B I</i>	<i>Bunium Incrassatum</i>
TM	Témoin
TR	Traitée
HIER	Heat-Induced Epitope Retrieval
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
PBS	Phosphate Buffered Saline
DAB	DiAminoBenzidineTétrahydrochloride
HE	Hématoxyline – Eosine
PFA	Paraformaldéhyde
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
GM	Glande Mammaire
CEM	Cellule Épithéliale Mammaire
PRL	Prolactine
GH	Growth Hormon
IGF-1	Insuline Like Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
MDGF	Mammary Derived Growth Factor
PG	Prostaglandine
MFDGF	Mammary Fibroblaste Derived Growth Factor

Introduction

générale

Introduction :

La lactation est la phase finale du cycle de reproduction des mammifères, le lait est adapté aux besoins et aux capacités digestives des petits.

Le développement de la glande mammaire se produit sur une longue période de temps, débutant à la vie fœtale et continuant pendant la vie adulte suivant un cycle gestation-lactation-involution. A la naissance, la glande mammaire est composée d'un petit nombre de canaux rudimentaires en contact étroit avec le stroma, constitué principalement d'adipocytes et de tissu conjonctif. Pendant la puberté, la glande mammaire se développe pour devenir un réseau ramifié de canaux et de structures lobulo-alvéolaires dont le développement s'amplifie pendant la gestation afin de permettre une abondante lactation (**Howlin et al, 2006**).

La croissance épithéliale et la différenciation mammaires sont étroitement modulées par de nombreux signaux hormonaux et métaboliques (**Hennighausen et Robinson, 2005**). Ainsi, le poids corporel peut constituer un facteur de régulation important dans ces processus. L'alimentation peut donc être d'une importance cruciale au cours des grandes étapes du développement de cet organe (**Sejrsen, 1994**).

La production laitière varie en fonction de plusieurs facteurs dont la race, la saison, le stade de lactation, l'état physiologique, l'état nutritionnel et le type d'élevage. Depuis des années, de nombreuses plantes médicinales et de nombreux produits naturels sont utilisés pour augmenter cette production.

L'Algérie, de par son climat et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques, et l'utilisation médicinale de plantes est une des pratiques thérapeutiques les plus anciennes. Aujourd'hui, les plantes sont largement utilisées et surtout recommandées par les thérapeutes et les organisations publiques de santé, comme l'organisation mondiale de la santé (**OMS/WHO, 2022**). Sur la base des usages tradithérapeutes, de nombreux auteurs ont essayé d'approfondir les connaissances sur les plantes médicinales et leur impact sur les paramètres de reproduction animale (**Diel et al., 2002 ; Magee & Rowland , 2004 ; Balé et al., 2006**).

Selon les tradipraticiens de la région d'Oum el Bouaghi, le *Bunium incrassatum* qui appartient à la famille Apiaceae, est utilisé dans le but d'augmenter le poids et la sécrétion laitière de quelques animaux d'élevage et, sur la base des résultats obtenus sur la composition chimique de cette plante,

on démontre la présence de l'**acide oleique, scopoletin, scoparone** et **β sitostérol** (Bousetla et al. 2011).

L'objectif de notre travail actuel est d'incorporer les racines du *Bunium Incrassatum* dans l'alimentation et évaluer sa capacité galactagogue chez la lapine allaitante de population locale.

Nous avons choisi comme model expérimental la lapine, car elle représente un modèle primordial dans les supports établis dans la recherche scientifique, offrant beaucoup d'avantages dans le domaine de la reproduction. La lapine est une espèce à ovulation provoquée par d'autres facteurs externes, et ne présente pas de cycle œstral régulier, l'accouplement peut être organisé tout au long de l'année. (Berger et al., 1991).

Notre mémoire est structuré en trois parties.

- La première partie s'intéressera à la physiologie de la lactation afin de mieux identifier les axes intervenant dans ce stade physiologique.
- La seconde partie présente l'objectif de ce travail et la stratégie expérimentale adoptée.
- La troisième partie révèle les résultats de ce travail et nos tentatives de les expliquer scientifiquement.

Partie I

Synthèse bibliographique

1. La glande mammaire :

La lactation est la phase finale du cycle de reproduction des mammifères, qui comme le nom l'indique, sont caractérisés par la présence de mamelles, celles-ci sont distribuées sous la forme de paires isolées ou bien en nombre variable le long du cordons mammaires positionnés symétriquement sur la partie ventrale du corps, chaque glande est une entité fonctionnelle indépendante qui peut allaiter un ou plusieurs petits (**Turner, 1952**).

Le lait contient tous les éléments nutritionnels dont a besoin le nouveau-né, sa sécrétion est le résultat d'un long processus qui comprend la croissance de la glande mammaire pendant la gestation, l'induction de la synthèse du lait à la parturition, la modification du métabolisme maternel qui se met au service de la glande mammaire et finalement l'involution de la glande mammaire après le sevrage. Tous ces événements sont contrôlés par une myriade d'hormones et de facteurs produits par la glande mammaire elle-même (**Houdebine, 2007**).

1.1. Rappel anatomo-histologique de la glande mammaire :

1.1.1. Anatomie :

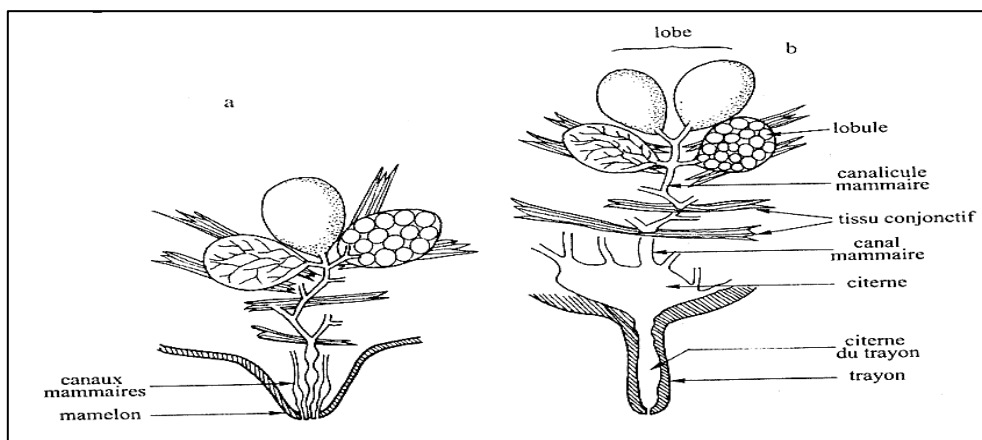


Figure 1. Anatomie de la glande mammaire : a) avec mamelon, b) avec trayon
(d'après **Delouis & Richard, 1991**)

La glande mammaire est une glande à sécrétion externe, elle comprend une structure épithéliale en grappe organisée en alvéoles, groupées en lobules, eux-mêmes rassemblés en lobes, cette structure sécrétoire est drainée par un réseau de canalicules et canaux lobulaires, lobaires et mammaires, ces derniers débouchent à l'extérieur isolément sans structure spéciale (Marsupiaux) ou au niveau d'un mamelon (Primates, Lagomorphes..), ou bien, dans une citerne qui s'ouvre vers l'extérieur par un canal unique au niveau d'un trayon (Ruminants) (**Delouis & Richard, 1991**).

1.1.2. Histologie :

Les mamelles sont des glandes cutanées modifiées, ou plus exactement des glandes tubulo-alvéolaires de type apocrine qui débouchent dans une papille cylindro-conique (**Larboulette, 2003**).

Du point de vue histologique, la glande mammaire est composée de l'extérieur vers l'intérieur de :

- La peau : un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé, dont le degré de kératinisation varie d'une espèce à une autre.
- Le derme : Le stroma mammaire est composé de tissu conjonctif (qui s'implante à l'intérieur et divise la glande en lobes et lobules), comprenant notamment des fibroblastes, des adipocytes et des cellules mésenchymateuses.
- Le tissu adipeux est très abondant et joue un rôle de soutien dans la glande mammaire.
- Les canaux et lobules mammaire sont composés de deux types cellulaires, les cellules myoépithéliales et les cellules luminales épithéliales canalaire ou lobulaires, ces dernières sont entourées d'une membrane basale sur laquelle repose les cellules myoépithéliales. Cette membrane assure l'interface avec le stroma mammaire.

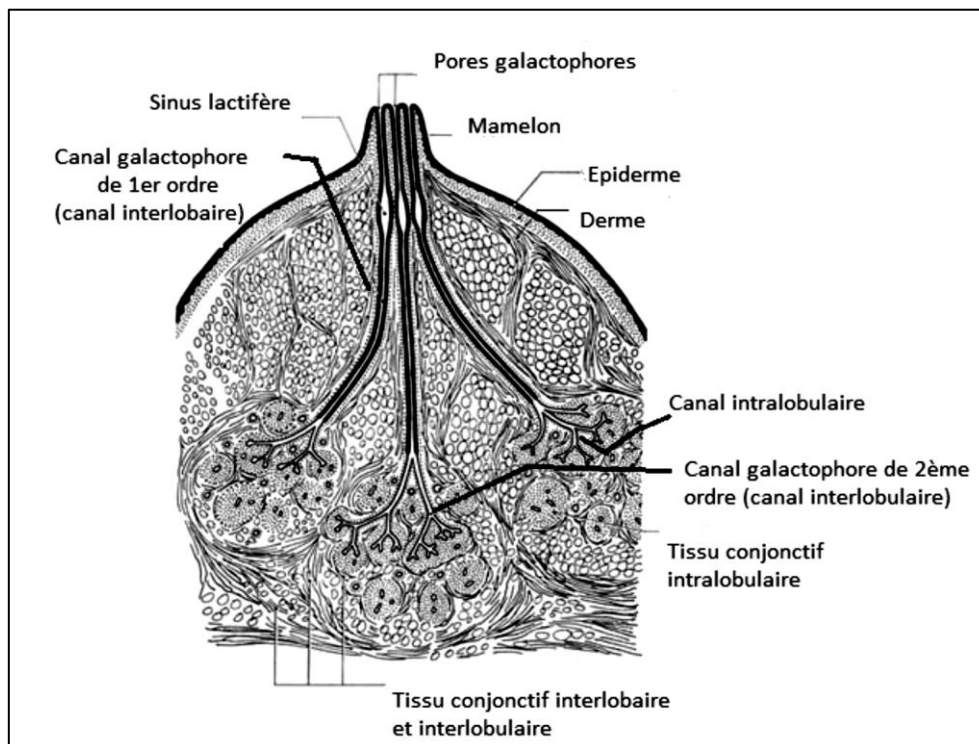


Figure 2. Organisation architecturale d'une mamelle (d'après Larboulette, 2003).

1.2. Développement de la glande mammaire :

Pour la grande majorité des espèces de mammifères, le développement de la glande mammaire se déroule progressivement. La mise en place des structures tissulaires a lieu pendant la vie fœtale et juvénile. A partir de la puberté, des cycles de prolifération et différenciation cellulaires et d'involution (régression du tissu) se succèdent au rythme des cycles oestriens, des gestations et des lactations (**Jammes & Djiane, 1988**).

L'ensemble des phénomènes de développement et de différenciation structurale des tissus mammaires est appelé mammogénèse (**Turner, 1952 ; Larson, 1978**).

1.2.1. Période fœtale :

L'ébauche mammaire se forme par un phénomène d'induction à partir de l'ectoderme ventral du fœtus par migration des cellules de la peau et non par multiplication des cellules souches, c'est le mésenchyme, ou endoderme sous-jacent, qui induit la migration des cellules ectodermique.

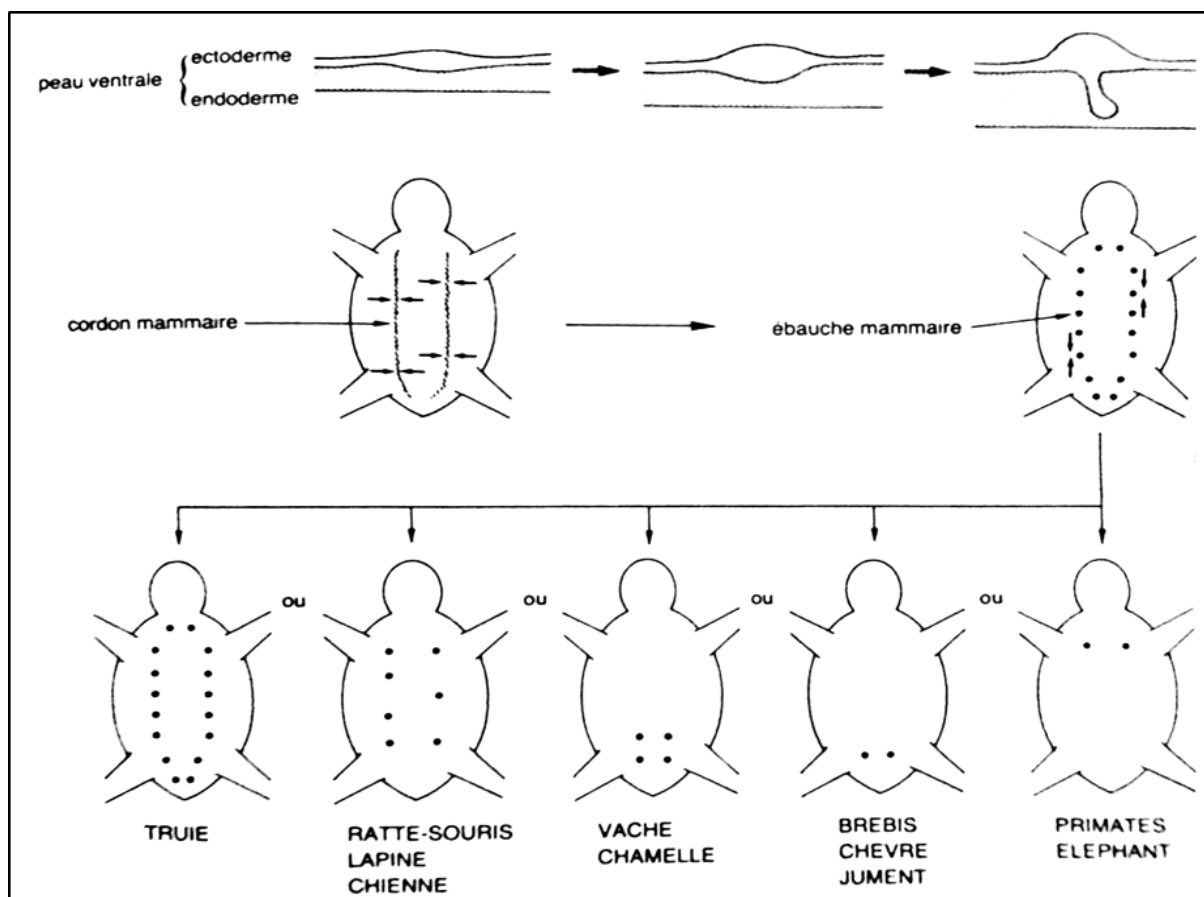


Figure 3. Formation de la glande mammaire pendant la période fœtale
(**Delouis & Richard, 1991**)

Durant le premier quart de la vie fœtale, deux cordons mammaires s'individualisent à la surface de la peau ventrale, les cellules épithéliales de l'ectoderme migrent en sens opposé latéralement formant un épaississement, ensuite ces cellules migrent longitudinalement pour former des ébauches individualisées qui s'invaginent dans l'endoderme sous-jacent. Des cellules de l'endoderme se regroupent autour de la partie interne de l'ébauche épithéliale qui formeront le stroma (**Delouis & Richard, 1991**).

Au début, huit paires d'ébauches mammaires s'individualisent le long des cordons, chez les espèces prolifiques, ce nombre de paires est maintenu (Truie), ou presque (lapine, chienne..) avec 3-4 paires, alors que chez les primates, la chèvre, la brebis, on trouve une seule paire.

Le nombre et la localisation des glandes mammaires sont contrôlés par des gènes et des facteurs de croissance. Ces derniers provoquent la mort cellulaire (apoptose) de certaines paires selon les espèces (**Delouis & Richard, 1991**).

1.2.2. Période post-natale :

Après la naissance, la glande mammaire se développe à la même vitesse que l'ensemble de l'individu avant de subir une croissance allométrique positive avant la puberté, le parenchyme mammaire se développe dans le tissu adipeux. Cette période correspond à une grande sensibilité du tissu aux stéroïdes, aux agents carcinogènes et aux virus.

Au moment de la puberté : sous l'action des stéroïdes sexuels, survient une phase de croissance importante des canaux mammaires et du stroma (**Jammes & Djiane, 1988**).

Au cours de la 2^o moitié de la gestation, l'extrémité des canaux bourgeonne formant des lobules qui se substituent au tissu adipeux. Le développement lobulo-alvéolaire mammaire s'accompagne de la mise en place d'une petite activité sécrétoire. La structure canaliculaire va se transformer en un ensemble tubulo-alvéolaire qui en représente 90% en fin de gestation, le développement de la glande mammaire est pratiquement complet au moment de la naissance du jeune (**Jammes & Djiane, 1988**).

Une fois le processus de lactation induit, la proportion de cellules en division devient négligeable. Le maintien de la sécrétion de lait est assuré par les cellules épithéliales mammaires en place. En pleine activité, l'épithélium mammaire synthétise et sécrète 15 % de son propre poids par jour sous forme de protéines (**Cowie, 1972**).

Après le sevrage, une déstabilisation de la glande mammaire a lieu. L'épithélium perd rapidement de son étanchéité, le flux sanguin se ralentit, la matrice extracellulaire est dégradée, l'activation de gènes codant pour des protéines ayant une activité bactériostatique (lactoferrine, transferrine) a lieu (**Grigor et al., 1990**), le tissu est envahi par des macrophages qui participent à la lyse et à la

protection du tissu et les cellules subissent une apoptose qui, elle-même, s'accompagne d'une induction de gènes spécifiques, c'est l'involution (**Bielke et al., 1997**).

Contrairement à la brebis et d'autres espèces, où la majorité de la croissance mammaire se déroule pendant la gestation et essentiellement terminée par la parturition, chez les lapins 67% de la croissance se produit pendant la gestation et 33% en période de lactation (**Lu & Anderson, 1973**).

1.3. Facteurs impliquant dans le développement de la glande mammaire :

Il a été mis en évidence que l'ablation des glandes endocrines hypothalamo-hypophysaire, les ovaires, la glande surrénale, le placenta et la thyroïde jouaient des rôles complexes et complémentaires dans le développement de la glande mammaire (**Houdebine, 2007**).

1.3.1. Hormones ovariennes :

Hormones ovariennes jouent le rôle d'inducteur dans la croissance de la glande mammaire. Pendant, la phase lutéale de chaque cycle sexuel, un début de développement mammaire a lieu. Ce processus est interrompu à la fin du cycle ou au contraire poursuivi et amplifié lorsque la femelle est gestante (**Houdebine, 2007**). Chez la brebis, l'accélération du développement mammaire a lieu après le 80^e jour de gestation, au moment où les œstrogènes d'origine placentaire deviennent plus abondants dans la circulation sanguine (**Houdebine, 2007**). De multiples expériences ont par ailleurs montré qu'une imprégnation préalable par les œstrogènes était nécessaire pour que les hormones mammogènes puissent exercer leur effet (**Imagawa et al., 1994**).

Des études d'inactivation du récepteur de la progestérone (PR) chez la souris (**Lydon JP, 1995 ; Briskin et al., 1998 ; Briskin et al., 2010**), ont permis d'obtenir glandes mammaires présentant des canaux galactophores mais pas de lobules soulignant effectivement le rôle important de la progestérone dans la différenciation terminale de la glande mammaire.

1.3.2. La prolactine :

La prolactine (PRL) est indispensable à toutes les périodes de développement de la glande mammaire que sont la croissance de la glande, l'induction et l'entretien de la sécrétion lactée. Pendant la période de croissance mammaire qui débute à la puberté, la prolactine est indispensable pour assurer une croissance des canaux alvéolaires. Cette action se fait en association avec les œstrogènes, la progestérone et les glucocorticoïdes (**Ibarra et al., 2007**).

1.3.3. Les glucocorticoïdes :

Dans la majorité des espèces, les glucocorticoïdes, synthétisés par les glandes surrénales, exercent un effet amplificateur des actions de la PRL sur la glande mammaire, Ils agissent d'une part, au

niveau de la stabilité des ARN messagers et, d'autre part, au niveau de la transcription des gènes des protéines du lait (β -caséine) (**Devinoy & Houdebine, 1977**).

1.3.4. Hormone de croissance (GH) :

Cette hormone est sécrétée par la partie antérieure de l'hypophyse, elle stimule la croissance et la multiplication cellulaire. Lors de la puberté, la GH active son récepteur localisé dans le stroma mammaire, entraînant une production d'Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1), qui stimule localement la prolifération des CEM (**Kelly, 2002**).

1.3.5. Insulin Like Growth Factor (IGF-1) :

C'est un médiateur de l'hormone de croissance (GH) qui a un rôle prépondérant dans la croissance de nombreux organes et tissus dans la période postnatale et notamment de la glande mammaire. Chez les souris femelles mutantes IGF-I, la croissance des canaux galactophores au sein du coussinet adipeux est très limitée, bien que le taux en GH soit normal chez ces animaux. Ainsi les présences de GH et d'IGF-I sont importantes pour la formation post-natale de l'arbre mammaire (**Richards et al., 2004**).

1.3.6. Epidermal Growth Factor (EGF) :

L'EGF augmente la synthèse de collagène de type IV et favorise ainsi l'attachement des cellules épithéliales de la glande mammaire à la membrane basale (**Monaham et al., 1988**).

Au-delà de l'action directe ou indirecte de ces hormones sur le développement mammaire, d'autres molécules jouent également un rôle primordial sur ce processus. En effet, la CEM est capable de synthétiser des facteurs aussi bien stimulateurs qu'inhibiteurs de sa propre croissance et/ou différenciation.

La cellule épithéliale mammaire sécrète au moins trois facteurs qui stimulent sa multiplication, le TGF- α , le MDGF-1 et l'IGF-1. Elle sécrète également des facteurs inhibiteurs de sa croissance (**Grosse, 1995**). C'est le cas du TGF- β , du MDGI et de l'hypothétique mammastatine. Le TGF- β inhibe principalement le développement des canaux et par voie de conséquence celui des alvéoles (**Pierce et al., 1993**).

Le facteur inhibiteur MDGI est peu abondant pendant la gestation chez la vache et sa concentration est élevée pendant la lactation (**Ollivier et al., 1991**). Le récepteur de ce facteur inhibiteur est induit par les œstrogènes pendant la lactation (**Bano et al., 1992**). Le MDGI appartient en réalité à la famille des protéines liant les acides gras et il inhibe les effets stimulants de l'EGF sur la division des cellules épithéliales (**Houdebine, 2007**).

Les cellules myoépithéliales sécrètent de l'IGF-1 qui est un puissant stimulateur de la division des cellules épithéliales (**Marcotty et al., 1994**).

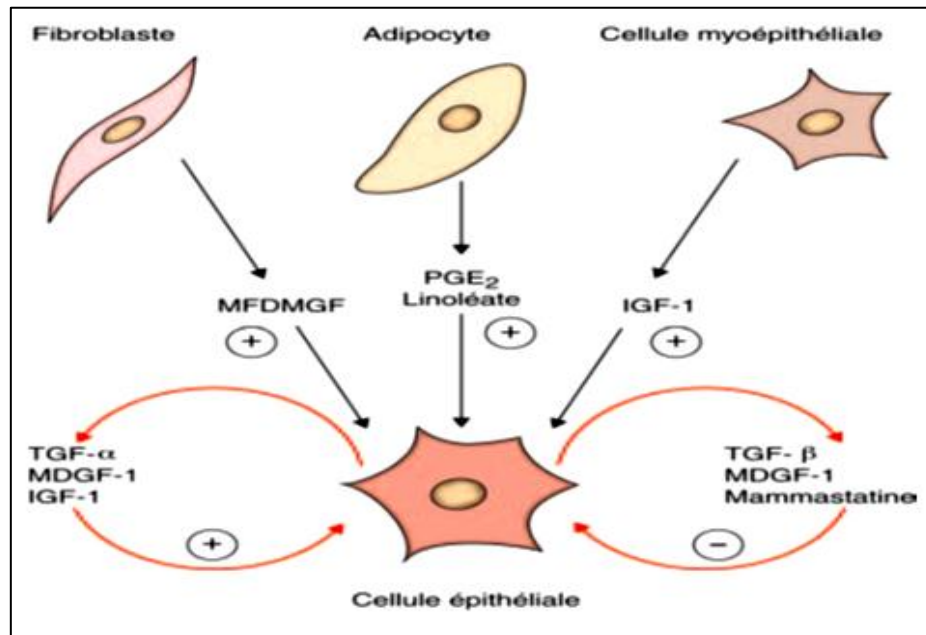


Figure 4. Principaux facteurs mammaires contrôlant la croissance des cellules épithéliales (**Houdebine, 2007**).

Les adipocytes sécrètent de la prostaglandine E2 (**Rudland et al., 1984**) et du linoléate (**Levay et al., 1987**) qui favorisent également la croissance des cellules épithéliales.

Les fibroblastes synthétisent et sécrètent un facteur qui stimule la croissance des cellules épithéliales MFGMFG et que l'on supposait spécifique de la glande mammaire s'est avéré n'être autre qu'un facteur de croissance hépatique, le HGF (Hepatocyte Growth Factor) sécrètent des enzymes protéolytiques qui déstabilisent la matrice extracellulaire et favorisent ainsi la croissance de la glande mammaire (**Pepper et al., 1995**). D'autres facteurs comme ceux de la famille des FGF (Fibroblast Growth Factor) sont à un niveau élevé pendant la croissance de la glande mammaire (**Coleman & Rosen, 1994**). Ils pourraient jouer un rôle dans l'angiogenèse.

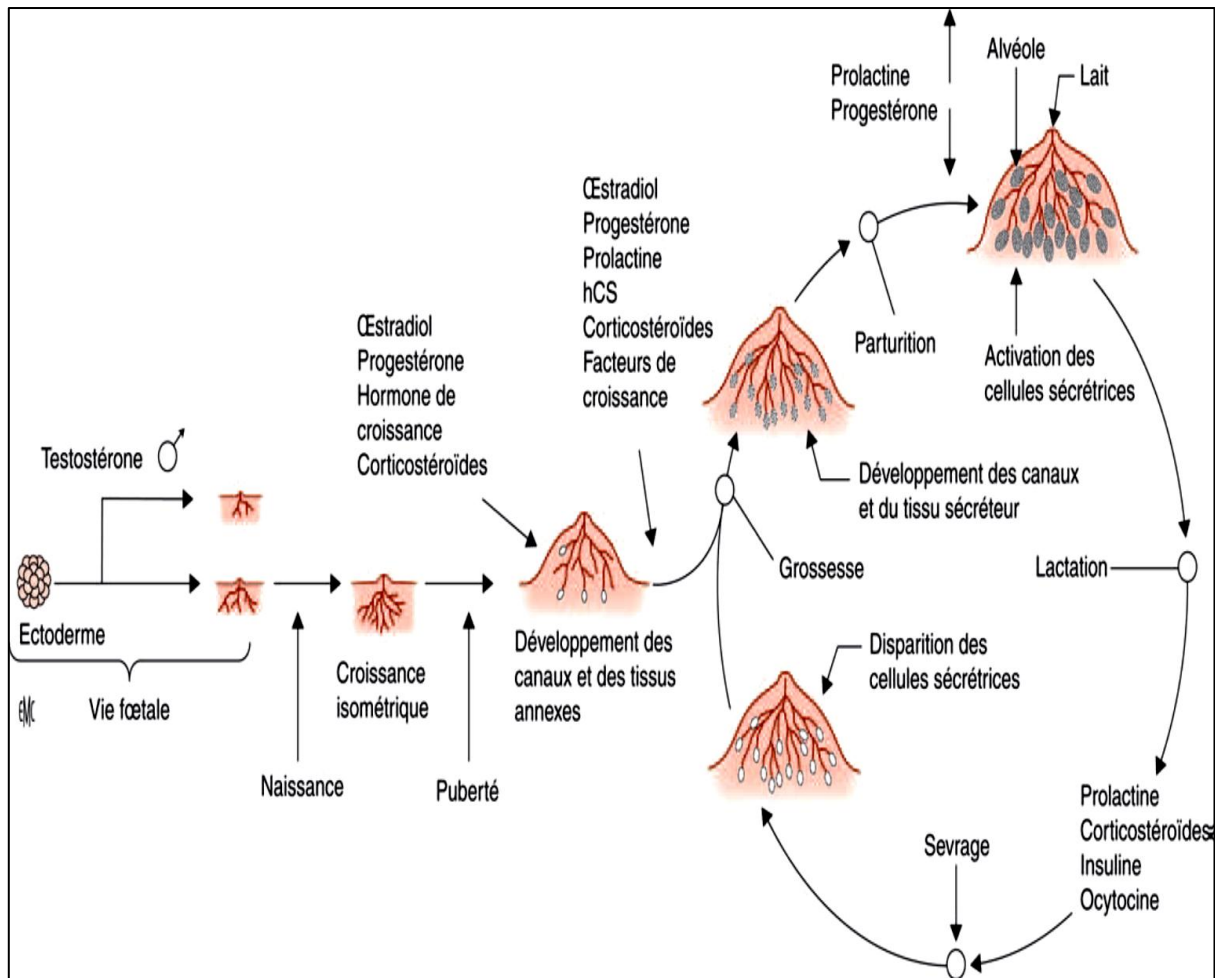


Figure 5.Principales étapes du développement de la glande mammaire
(D'après Houdebine, 2007)

2. Structure de glande mammaire en lactation :

Pendant la lactation, la glande mammaire est composée surtout de :

2.1. Cellules épithéliales : En monocouche organisées en alvéoles. Ces alvéoles sont situées à l'extrémité d'un réseau de canaux dont la fonction est de véhiculer le lait des alvéoles vers le téton

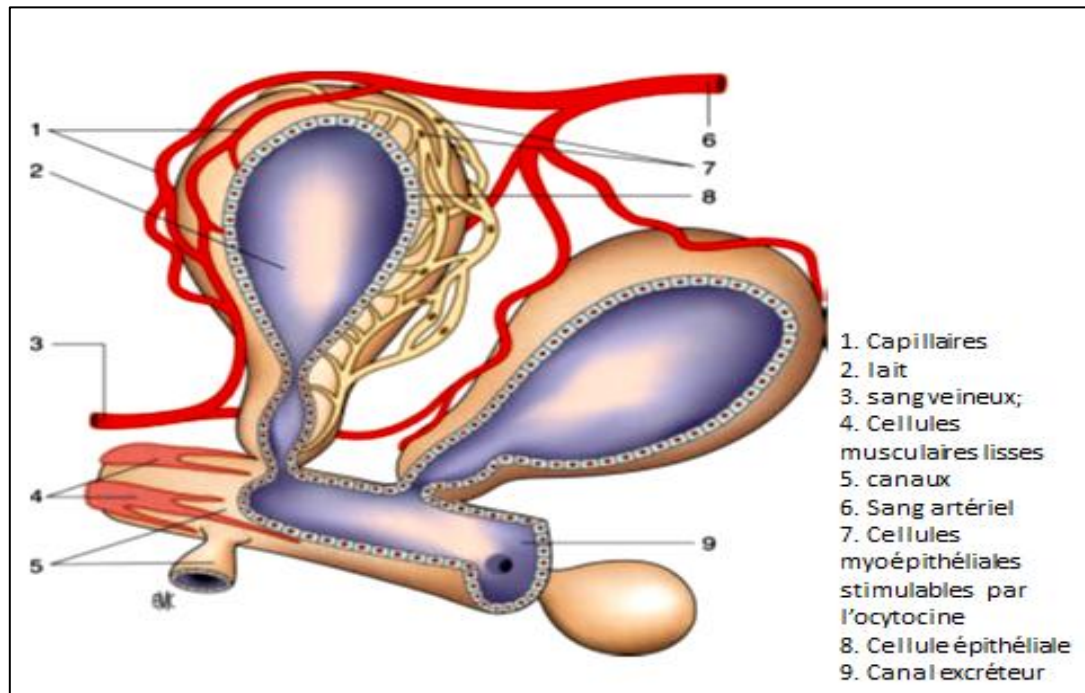


Figure 6. Structure d'une alvéole mammaire et canaux galactophores (Houdebine, 2007).

Les cellules épithéliales sont alors cuboïdales, de relativement grande taille, polarisées avec le noyau projeté du côté basal au voisinage de la circulation sanguine.

La cellule épithéliale capte les éléments précurseurs du lait (acides aminés, glucose et acétate et les transforme en lait. Les protéines et le lactose sont synthétisés et maturés dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui sont alors très abondants. Les protéines et le lactose sont transportés jusqu'à la membrane apicale à l'intérieur de vésicules qui fusionnent avec cette membrane en déversant leur contenu selon un phénomène d'exocytose.

Les lipides synthétisés par des enzymes solubles et golgiennes s'assemblent en globules qui sont sécrétés en s'entourant d'une partie de la membrane apicale

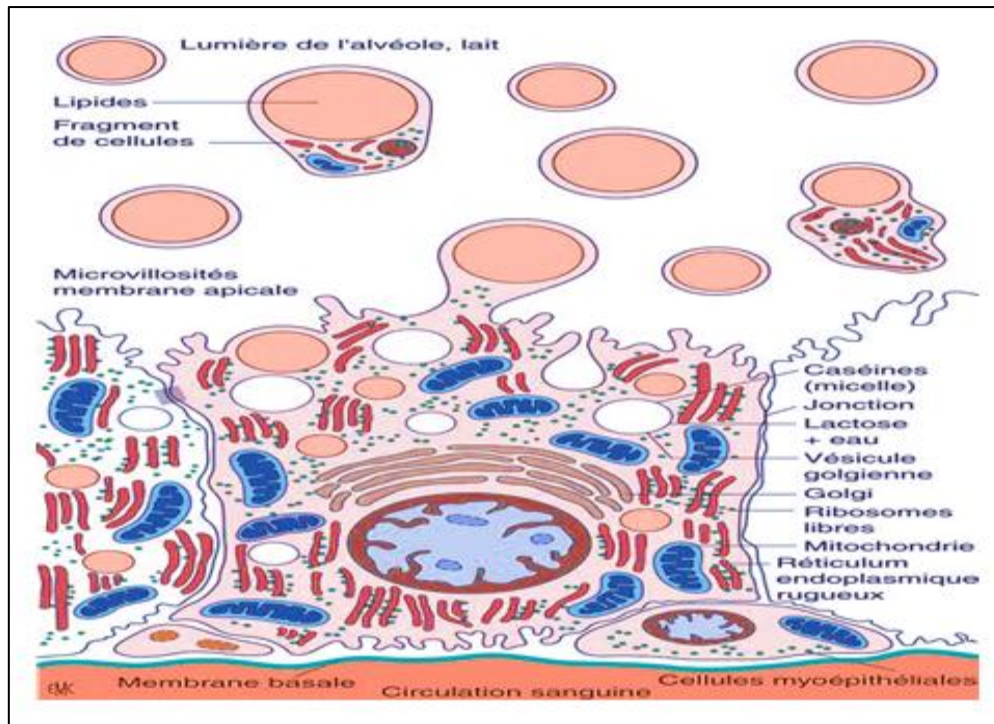


Figure 7. Représentation symbolique d'une cellule épithéliale mammaire complètement différenciée (Houdebine, 2007).

2.2. Cellules myoépithéliales : Cellules myoépithéliales se contractent sous l'influence de l'ocytocine sécrétée par la posthypophyse à chaque fois que le téton est stimulé lors de la tétée.

2.3. Fibroblastes : Contribuent à l'organisation de la matrice extracellulaire sur laquelle repose l'épithélium mammaire. Un dysfonctionnement de ces fibroblastes contribue à la désorganisation de cette matrice et peut permettre aux cellules de migrer hors de la couche épithéliale.

2.4. Adipocytes : Bien que n'étant pas strictement considérés comme des cellules mammaires, sont des partenaires indispensables à la mise en place du tissu mammaire. En effet, en absence du coussin adipeux ("fat pad"), les ébauches mammaires sont incapables de se développer et de constituer le réseau de canaux et de lobules mammaires. Les adipocytes auraient aussi la possibilité de se transformer en cellules épithéliales (Morrioni *et al.*, 2004), ce qui suggère que la capacité de transformation des cellules mammaires s'étend à ce type cellulaire.

2.5. La matrice extracellulaire : Entre le mésenchyme (fibroblastes + adipocytes) et le parenchyme (cellules épithéliales + myoépithéliales), constituée d'un certain nombre de glycoprotéines insolubles formant une sorte de gel. Ces molécules, le collagène, le laminine, les protéoglycanes ... etc (Houdebine, 2007).

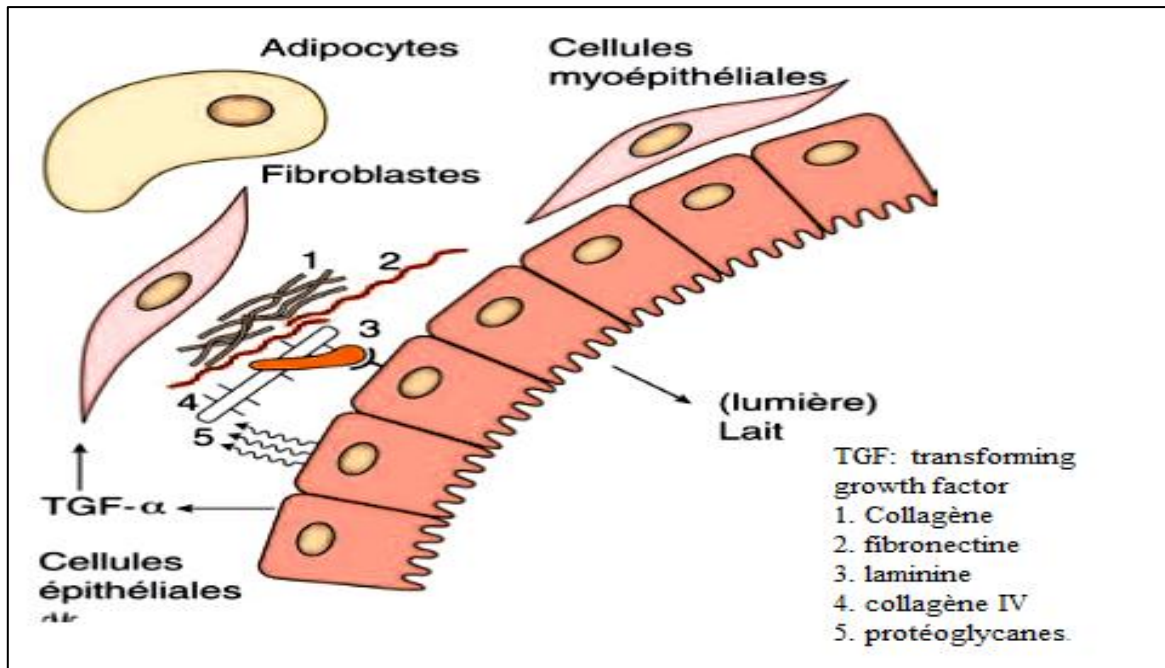


Figure 8. Organisation des cellules et de la matrice extracellulaire dans la glande mammaire différenciée (Houdebine, 2007)

En plus de cette grande variété de types cellulaires présents dans le tissu mammaire, certaines cellules présentent des aspects morphologiques et fonctionnels différents selon le stade physiologique et l'environnement hormonal (Ollivier-Bousquet & Devinoy, 2005).

C'est ainsi que les acinus de tissu mammaire non différencié sont formés de plusieurs couches cellulaires qualifiées de basales et lumbales selon leur position dans la couche épithéliale. Dans le tissu complètement différencié, les cellules basales très allongées et remplies de fibres d'actine ont une morphologie typique de cellules myoépithéliales contractiles, alors que la monocouche lumbale présente un phénotype sécrétoire très caractéristique, avec un cytoplasme rempli par tous les organites impliqués dans les synthèses des protéines et lipides du lait (Houdebine, 2007).

3. Rôle des différents types cellulaires dans l'activité de la glande mammaire :

Les cellules non épithéliales mammaires jouent en réalité des rôles essentiels dans la croissance et l'organisation de la glande (Cunha & Hom, 1996).

3.1. Les cellules adipeuses :

Des expériences ont montré que des ébauches mammaires fœtales isolées puis replacées in vivo au voisinage de tissu adipeux mammaire s'organisent pour former des alvéoles. Par opposition, les mêmes ébauches mammaires s'organisent en structures caractéristiques de la glande salivaire lorsque

le tissu adipeux provient de cette glande (**Sakakura, 1991**). Le tissu épithélial mammaire est capable de synthétiser du lait dans les deux cas sous l'influence des hormones lactogènes.

3.2. Les fibroblastes :

Coopèrent également de multiples manières avec les cellules épithéliales. Dans le clone de cellules mammaires de souris, qui est un mélange de fibroblastes et de cellules épithéliales, seules les cellules épithéliales au contact des fibroblastes accumulent de la matrice extracellulaire et sont capables de synthétiser du lait sous l'influence des hormones lactogènes (**Reichmann et al., 1989**).

3.3. Cellules souches mammaires:

L'épithélium mammaire contient aussi des cellules qui ont la capacité de s'autorenouveler, les cellules souches. Par définition, les cellules souches d'un organe sont les précurseurs directs d'un ou plusieurs types cellulaires d'un organe donné et elles sont présentes en petite quantité dans un organe, elles se multiplient à vitesse réduite en situation normale et de manière accélérée lorsque l'organe doit se développer. Les cellules souches se différencient pour donner l'organe fonctionnel, lorsque la croissance (ou la régénérescence de l'organe) est achevée, les cellules souches reprennent leur taux de renouvellement lent pour assurer leur maintien jusqu'au prochain besoin de cellules différenciées (**Houdebine, 2007**).

Les cellules souches mammaires précurseurs des cellules épithéliales et myoépithéliales ont été identifiées. Une seule de ces cellules introduite dans le tissu adipeux mammaire redonne naissance à une glande mammaire complète (**Shackleton et al., 2006**).

Il est admis depuis plusieurs années que les cellules épithéliales et myoépithéliales mammaires proviennent des mêmes cellules souches.

Ces cellules souches ne maintiennent pas toutes cette capacité d'autorenouvellement et peuvent, à certains moments de leur vie, donner naissance à des précurseurs des cellules épithéliales et myoépithéliales selon le besoin de la glande et sous le contrôle des gènes, des hormones et des facteurs de croissance (**Woodward et al., 2005**).

Elles participent alors au renouvellement du tissu mammaire au cours des cycles physiologiques de reproduction (gestation, lactation, involution). La reconstitution d'une glande mammaire à partir d'une cellule souche paraît désormais possible (**Shackleton, 2006**).

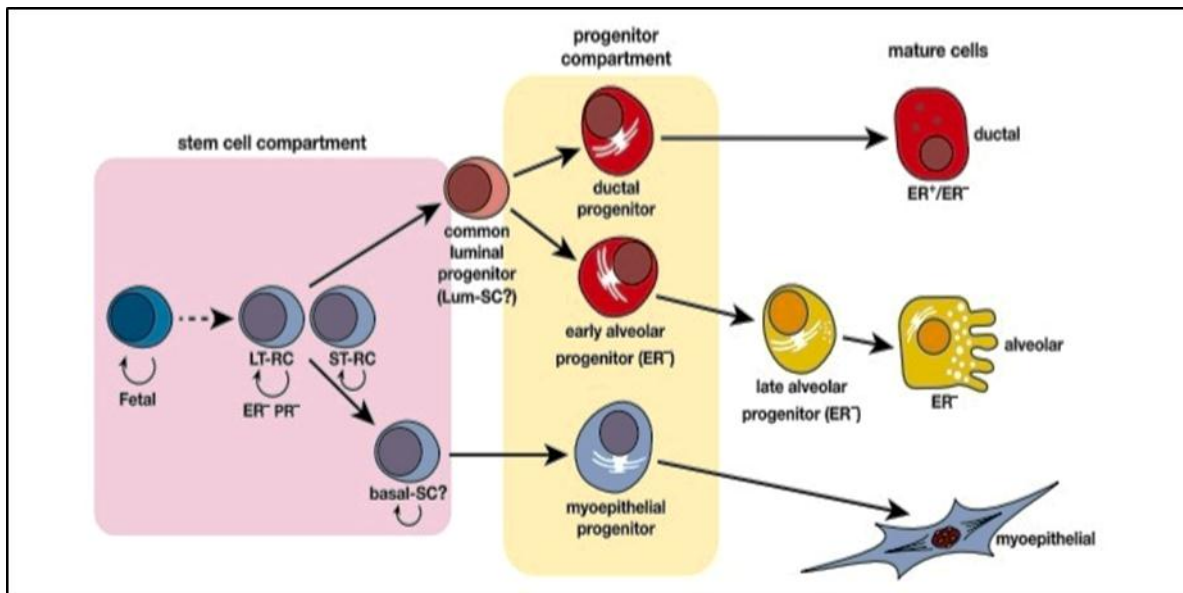


Figure 9. Modèle hiérarchie épithéliale mammaire
(Visvader & Stingl, 2014)

4. Rôle de la matrice extracellulaire :

En ce qui concerne la glande mammaire, il est admis que les fibroblastes sécrètent du collagène I qui, en soi, est relativement inerte vis-à-vis des cellules épithéliales. Ces dernières sécrètent de la laminine, du collagène IV, des protéoglycanes, de la fibronectine et d'autres composés qui sont stabilisés par le collagène I et forment la membrane basale qui stimule directement les cellules épithéliales (Petersen et al., 1992 ; Ruoslahti & Yamaguchi, 1991).

La synthèse et la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire sont régulées par ces composants eux-mêmes. La stabilité de la matrice extracellulaire est de plus contrôlée en partie par les cellules non épithéliales. Ainsi, sous l'influence des glucocorticoïdes, les cellules myoépithéliales sécrètent de l' α -2 macroglobuline qui exerce localement une action antiprotéase qui participe à la stabilisation de la matrice extracellulaire (Warburton et al., 1993).

La matrice extracellulaire, indépendamment de toute action hormonale, est donc capable d'organiser les cellules épithéliales en alvéoles. La modification du cytosquelette via les récepteurs intégrines activés joue un rôle essentiel dans cette organisation des cellules épithéliales. La laminine et la sous-unité intégrine- β 1 sont les éléments principaux qui participent à ces mécanismes (Howlett et al., 1995 ; Streuli et al., 1995). La stimulation des gènes des protéines du lait implique donc au moins la coopération de deux signaux indépendants, l'un émanant du récepteur intégrine, l'autre du récepteur de la prolactine.

Dans le même ordre d'idée, il est intéressant de noter que l'équilibre entre les activités protéolytiques et anti protéolytiques de la glande mammaire varie au cours du cycle gestation-lactation-sevrage. Pendant la gestation, l'équilibre se déplace légèrement en faveur des protéases. Cela autorise la division des cellules épithéliales et leur organisation en alvéoles. La matrice extracellulaire forme un gel qui séquestre toutes sortes de molécules, comme le ferait une éponge. La destruction de gel libère certaines de ces molécules et en particulier des facteurs de croissance qui peuvent alors atteindre leurs cellules cibles et délivrer leurs messages (**Vukicevic et al., 1992**). La matrice extracellulaire joue en fait un rôle encore plus complexe. Elle constitue un frein pour la division et la migration des cellules épithéliales. Tout au long du cycle gestation-lactation-sevrage,

La glande mammaire se construit et se détruit en modifiant la composition de sa matrice extracellulaire. Des équilibres entre la biosynthèse de la matrice extracellulaire et l'action d'enzymes protéolytiques assurent ces modifications subtiles. Tout au long de la lactation, l'équilibre est très en faveur des activités antiprotéasiques, ce qui assure la stabilité de la glande mammaire dont la structure ne change pas à ce stade. Après le sevrage, l'involution de la glande mammaire s'accompagne d'une augmentation massive des protéases et d'une inhibition des antiprotéases. L'induction de l'apoptose des cellules épithéliales précède l'apparition des protéases et l'ensemble de ces phénomènes est retardé par les glucocorticoïdes (**Lund et al., 1996**).

5. Actions des œstrogènes sur la division des cellules épithéliales mammaires :

Les œstrogènes ont une action puissante mais indirecte sur la division des cellules épithéliales mammaires :

Une étude réalisée il y a plusieurs années a contribué à expliquer le mécanisme d'action des œstrogènes (**Monahan et al., 1988**). Les œstrogènes stimulent la sécrétion d'un facteur de croissance, le **TGF- α** , par les cellules épithéliales. Dans le même temps, les œstrogènes provoquent une augmentation des récepteurs d'un autre facteur mammaire, le **MDGF-1** (Mammary Derived growth Factor). Les œstrogènes induisent également une déstabilisation modérée de la matrice extracellulaire (**Houdebine, 2007**). Le TGF- α , comme son homologue l'**EGF**, stimule la synthèse de certains composants de la matrice extracellulaire comme le collagène IV. Le système tend à s'autolimiter de cette manière, puisque l'action des œstrogènes induit d'abord une déstabilisation de la matrice extracellulaire puis dans un second temps, au contraire, sa consolidation.

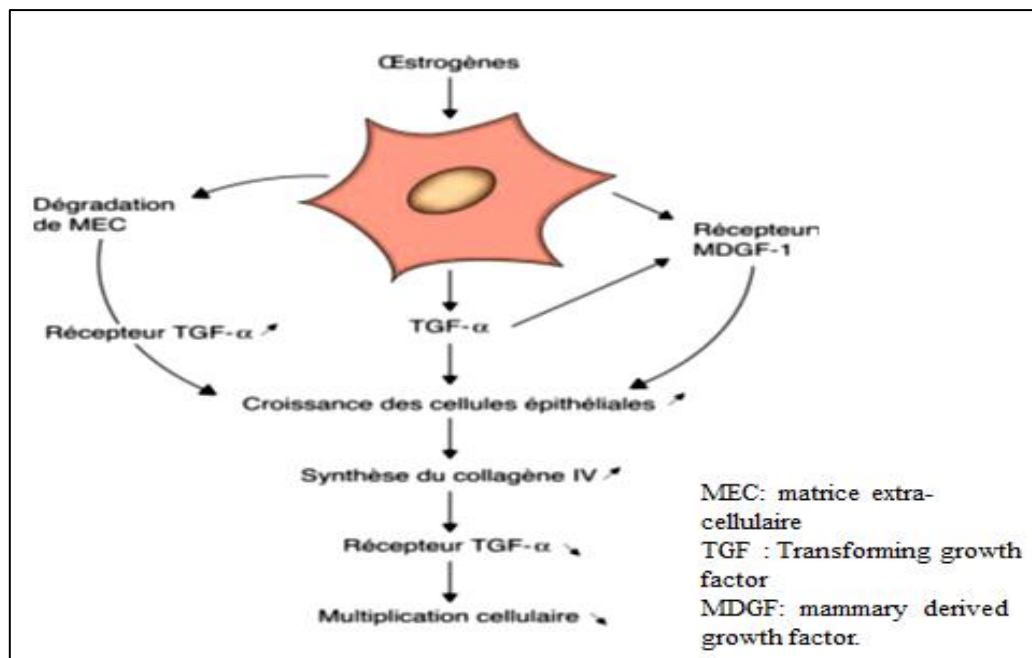


Figure 10. Action des œstrogènes sur la matrice extracellulaire et les facteurs de croissance mammaire (Houdebine, 2007).

6. Mécanismes d'action des œstrogènes et de la progestérone :

Les œstrogènes et la progestérone dérivés du cholestérol, en plus de leurs diverses actions sur l'endomètre, l'utérus, les ovaires et l'axe gonadotrope, ils influent sur le développement de la glande mammaire au cours des événements de la vie génitale. Ces actions passent principalement par des récepteurs spécifiques de ces hormones, le récepteur des œstrogènes (ER) et le récepteur de la progestérone (PR). En plus de son action nucléaire comme facteur de transcription, de récentes recherches ont mis en évidence la présence et l'action des récepteurs via une voie membranaire. Ceci a permis de définir deux mécanismes d'action de ER et PR : la voie « classique » dite génomique ou nucléaire, et la voie « non classique » dite non génomique, extranucléaire ou membranaire (Arnal et al., 2017; Saczko et al., 2017).

6.1. Voie d'activation « classique » dite génomique ou nucléaire :

Le récepteur va agir comme un facteur de transcription au niveau de séquences cibles des œstrogènes et de la progestérone. Il va alors induire l'expression de gènes cibles de manière directe, en s'associant à des séquences d'ADN, ou de manière indirecte, via des interactions avec d'autres facteurs de transcription permettant le recrutement de co-activateurs nécessaires à l'activation de la machinerie transcriptionnelle.

6.2. Voie d'activation non génomique ou membranaire :

Parallèlement aux effets génomiques précédemment décrits, il existe des effets dits « rapides ». Il s'agit d'une voie « non-classique » dite non-génomique ou membranaire. Celle-ci est caractérisée par des effets rapides des stéroïdes de l'ordre de la seconde à la minute, ils sont trop rapides pour être associés à une action transcriptionnelle.

La fixation de l'hormone sur le récepteur conduit à la mise en place rapide d'une signalisation extra-nucléaire qui se traduit par la stimulation de cascades de kinases (des protéines kinases (comme Src et PI3K) ou des protéines G) conduisant à des cascades de signalisation.

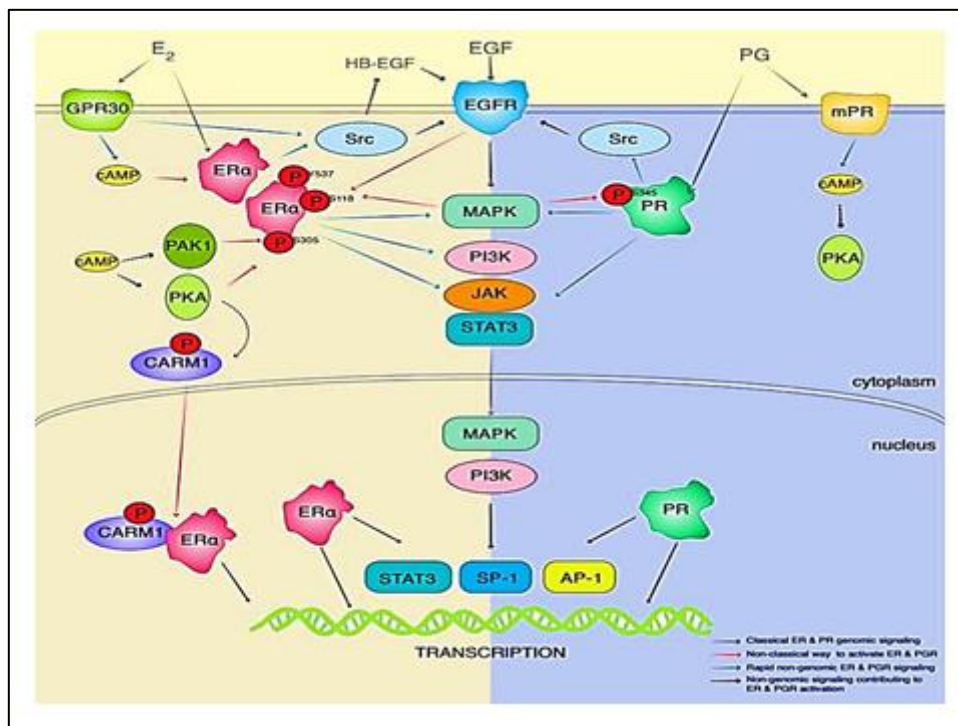


Figure 11.Intégration des voies de signalisation nucléaires et membranaires des RE et PR (d'après Tanos et al., 2012).

7. Utilisation des extraits de plantes pour stimuler la sécrétion lactée :

Toutes les civilisations ont utilisé et utilisent encore des extraits de plantes dans leur pharmacopée. Cela est particulièrement net en ce qui concerne la sécrétion lactée chez la femme. Plusieurs plantes sont recommandées dans les divers continents. Il est frappant de constater que ce sont parfois les mêmes plantes qui sont utilisées par les habitants de deux continents qui n'ont pas pu se communiquer leurs recettes (**Houdebine, 2007**).

Ces plantes du point de vue d'un intérêt médicinal ou alimentaire, sont de plus en plus consommées du fait d'une perception de leur innocuité comparée aux galactologues médicamenteux. En effet, elles sont, pour la plupart, listées « généralement reconnues comme sûres » (GRAS, Generally Reconized As Safe) par l'agence des aliments et des médicaments (FDA, Food and Drug Administration) aux États-Unis (**Marasco, 2008**). Cependant, leur utilisation n'est pas toujours sans danger, même pour certaines épices, utilisées à des doses thérapeutiques, avec l'apparition d'effets indésirables comme des troubles gastro-intestinaux (chardons, luzerne, asperge sauvage) ou des réactions allergiques (luzerne, anéthol). D'autres plantes doivent être évitées pendant la grossesse à cause de leurs effets potentiellement ocytociques, pouvant entraîner des fausses couches, ostrogéniques (anis vert) ou tératogènes (asperge à grappe).

Les galactologues (aussi appelés galactogènes ou galactagogues) sont des substances qui sont supposées faciliter l'initiation, le maintien ou l'augmentation de la production de lait maternel et sont classées en deux catégories : les galactologues pharmacologiques et les ingrédients fonctionnels comme certains extraits végétaux (**Brodribb, 2018**).

Les potentiels effets galactologues de ces plantes s'expliqueraient par une grande diversité de mécanismes d'action du fait de la grande variété de leurs composés bioactifs. La majorité de ces extraits végétaux agissent en augmentant la sécrétion de prolactine, soit par le biais d'un antagoniste de la dopamine comme l'anéthol (fenouil ou anis vert), soit par le biais d'autres molécules favorisant sa synthèse, comme les saponines stéroïdes (asperge à grappe) ou les phytoestrogènes tels que le sitostérol (orge) (**Javan et al., 2017**).

L'utilisation d'extraits de plantes à effet galactologue est de plus en plus courante. En effet, de nombreuses plantes sont utilisées depuis plus de 2000 ans dans les médecines traditionnelles notamment persane, chinoise et méditerranéenne, pour augmenter la production de lait (**Abascal & Yarnell, 2008 ; Wani & Kumar, 2016**). La demande des mères pour l'utilisation de ces plantes est en augmentation constante depuis le début des années 2000 (**Bazzano et al., 2016**). et il est estimé qu'aujourd'hui entre 15 et 25% des mères ont recours à l'utilisation d'extrait végétal pour favoriser leur production de lait (**Forinash, 2012**), pourtant, peu d'études scientifiques permettent de mettre en

évidence un effet direct de ces plantes sur la production de lait. De nouvelles études aussi bien expérimentales que cliniques sont donc nécessaires afin de confirmer l'efficacité et la sécurité de ces extraits de plantes avant d'envisager de les recommander en tant que galactologues (**Forinash, 2012; Abascal & Yarnell, 2008**).

Partie II

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes:

Cette étude fait partie des activités de recherche de *Dr. Boulehel* et s'inscrit dans le cadre de l'étude immunohistochimie (IHC) de la glande mammaire des lapines allaitantes ainsi que ses modifications histologiques durant ce stade physiologique.

L'objectif de ce présent travail est l'étude de l'effet du *Bunium incrassatum* (Talghouda) sur l'immunoexpression des récepteurs des œstrogènes et de la progestérone dans la glande mammaire en lactation.

1. Matériel utilisé:

1.1. Matériel végétal:

➤ *Bunium incrassatum*: une plante aromatique et médicinale de la famille des ombellifères (Apiaceae), largement distribuée dans l'est de l'Algérie et appelé communément (Talghouda), ses racines sont assez nutritives et peuvent être consommées directement crues. C'est une plante d'importance économique croissante.

-Nom botanique : *Bunium incrassatum*.

-Nom vernaculaire : Tanghouda / Talghouda.

-synonymes : *Bunium bulbocastanum*, *Bunium pachypodum*.

-Famille botanique : Apiacées (Ben Ziane & Yousfi, 2001).

➤ Description morphologique:

Plante vivace, herbacée à racine renflée en tubercule arrondi peu odorante. Tiges grêles de 10-50 cm de hauteur, robustes, feuilles à divisions linéaires, fruits non reliés au sommet.



Figure 12. Description morphologique de *Bunium incrassatum* (Benziane & Yousfi, 2001).

➤ **Constituants chimiques de la *Bunium incrassatum*:**

Selon l'étude menée par (Bousetla et al 2011), la composition chimique des racines de cette plante contient du Saccharose, Acide oléique, Scopolétine, Scoparone et le β -sitostérol et d'autres composés tel que le β -Caryophyllène dans ses huiles essentielles.

1.2. Matériel animal:

La présente étude est portée sur trois lapines de la population locale au cours de la période de lactation. Le lapin est un modèle essentiel en recherche scientifique car il offre beaucoup d'avantages dans le domaine de la reproduction, et permet la mise en évidence de quelques processus reproducteurs. Deux lapines ont reçu un régime standard (fibre, gruau, orge) pendant la lactation 10j et 20j respectivement à partir de la mise bas jusqu'au sevrage, et la troisième lapine a reçu une ration enrichie en Talghouda d'un taux de 2% du régime total, ce qui est équivalent à 5 g/j combiné à un régime quotidien pendant la durée de lactation (20j) à partir de mise bas jusqu'au sevrage.

1.3. Matériel non biologique:

L'expérimentation nécessite l'utilisation d'autres matériels tels que : Les portoirs, les ciseaux, les bavettes, les gants, les pinces, table d'anatomie, pissettes, les lames bistouris, la balance à précision, des tubes à essai de sang anticoagulants stériles (EDTA, Héparine) ...etc.



Figure 13.Matériel non biologique (Photo originale).

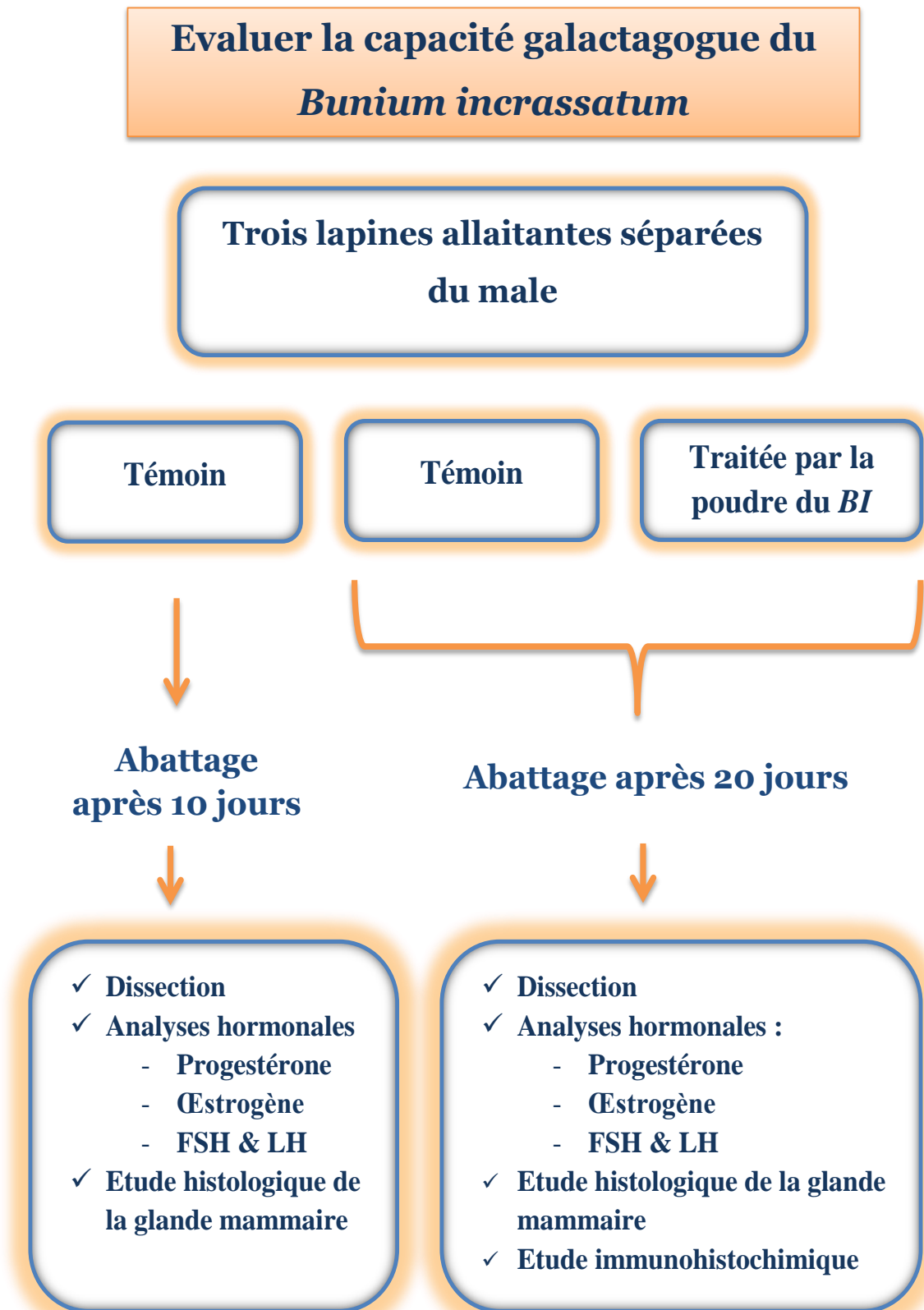


Figure14. Schéma récapitulatif du protocole expérimental

2. Etude histologique:

L'étude histologique se déroule en une série d'étapes successives obligatoires qui vont aboutir à l'obtention de coupes fines prêtes à recevoir la coloration histologique. Le protocole expérimental est résumé dans les étapes suivantes:

2.1. Prélèvement et Fixation:

Le prélèvement doit se faire aussi délicatement que possible afin de ne pas dégrader l'organisation tissulaire. Nous avons procédé à l'abattage du lapin témoin à la date 09 / 03 /2023 à 08 h 30 min dans les laboratoires pédagogiques de l'université de Larbi Ben M'hidi, une fois obtenu ce prélèvement, doit immédiatement être immergé dans un grand volume de liquide fixateur.



Figure 15. Dissection de la lapine (Photo originale).

❖ Prélèvement de sang:

Le sang a été recueilli dans des tubes EDTA et des tubes héparinés pour l'analyse de divers paramètres hormonaux (progestérone et œstradiol, FSH, LH). Les analyses ont été effectués dans le laboratoire DJEBBAR. Oum-El-Bouaghi.

❖ Prélèvement des glandes mammaires pour l'étude histologique:

Les glandes mammaires nettoyées et pesées. Et après, elles ont été fixées dans le formol (10%). Les échantillons sont transportés au laboratoire d'anatomie pathologique *Dr Khalfaoui*. A pour l'étude histologique.

Le but de la fixation est la conservation des structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant avec l'arrêt de toutes activités mitotiques et enzymatiques. Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol dilué à 10%. La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements.



Figure 16. Prélèvement sanguin, prélèvement et fixation de GM (**Photo originale**).

2.2. Déshydratation :

La déshydratation permet d'extraire toute l'eau du tissu, obtenue par le passage du prélèvement dans des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes (de l'alcool dilué 70° jusqu'au alcool absolu à 100°).

Tableau 01.Le processus de la déshydratation

l'alcool	70%	80%	90%	100%	100%	100%
Temps	1h et 30min	1h et 30min	1h et 30min	1h	1h	1h

2.3. Imprégnation:

Par le passage du prélèvement dans un liquide intermédiaire afin d'éliminer les traces de l'alcool absolu. On utilise dans cette étape le xylène ou le toluène (solvant intermédiaire favorable aux échanges membranaires entre **l'alcool**↔**toluène** d'une part et **toluène**↔**paraffine** d'une autre part).

Tableau 02.Les solutions de l'imprégnation

Bain 1 : Toluène	Bain 2 : Toluène
1h et 30min	1h et 30min

2.4. Inclusion et mise en bloc :

Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines (d'une épaisseur de 2 à 5 μm) et régulières, le milieu de l'inclusion utilisé est la paraffine (résine blanche opaque). Le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (chauffée à 56°C pendant 4h dans une étuve).

La pièce subit 3 bains de paraffine de 8 heures chacun, la paraffine liquide est coulée dans un petit moule en métal " Barres de Leuckart". Une fois l'échantillon bien imprégné on le laisse refroidir dans un congélateur pendant toute une nuit,

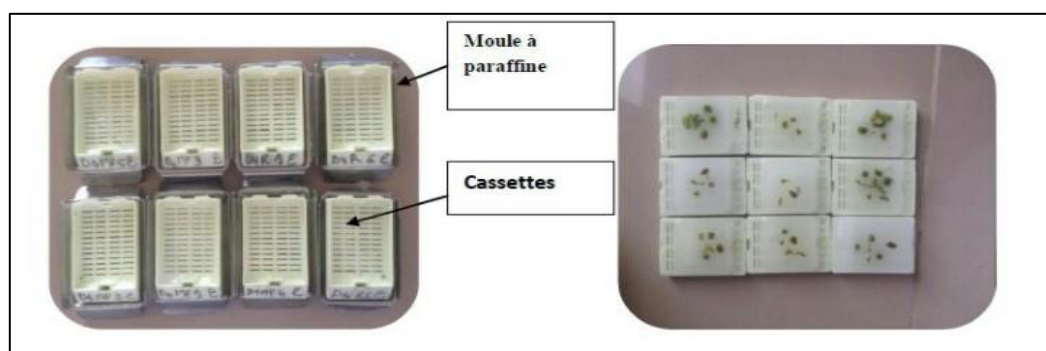


Figure 17. Inclusion au paraffine (Bensalem et al.,2020)

2.5. Confection et étalement des coupes(Microtomie) :

La production de coupes de bonne qualité dépend en grande partie de la préparation du tissu aux étapes de la fixation, imprégnation et inclusion.



Figure 18. Microtomie et étalement des coupes sur les lames (Photo originale).

Après l'installation du bloc sur le microtome, le rabotage commence en ajustant l'échelle à 20 ou 15 μm . Lorsque la pièce apparaît dans le plan de coupe on ramène l'échelle à 4 μm pour obtenir des coupes fines sous forme de rubans, à l'aide d'une aiguille on dépose le ruban obtenu dans un bain

marie afin d'éliminer les plis. Les coupes de 4 μm d'épaisseur ont été recueillies sur des lames couvertes d'eau distillée et déposées sur une plaque chauffante à 37°C pour permettre un bon étalement puis placées à l'étuve à 60°C pendant 1 heure afin d'assurer une bonne adhérence des coupes sur les lames.

2.6. Coloration :

Elle permet d'obtenir des préparations claires et faciles à interpréter lors de l'observation microscopique afin de distinguer les différents tissus, les colorants utilisés en histologie sont plus ou moins sélectifs la plupart sont des composants acides ou basiques. La coloration la plus utilisée est l'hématoxyline – éosine (HE). L'hématoxyline est une substance basique qui colore les noyaux en violet, l'éosine est une substance acide qui colore les cytoplasmes en rose. Les coupes ne seront pas prêtes à recevoir les colorants qu'après les deux étapes suivantes : le déparaffinage et l'hydratation.

Tableaux 03. Le processus de la coloration

Xylène 1	3 à 5 minutes
Xylène 2	3 à 5 minutes
Alcool 100%	2 minutes
Alcool 90%	2 minutes
Alcool 80%	2 minutes
Alcool 70%	2 minutes
Eau distillée	05 minutes.
Hématéine	3 - 4 minutes
Eau courante	20 à 30 minutes
Eosine	2 minutes
Rinçage à l'eau courante	
Alcool 70%	2 minutes
Alcool 80%	2 minutes
Alcool 90%	2 minutes
Alcool 100%	2 minutes
Xylène 1	2 minutes
Xylène 2	2 minutes

2.7. Montage et observation microscopique :

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique et observées au microscope optique à différents grossissements. L'observation des coupes histologiques a été réalisée dans les laboratoires pédagogiques de l'université de Larbi Ben-Mhidi.

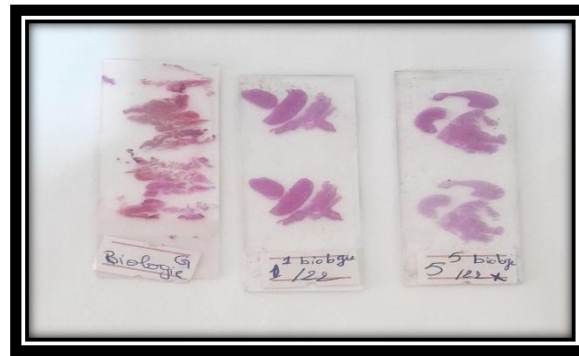


Figure 19. Lame montée et colorée (Photo originale).

Les étapes de l'étude histologique sont résumées dans le protocole suivant :

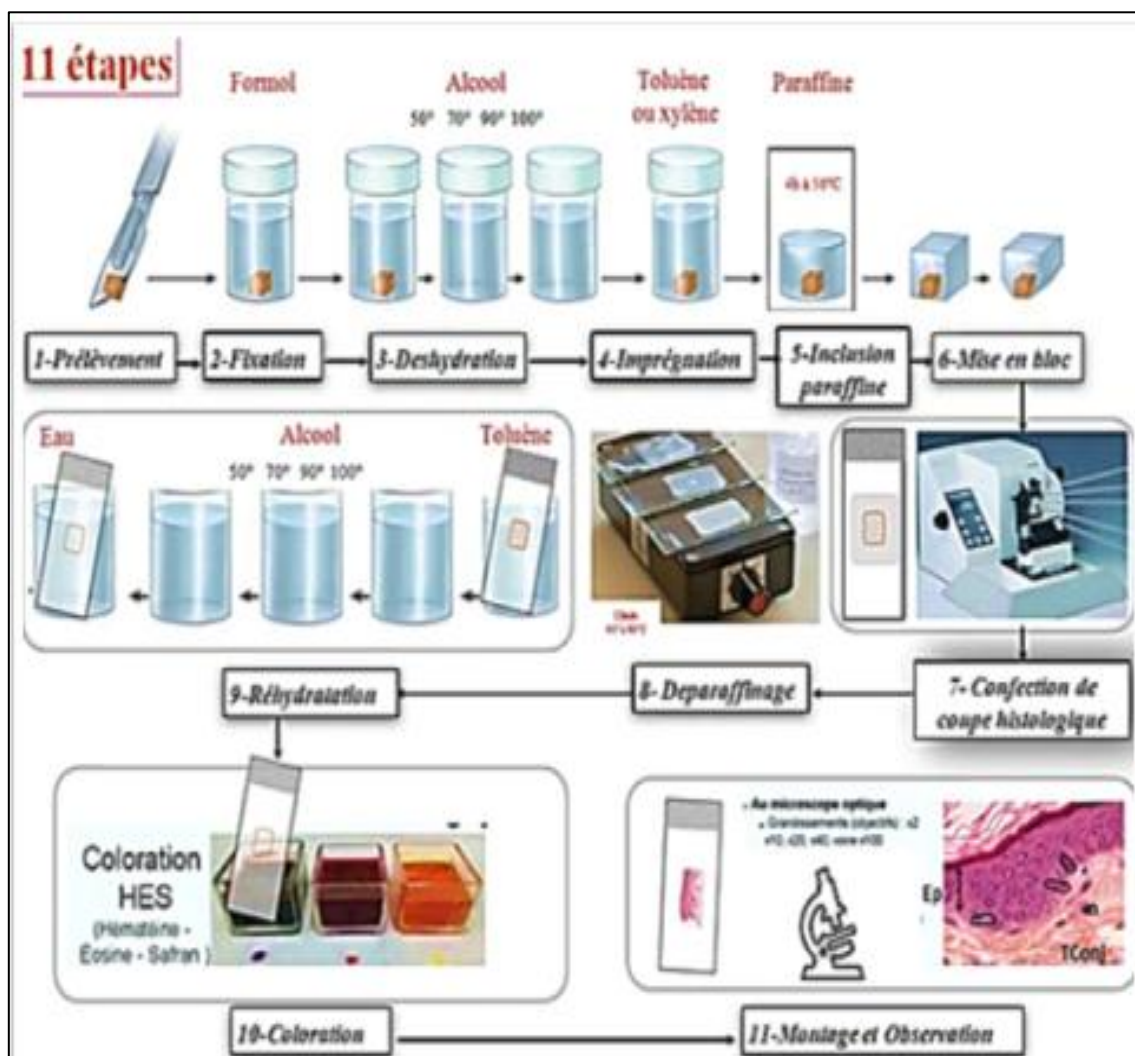


Figure 20. Le protocole expérimental de l'étude histologique
(<https://www.google.com/search/fiche+technique+tp+histologie-8>)

3. Etude immunohistochimique:

La technique immunohistochimique a pour but d'évaluer l'effet du *B. incrassatum* (BI) sur l'immunoexpression des récepteurs des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR), dans la glande mammaire des lapines au cours de lactation, cette technique a été réalisée au laboratoire d'anatomie pathologique Dr Ben Bacha Fayçal Bordj Bou Arreridj.

L'immunohistochimie est une technique associant l'immunologie et l'histochimie, elle permet de démontrer la présence ou l'absence d'une protéine - dans les cellules d'une coupe de tissu inclus en paraffine - ainsi que sa localisation.

➤ Principe :

Le principe de base de l'immunohistochimie est très simple. Son but est de mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques (par exemple: filaments intermédiaires), nucléaires (par exemple: récepteurs hormonaux) ou membranaires spécifiques à un type ou à une fonction cellulaire, à l'aide d'anticorps dirigés contre cette protéine aux propriétés antigéniques. Les anticorps spécifiques utilisés en immunohistochimie sont obtenus de deux façons différentes :

- Immuniser un animal (souris, lapin, cobaye) en lui injectant l'antigène donné et Recueillir ensuite son sérum pour le purifier et isoler ensuite un **anticorps polyclonal**.
- Immuniser un animal (souris), recueillir ses lymphocytes mettre celle - ci en Culture, et après purification du surnageant de la culture. Obtenir un **anticorps monoclonal**.

➤ Protocole :

3.1. Déparaffinage et la réhydratation:

Pour réaliser la technique d'immunohistochimie on doit passer par les mêmes étapes d'histologie jusqu'à l'obtention d'une coupe étalée sur une lame. Les étapes d'IHC commencent juste après que les lames son déparaffinées et réhydratées dans l'eau courante (1 bain de 3 minutes).

Tableau 04. Le processus du déparaffinage

Xylène	Xylène	Xylène	Xylène	l'alcool	l'alcool	l'alcool
5 min	5 min	5 min	5 min	2 min	2 min	2 min

3.2. Prétraitement – démasquage:

Quand on fixe un échantillon de tissu avec un fixateur à base de paraformaldéhyde (PFA) ou de formaldéhyde (formol), les protéines de l'échantillon sont cross-linkées de façon covalente. Cela permet de préserver l'architecture du tissu. Cependant un démasquage des sites antigéniques est nécessaire après la fixation car cette dernière induit un changement de conformation des épitopes et donc une mauvaise reconnaissance de l'antigène par l'anticorps correspondant. Au laboratoire d'anatomie pathologique Dr Ben Bacha Fayssal Bordj Bou Arreridj., on a soumis les coupes à un démasquage thermique (HIER pour Heat-Induced Epitope Retrieval). Dans ce cas les lames sont placées dans un bain de tampon citrate à pH = 6 à la cocotte-minute pendant 15 min.

Les lames sont retirées ensuite, et laissés refroidir (20 à 25 min) avant d'appliqué les anti_ corps. Après le séchage des lames, un cercle est dessiné autour de la zone fixée sur la lame avec le crayon hydrophobe (Dako Pen) pour faciliter le dépôt de l'AC primaire. Le démasquage thermique est contrôlé par 4 paramètres: la température absolue à laquelle il est effectué, le pH de la solution de démasquage, la nature de la solution de démasquage, la durée du traitement.

3.3. Blocage des peroxydases endogènes :

La solution de blocage (Peroxide Block) est appliquée sur la coupe tissulaire, avant l'incubation avec l'anticorps primaire. L'ajout de la solution de blocage *Peroxyde Block* (peroxydase + eau oxygénée (H₂O₂)) sur la zone limitée par le Dako Pen (05 min) pour empêche l'activité de la peroxydase endogène.

3.4. Application de l'anticorps primaire :

L'ajout de l'anti corps (AC) post_ primaire (30min) puis rinçage par le PBS (05min).

3.5. Application de l'anticorps secondaire :

En ajoute l'AC polymère pendant 30 min et on fait un autre rinçage avec le PBS (05min).

3.6. La révélation par la diaminobenzidine (DAB) :

La joute une goutte du chromogène de la peroxydase (DAB) sur chaque lame (05min) puis un rince avec l'eau distillée (05min) puis le PBS (05min).

L'activation enzymatique du chromogène génère un produit de réaction visible au niveau du site antigénique (taches marrons).l'apparition des taches marron résultants de la réaction enzymatique entre la peroxydase et le chromogène DAB.

3.7. Contre coloration:

En fin de révélation, immergées les lames dans un bain d'hématoxyline pendant (03 min). Puis rinçage avec l'eau courant (03-05min).

3.8. Montage :

Pour le montage, on utilise 01 goutte des milieux de montage tel que (le Dako ou Faramount Aqueous Mounting Medium) sur la lame, cette dernière est couverte ensuite avec une lamelle et observation microscopique. L'observation des coupes a été réalisée dans les laboratoires pédagogiques de l'université de Larbi Ben-Mhidi

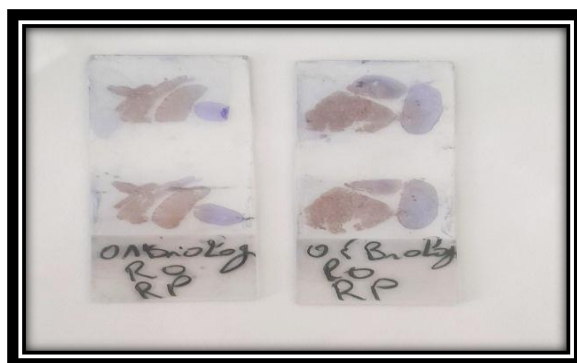


Figure 21. Lame montée et colorée (Photo originale).

Le protocole expérimental est résumé dans les étapes suivantes:

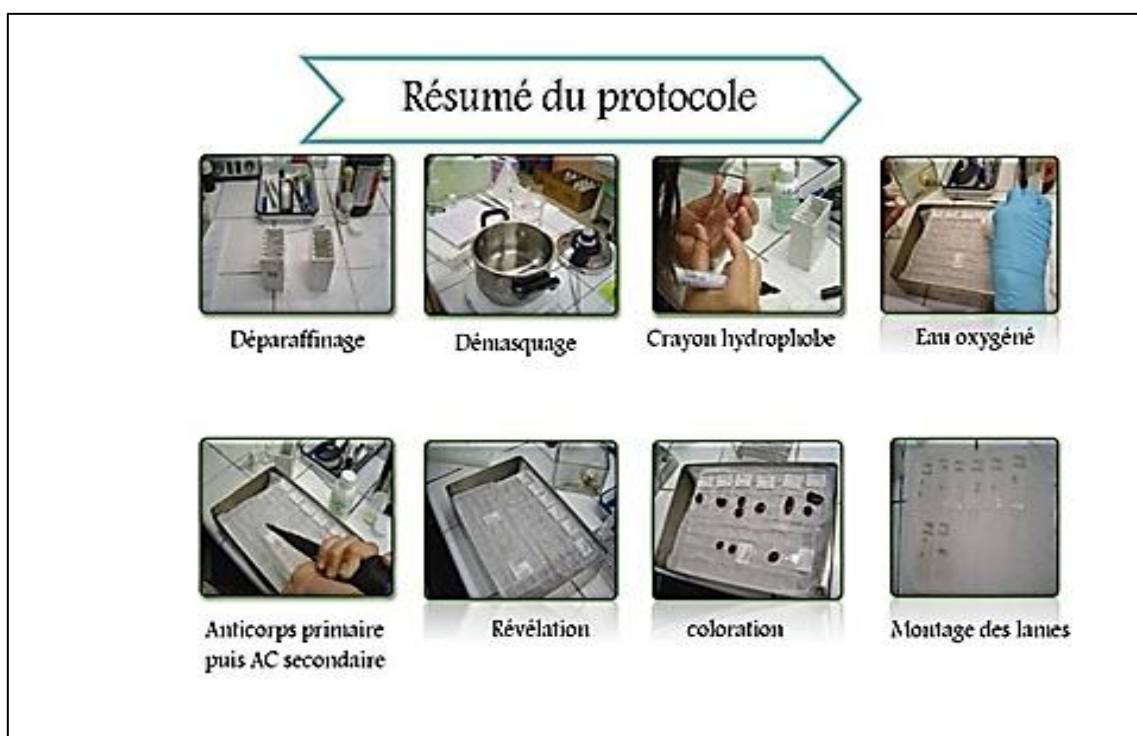


Figure 22. Le protocole expérimental de l'étude immunohistochimie (<https://slideplayer.fr/slide/immunohistochimie>)

Partie III

Résultats et discussion

1. Résultats des paramètres hormonaux :

1.1. 10^{ème} j – 20^{ème} j de lactation(TM) :

1.1.1. Les œstrogènes et la progestérone:

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes.

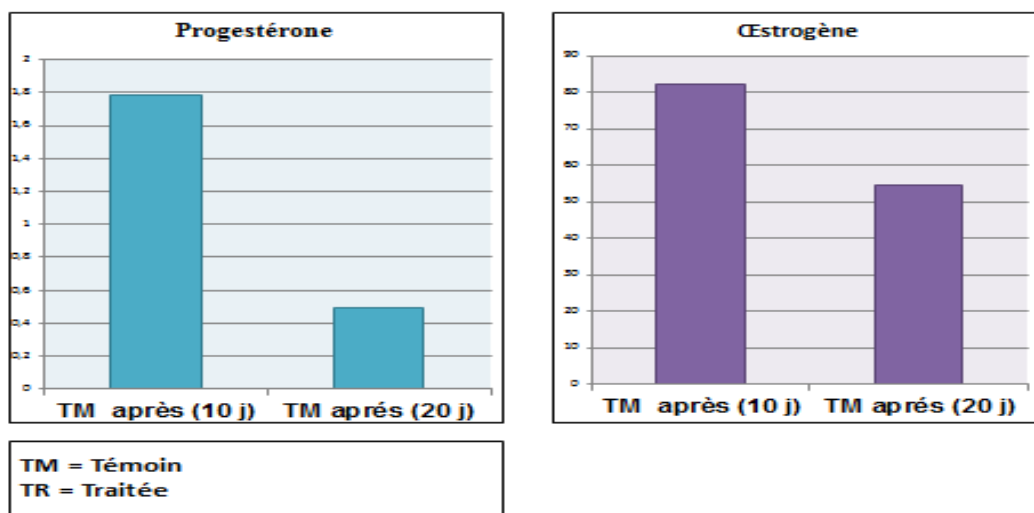


Figure 23. Représentation graphique des variations des taux des œstrogènes et de la progestérone chez les lapines (TM).

Selon la figure nous observons une diminution dans le taux de la progestérone et l'œstrogène chez la lapine (TM) après 20j par rapport à la lapine (TM) après 10j

1.1.2. FSH et LH :

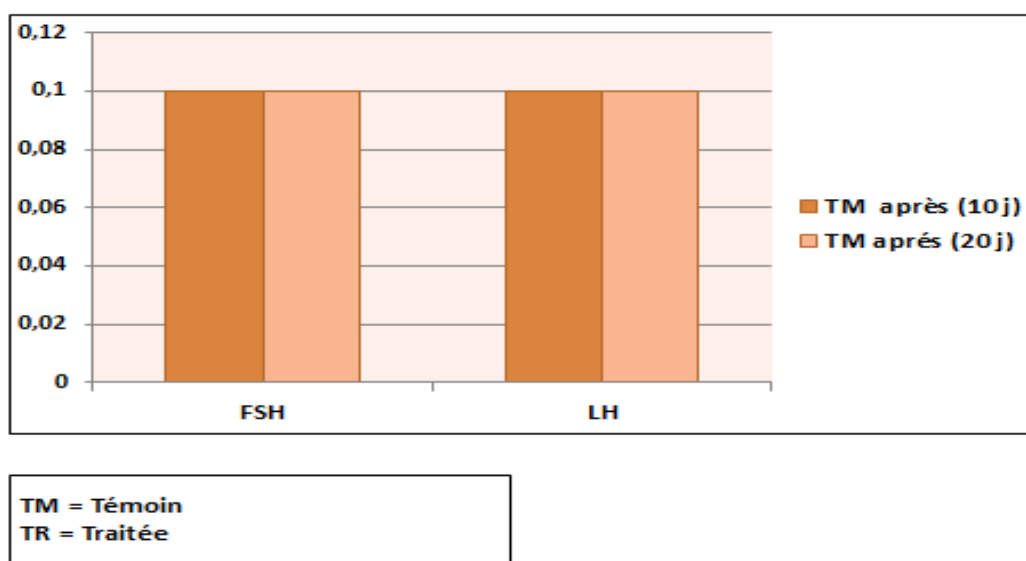


Figure 24. Représentation graphique des variations de FSH et LH chez les lapines (TM)

1.2. Effet du *B. incrustatum* sur les paramètres hormonaux:

1.2.1. Les œstrogènes et la progestérone:

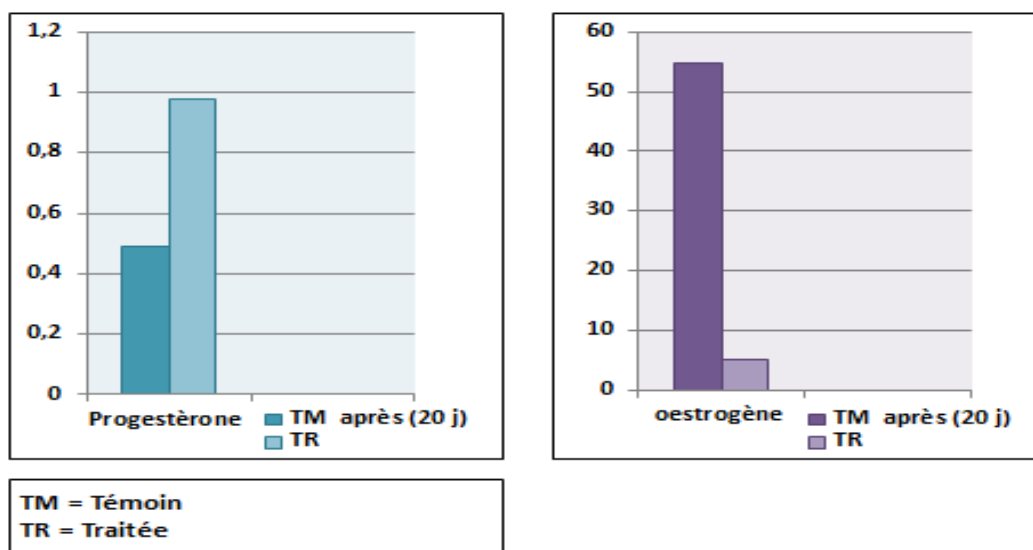


Figure 25. Représentation graphique des variations des taux de œstrogènes et de la progestérone chez les deux lapines (TM) et (TR)

Une augmentation significative dans le taux de la progestérone chez la lapine traitée par rapport au témoin, par contre les œstrogènes ont diminué d'une façon remarquable.

1.2.2. FSH et LH:

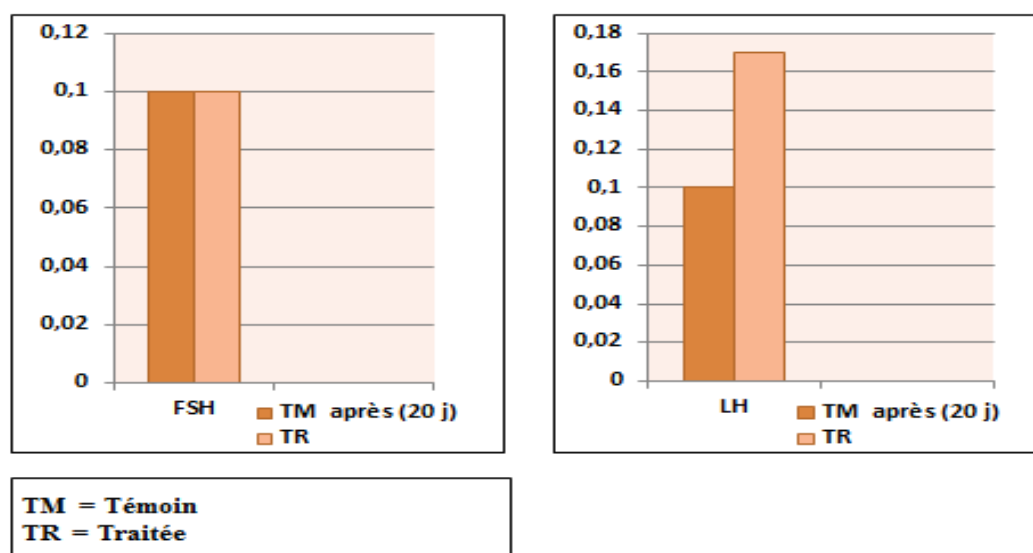


Figure 26. Représentation graphique des variations de FSH et LH chez (TM) et (TR)

Une augmentation significative dans le taux de LH chez la lapine traitée par rapport au témoin, avec une stabilisation des taux de FSH.

2. Etude histologique:

2.1. Histologie de la glande mammaire :

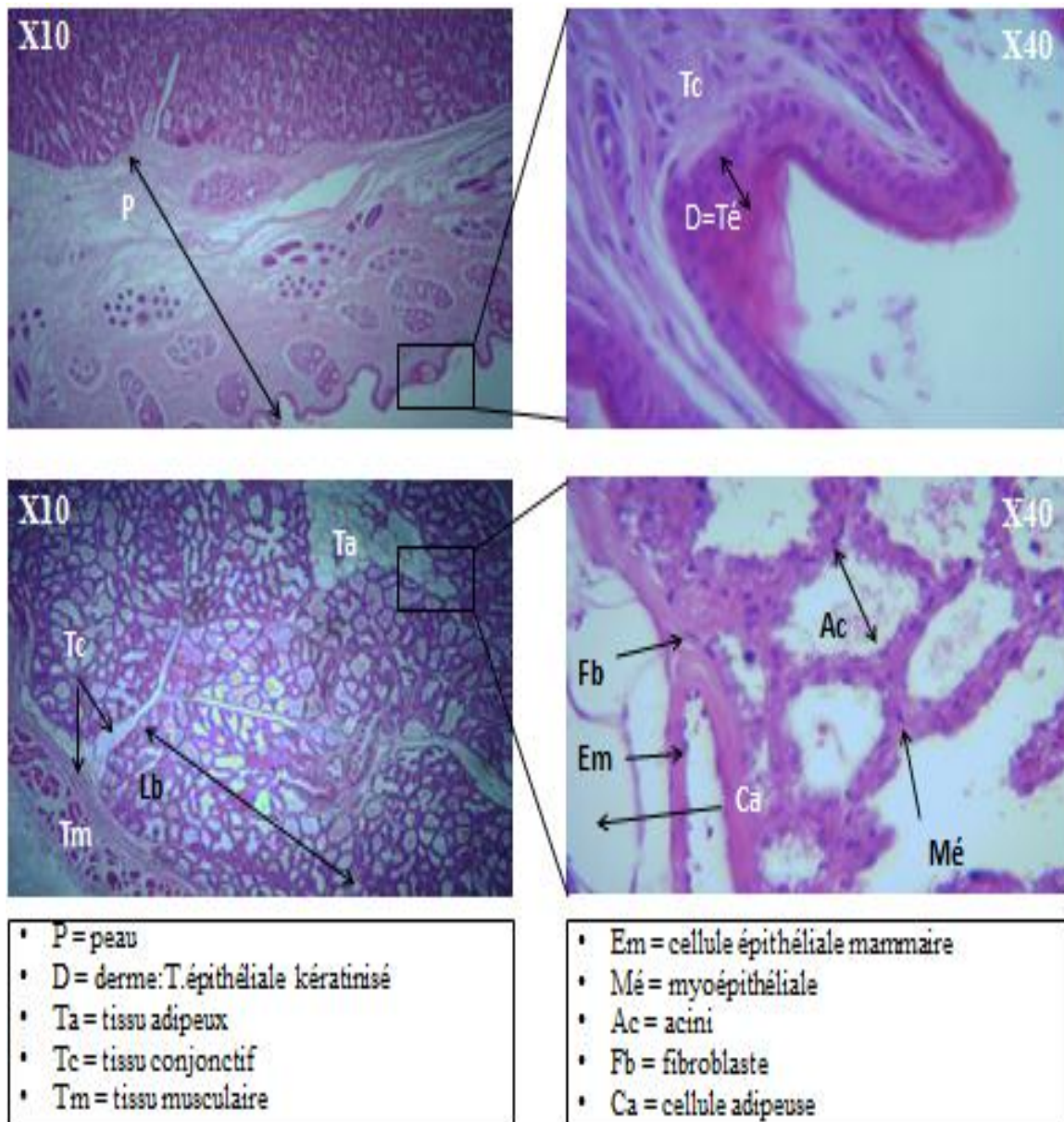


Figure 27. Aspects morphologique de la glande mammaire de lapine en lactation colorée à l'hématoxyline-éosine à différents grossissements (**photo originale**) .

L'étude histologique de la glande mammaire durant la lactation, a révélé une composante épithéliale importante par rapport au tissu adipeux et conjonctif avec la présence des sécrétions dans les acinis élargies.

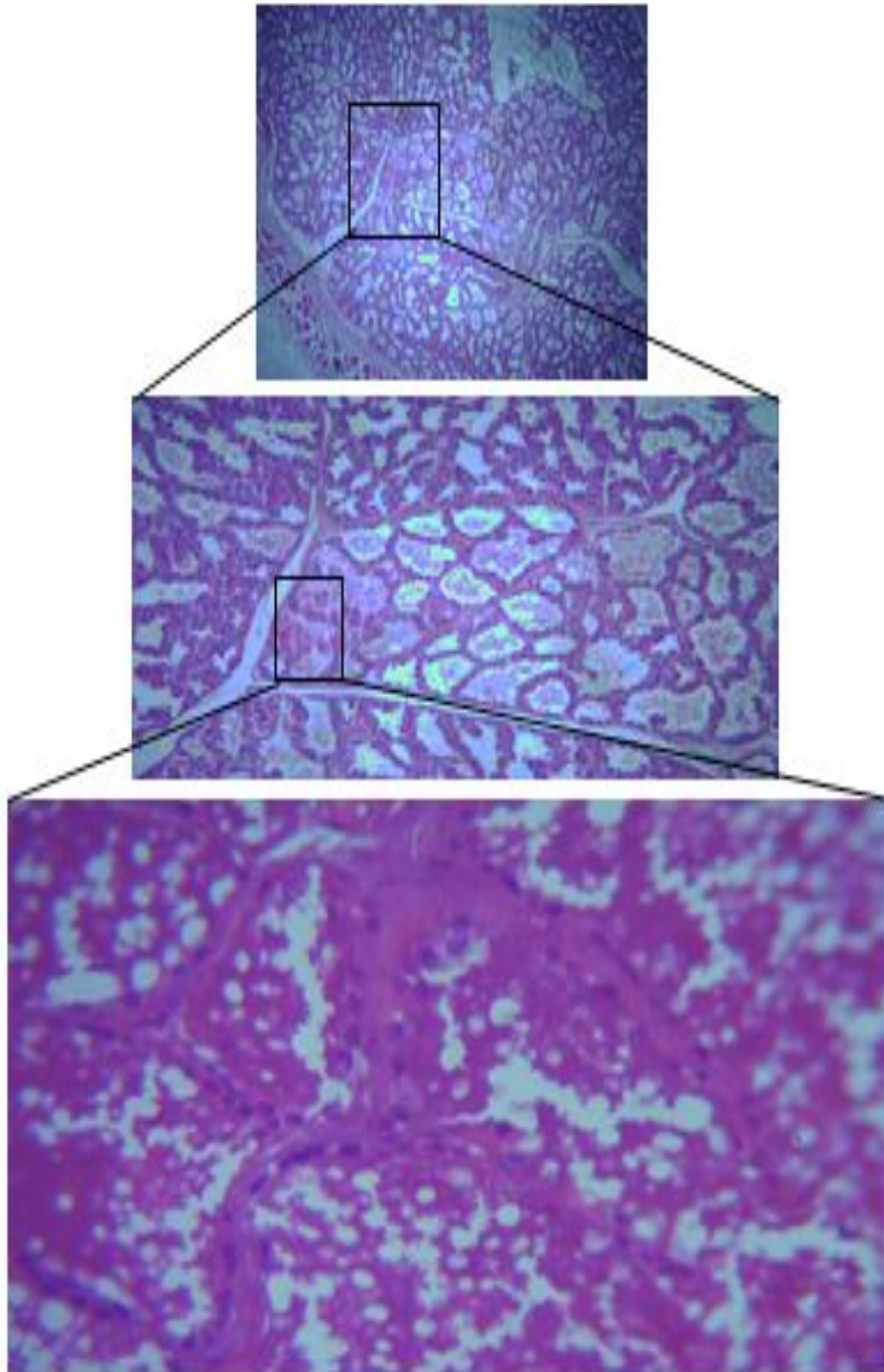
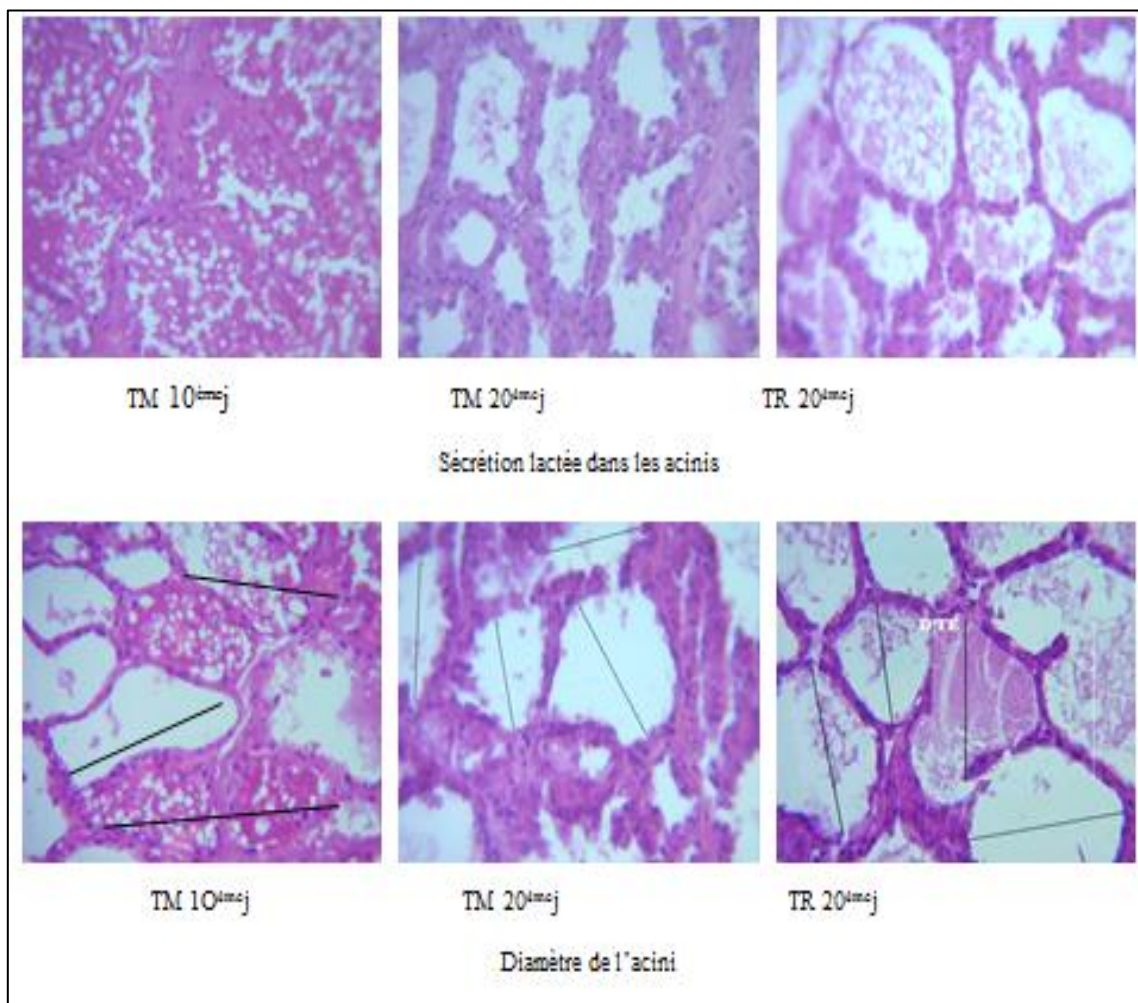


Figure 28. Démonstration histologique de la glande mammaire de lapine en pleine lactation (10^{ème} j) sous différents grossissements révèle une forte sécretion lactée riche en goutelettes lipidiques (photo originale) .

2.2. Effet du BI sur l'histologie de la glande mammaire :



TM = Témoin

TR = Traitée

Figure 29. Observation histologique des lames colorées à l'hématoxyline-éosine(X40)représente l'effet du traitement au **BI** sur le diametre des acinis ainsi que leur sécrétion **(photo originale)**.

La plante a amélioré la sécrétion lactée et elle a aussi un effet sur le diamètre de l'unité fonctionnelle de la glande mammaire car il était chez la lapine témoin au 10^{ème} j : 38,59µm, puis au 20^{ème}j il est réduit à 36 µm , par contre avec l'administration du *B.incrassatum* l'acini s'est élargi environ 38 µm .

2.3. Effet du *Bunium incrassatum* sur l'ovaire

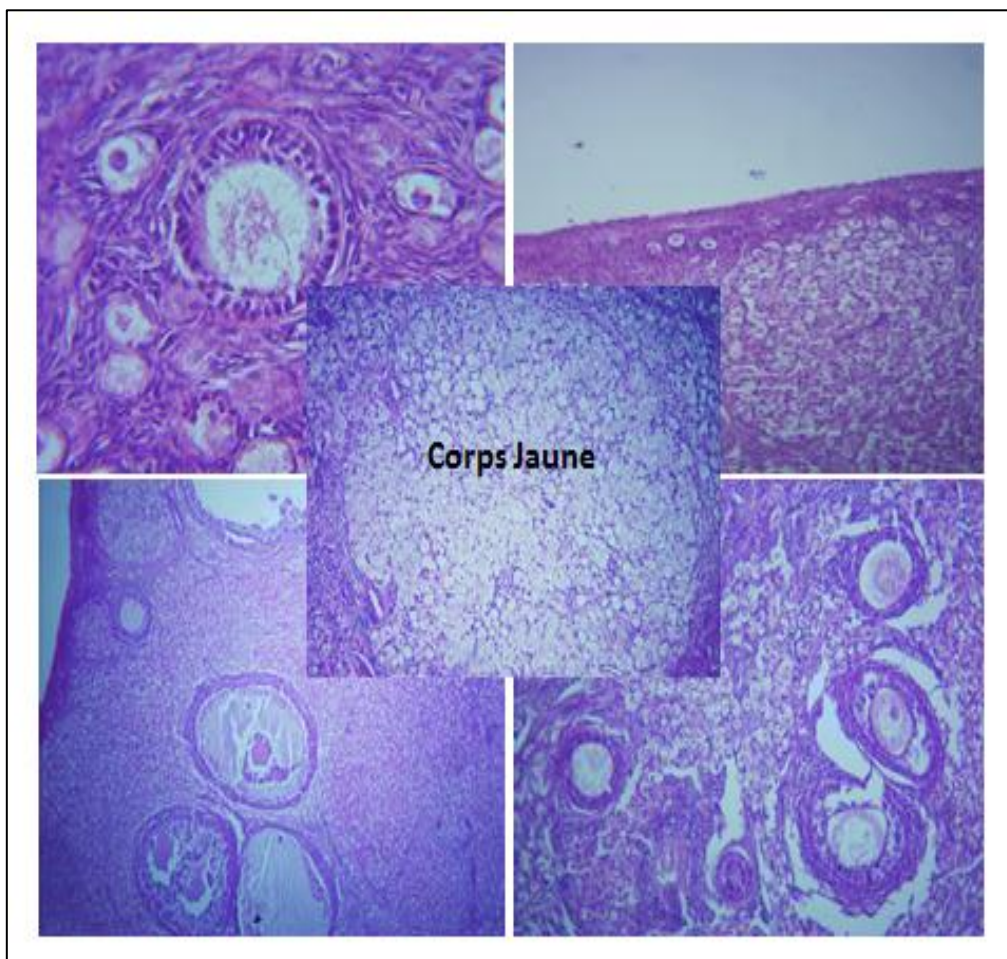


Figure 30. Démonstration histologique de l'ovaire de lapine traitée par **BI** sous différents grossissements (**photo originale**).

L'étude histologique de l'ovaire de lapine traitée montre différentes formes de follicules ainsi que la présence du corps jaune.

3. Etude immunohistochimique:

3.1. Immunoexpression et localisation des récepteurs à la progestérone (PR) et aux œstrogènes (ER):

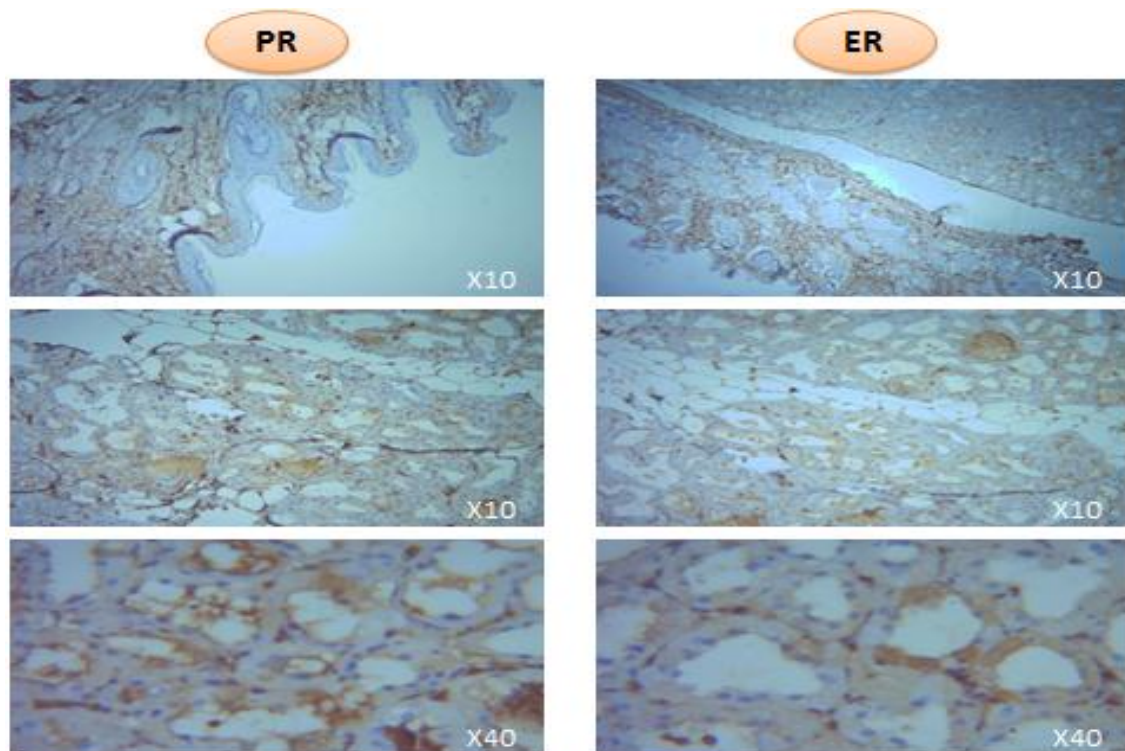


Figure 31. Démonstration immunohistochimique des récepteurs ER, PR dans la glande mammaire de lapine allaitante (20^{ème}j) (photo originale).

Tableau 05. Type et lieu de l'immunoexpression des ER, PR dans la glande mammaire de lapine allaitante (20^{ème}j).

Type de localisation Cellules mammaires	ER			PR		
	Nuc	Cyt	Tm	Nuc	Cyt	Tm
Epithéliales	+	+	+	+	+	+
Myoépithéliales	+	+	+	+	+	+
Fibroblastes	+	-	-	+	-	-
Adipocytes	-	-	+	-	-	+

Nuc :nucléaire Cyt: cytoplasmique Tm: transmembranaire	(-):Absence (+):Présence
--	-----------------------------

3.2. Effet du BI sur l'immunoexpression des récepteurs à la progestérone PR :

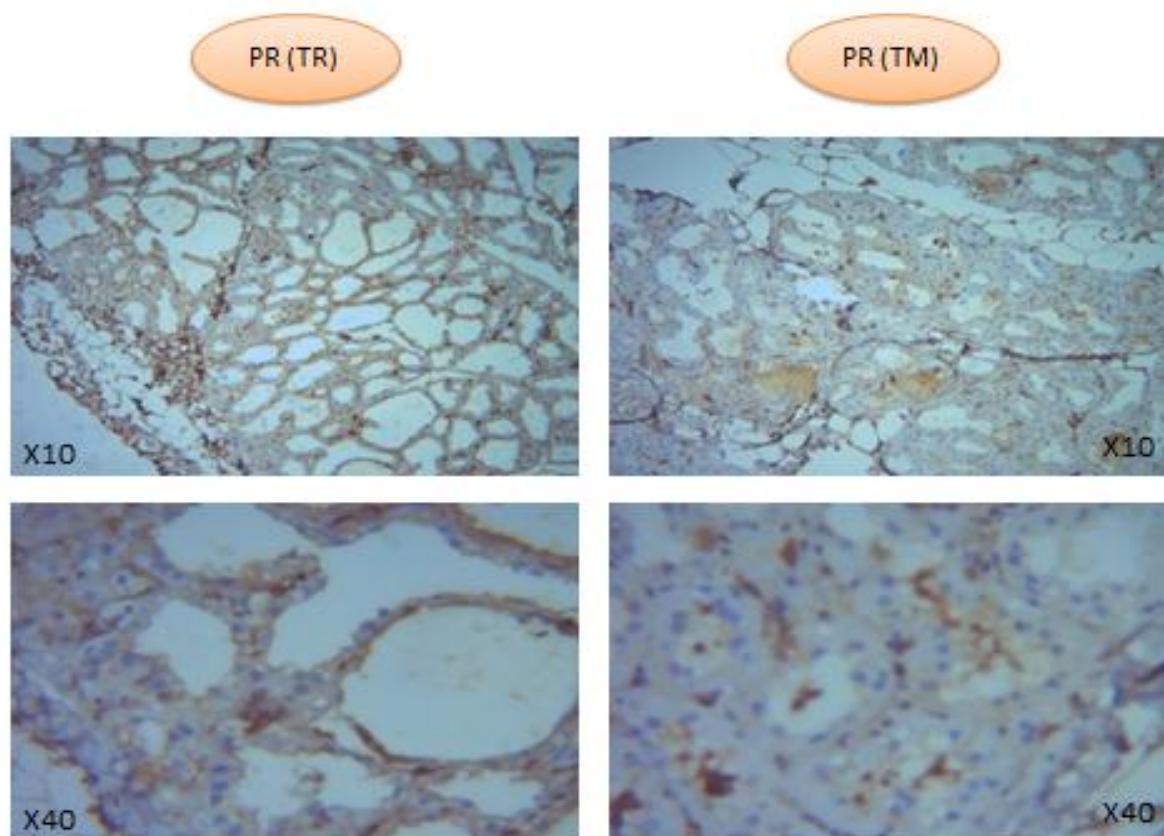


Figure 32. Démonstration immunohistochimique des récepteurs à la progestérone (PR) dans la glande mammaire des lapines allaitante (20^{ème}j) traitée (TR) et témoin(TM) (**photo originale**).

Tableau 06. La concentration et le pourcentage IHC DAB (PR) dans la glande mammaire de lapines allaitantes au 20^{ème}j traitée et témoin .

	Témoin	Traitée
IHC Concentration	++	+++
Surface colorée Area%	30.76 %	38.56 %

**(0+) negative, (+) low positive,
(++) positive, (+++) high positive.**

3.3. L'effet du BI sur l'immunoexpression des récepteurs aux œstrogènes dans la GM :

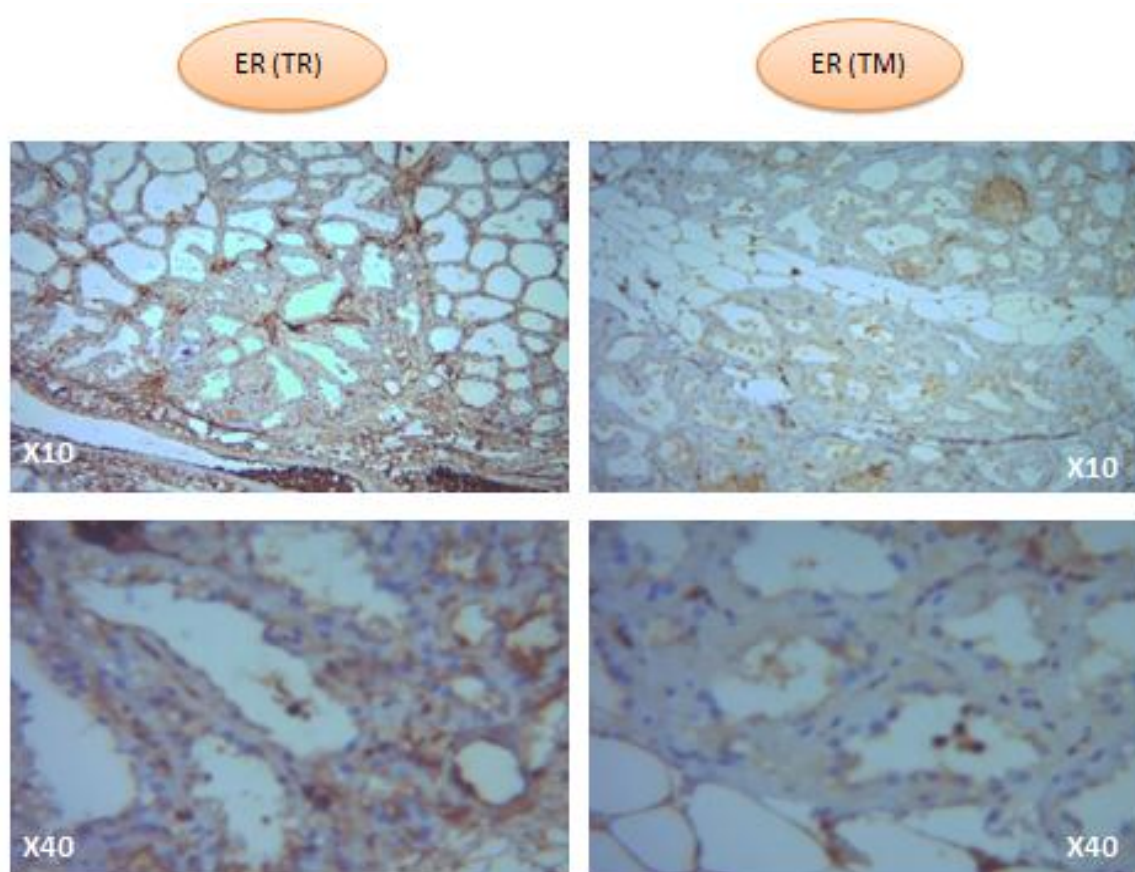


Figure 33. Démonstration immunohistochimique des récepteurs aux œstrogènes (ER) dans la glande mammaire des lapines allaitante (20^{ème}j) traitée (TR) et témoin (TM) (**photo originale**).

Tableau 07. La concentration et le pourcentage IHC DAB (ER) dans la glande mammaire de lapines allaitantes au 20^{ème}j traitée et témoin.

	Témoin	Traitée
IHC Concentration	++	+++
Surface colorée Area%	19.38%	20.3%

**(0+) negative, (+) low positive,
(++) positive, (+++) high positive.**

Discussion :

L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité galactagogue du BI chez la lapine allaitante.

Notre étude a révélé que l'administration orale - pendant la période de lactation (20j) - de poudre de racine du BI chez la lapine de population locale, a un effet sur la production laitière, les paramètres hormonaux, l'histologie mammaire ainsi que la localisation et l'immunoexpression des récepteurs hormonaux dans la glande mammaire.

1. Paramètres hormonaux:

Chez les lapines TM 10j, 20j:

Les hormones stéroïdes ovariennes jouent un rôle primordial dans la reproduction, ainsi qu'au développement de ses organes. Au niveau des glandes mammaires, les œstrogènes sont nécessaires pour l'allongement des canaux mammaire, tandis que la progestérone est nécessaire pour la ramification canalaire (Atwood et al., 2000) et pour la prolifération des CEM (Beleut et al., 2010), y compris la prolifération des cellules souches (Joshi et al., 2010) indispensable pour le renouvellement des cellules épithéliale et myoépithéliales mammaires.

On a observé une différence significative dans le taux des hormones ovariennes (œstrogène, progestérone), cette différence est due à une poursuite d'une mammogénèse incomplète pendant la gestation selon (Lu & Anderson, 1973), qui ont montré que le développement de la glande mammaire chez la lapine pendant la gestation est partiel (67%) et ne sera achevé que pendant la lactation (33%).

Au 20^{ème} j une diminution des taux des œstrogènes et de la progestérone est remarquée, du fait que la lapine est à la fin de lactation et va ensuite entrer en une période d'involution (arrêt de prolifération et différenciation des cellules épithéliales mammaires qui s'installe dès le 20^{ème} jour de lactation d'après (Lu et Anderson, 1973).

La stabilisation des taux des gonadotrophines (FSH/LH) chez les deux périodes (10^{ème}-20^{ème}j) peut être interprétée par une diminution de l'activité ovarienne qui est inhibée par la lactation d'après (Rodriguez et al., 1989).

L'effet du BI sur les paramètres hormonaux:

Une augmentation de taux de LH qui s'accompagne d'une élévation des concentrations plasmatiques de la progestérone, observée chez la lapine traitée par le *Bunium incrassatum*, cela affirme qu'une ovulation s'est produite et qu'un corps jaune s'est formé, car ce dernier est présent sur une coupe histologique de l'ovaire traité, donc cette plante a provoqué l'ovulation par une stimulation de l'activité ovarienne suite à son effet ostrogénique puissant survenant de la présence du

B-sitosterol autant qu'un composant principale de cette plante (**Bousetla et al., 2011**), ce résultats s'accorde avec l'étude de (**Chentouh et al., 2017**). D'autre part ce taux élevé de la progestérone n'affecte pas la production du lait chez la lapine d'après (**Jahn et al., 1987**), d'autre part la diminution des œstrogènes dans le plasma pendant le traitement avec la plante, peut être causé par l'effet œstrogenique du B-sitostérol qui est un phyto-œstrogène ayant une capacité à impliquer une liaison compétitive aux récepteurs des oestrogenes (**Brown et al., 2014**).

2. *Histologie de la glande mammaire:*

La lecture des lames histologiques à différents grossissements après coloration à l'hématoxyline – éosine (HE), révèlent la présente de trois types de tissus: TG (glandulaire), TC (conjonctif), TA (adipeux), le parenchyme mammaire reconnaissable par les lobes mammaire apparents bien individualisés et séparés par le tissu conjonctif, Ce parenchyme est plus développé chez TM (10^{ème}j) que chez (20^{ème}j) et les structure alvéolaire (acini) sont plus élargit en raison de l'activité sécrétoire de la glande mammaire qui diminue à la fin de lactation (en allons vers l'involution) (**Lu & Anderson, 1973**).

Effets du BI sur l'histologie :

1. *L'ovaire:*

L'observation de lame de lapine traitée par **BI**, à différents grossissements, a indiqué une présence de corps jaune témoignant que l'ovaire est actif (Figure30), donc la plante est responsable d'une réactivité ovarienne conduisant à une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et la progestérone.

2. *La glande mammaire du point de vue histomorphométrique :*

La glande mammaire de lapine traitée (TR), a subit un changement morphologique considérable basé sur une augmentation du diamètre des acinis sécrétoires, presque similaire au diamètre du 10^{ème} j de lactation, on peut observer aussi que la quantité des sécrétions dans les acinis a augmenté par rapport au (TM) 20^{ème} j, avec une forte présence des gouttelettes lipidiques, ce qui indique le début de la lactation (**Ellen et al., 2017**), ces changements sont dues au composants bioactifs du *B.incrassatum* ; le B-sitostérol qui améliore la quantité ainsi que la qualité du lait (**Xinli Liu et al., 2021**) et l'acide oléique qui stimule la prolifération des cellules épithéliales mammaires (**Yingying et al., 2018**).

3. Immunohistochimie (IHC) :

L'expression des récepteurs varie selon les étapes du développement mammaire, les cellules positives pour les récepteurs hormonaux, ont été identifiées par (IHC) par la présence d'une couleur brune en apparence et en quantité.

Une immunoréactivité aux récepteurs des œstrogènes (RE) et à la progestérone (PR) a été localisée presque dans toutes les types cellulaires de la glande mammaire chez les lapines allaitantes, traitée par la poudre du *B.incrassatum* (20^{ème}j) et témoin. Ces présents résultats soutiennent l'idée que la glande mammaire pendant la lactation est un organe cible pour les œstrogènes et la progestérone et que ces hormones ont un effet direct sur sa fonction. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Schoniger et al., 2019) ainsi que d'autres ; chez l'espèce bovine par (Shams et al., 2003) et chez les ovins (Colitti & Parillo, 2013) ainsi que chez la gerbille (Ellen et al., 2017).

L'analyse des résultats de l'immunohistochimie indique que l'immunolocalisation de ces récepteurs est nucléaire et cytoplasmique, ces résultats sont similaires à ceux obtenus par (Hsueh et al., 1973), contrairement à (Cheng et al., 2004) qui ont signalé que la localisation de ces récepteurs est nucléaire. Notre étude a aussi révélé une localisation transmembranaire des mêmes récepteurs au niveau des cellules lipidiques dans la glande mammaire.

Cette immunoexpression des RE et PR dans la GM durant la lactation, démontre que leurs ligands (les œstrogènes, la progestérone) sont nécessaires à la croissance et au développement de la glande mammaire durant ce stade physiologique ainsi qu'au maintien de lactation en favorisant l'expression des récepteurs à la prolactine (Djiane & Durand, 1977).

Effet du B.incrassatum :

Nos résultats de l'effet du *B.incrassatum* sur l'immunoexpression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone au niveau de la glande mammaire de la lapine traité par 5g, démontrent une augmentation par rapport au témoin. Ces données ont été confirmées à l'aide d'un logiciel spécifique : **ImageJ**, Cette immunoexpression élevée a été observée surtout au niveau des cellules épithéliales mammaires et aussi les myoépithéliales, ce qui favorise l'action de ces hormones sur le fonctionnement de la glande. Sachant que les phytostérols présents dans la plante agissent de deux manière ; l'effet direct des œstrogènes formés à partir des phytostérols qui stimulent la prolifération des cellules mammaires et induit la maturation des acinis pour produire de lait (Yart et al., 2013), et l'effet indirect par la stimulation de l'hypophyse antérieure et postérieure pour sécréter l'ocytocine et la prolactine (Santal et al., 1997)

Le mécanisme exact résultant de ces changements et la signification physiologique des variations des récepteurs ER, PR , restent à élucider.

Conclusion

Conclusion:

Le but visé de notre étude est d'évaluer l'effet du traitement par 5 g de poudre des racines du *Bunium incrassatum* (Talghouda) sur les paramètres hormonaux et la structure histologique de la glande mammaire au cours de la période de lactation.

Les résultats indiquent que les composants de cette plante médicinale peuvent avoir un effet significatif sur certains paramètres de reproduction comme la modification des concentrations d'hormones stéroïdes ovariennes ainsi que la structure histologique de glande mammaire en modifiant le diamètre de son unité fonctionnelle (acini).

Nos résultats montrent l'immunoexpression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone au niveau des différents types cellulaires, ce qui confirme leur effet direct sur sa fonction. Ces résultats sont préliminaires, donc il est important d'approfondir cette recherche sur un nombre d'animaux suffisant pour confirmer Les potentiels effets galactologues du *Bunium incrassatum* (Talghouda)

Références

Bibliographiques

References:

- Abascal K, Yarnell E. (2008).** Botanical Galactagogues. *Alternative and Complementary Therapies*, 14: 288-294.
- Arnal J, Lenfant F, Metivier R, Flouriot G, Henrion D, Adlanmerini M, Fontaine C, Gourdy P, Chambon P, Katzenellenbogen B, et al. (2017).** Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev*, 97: 1045–1087.
- Atwood C S, Hovey R C, Glover J P, Chepko G, Ginsburg E, Robison W G and Vonderhaar B K. (2000).** Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *Journal of Endocrinology*, 167: 39–52
- Balé B, Hamidou H T, Maria T R P. (2006) :** Effets ostrogéniques du macéré aqueux des feuilles de *Holarrhena floribunda* (G. Don) Dur & Schinz chez la rate ovariectomisée *BiotechnolAgron Soc Environ*,10 (3) : 173 – 180
- Bano M, Worland P, Kidwell WR, Lippman ME, Dickson RB. (1992).** Receptor-induced phosphorylation by mammary-derived growth factor 1 in mammary epithelial cell lines. *J BiolChem*, 267:10389-92.
- Bazzano A N, Hofer R, Thibeau S, Gillispie V, Jacobs M, et al. (2016).** A Review of Herbal and Pharmaceutical Galactagogues for Breast-Feeding. *The Ochsner journal*, 16: 511-524
- Beleut M, Rajaram R D, Caikovski M, Ayyanan A, Germano D, Choi Y, Schneider P and Brisken C. (2010).** Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 2989–94.
- Ben Ziane A, YOUSFI I.** (page consultée le 15 Mars 2023). *Bunium incrassatum* Batt et Trab,(En ligne),URL :<https://sites.google.com/site/pastoraldz/plantesmedicinales/enquete>.
- Berger H, Heinrich N, Albrecht E, Kertscher U, Oehlke J, Bienert M, Schafer H, Baeger I, Mehlis B. (1991).** Gonadotropin-releasing hormone analogs relationship between their structure and pharmacokinetics in rats. *Regulatory Peptides*, 33(3): 299-311.
- Bielke W, Ke G, Feng Z, Buhrer S, Saurer S, Friis RR. (1997).** Apoptosis in the rat mammary gland and ventral prostate: detection of cell death-associated genes using a coincident-expression cloning approach. *Cell Death Differ*. Feb, 4(2):114-24.

- Bousetla A, Zellagui A, Derouiche K, Rhouati S. (2011).** Chemical constituents of the roots of Algerian *Bunium Incrassatum* and evaluation of its antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2011.01.022.
- Briskin C, Park S, Vass T, Lydon J P, O'Malley B W, Weinberg R A. (1998).** A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5076-5081.
- Briskin C1, O'Malley B. (2010).** Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 12:a003178.
- Brodribb W. (2018).** ABM Clinical Protocol #9: Use of Galactogogues in Initiating or Augmenting Maternal Milk Production, Second Revision 2018. *Breastfeed Med*, 13: 307-314.
- Brown A C, Stevenson L M, Leonard H M, Clotfelter E D. (2014).** Phytoestrogens B-sitosterol and genistein have limited effects on reproductive endpoints in a female fish, *Betta Splendes* *Biomed Research international*, Article ID 681396:p7. DOI:10.1155/2014/681396
- Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson J. (2004).** Estrogen receptors ER and ER in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci*, 101(11):3739–3746.
- Chentouh S, Boulahbel S, Ouldjaoui A, Hammoudi N, Djebaili H, Adjal F. (2017).** Effect of organic extracts of *Bunium incrassatum* on the hematological, ovarian and uterine parameters of mature female rabbit. *J Fandam Appl Sci*, 9(3):1618-1633.
- Coleman-Krnacik S, Rosen J M. (1994).** Differential temporal and spatial gene expression of fibroblast growth factor family members during mouse mammary gland development. *Mol Endocrinol*, 8:218-29.
- Colitti M, Parillo F. (2013).** Immunolocalization of estrogen and progesterone receptors in ewe mammary glands. *Microsc. Res Tech.* 76 (9): 955–962. doi: 10.1002/jemt. 22254.
- Cowie A T. (1972).** Lactation and its hormonal control, in: Austin C R, Short R V. Eds, *Reproduction in mammals*, Cambridge University Press, Cambridge, 3: 106-143.
- Cunha GR, Hom Y K. (1996).** Role of mesenchymal-epithelial interactions in mammary gland development. *J Mamm Gland Biol Neoplas*, 1: 21-35.
- Delouis C L and Richard P. (1991).** La Lactation. In: *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ch. Thibault and M C. Levasseur (Eds.). INRA. Paris. 487-514.

- Devinoy E and Houdebine LM. (1977).** Effects of glucocorticoids on casein gene expression in the rabbit. *Eur J Biochem*, 75: 411-6.
- Diel P, Schmidt S, Vollmer G. (2002).** *In vivo* test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B*, 777: p. 191–202
- Djiane J, Durand P, Kelly P. (1977).** Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinology*, 100, 1348–1356, <http://doi:10.1210/endo-100-5-1348>.
- Ellen CRL, Luiz R J, Silvana G P and Sebastião R T. (2017).** Histological and immunohistochemical characterization of the Mongolian gerbil's mammary gland during gestation, lactation and Involution. *Acta Histochemica*, 119: 273-283.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2017.02.003>.
- Forinash A B, Yancey A M, Barnes K N, Myles TD. (2012).** The use of galactogogues in the breastfeeding mother. *Ann Pharmacother*, 46: 1392-1404.
- Gregor P D, Sawadogo M, Roeder R G. (1990).** The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev*, 4:1730-1740.
- Grosse R. (1995).** Local signals for growth cessation and differentiation in the mammary gland. In: *Intercellular signalling in the mammary gland*. Plenum Press p. 35-44.
- Henninghausen L, Robinson G W. (2005).** Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:715-725.
- Houdebine LM. (2007).** Biologie de la lactation. *EncyclMédChir. (Elsevier, Paris).* Gynécologie/Obstétrique, 48(5) -008-A-30: 22 p.
- Howlett A R, Bailey N, Damsky C, Petersen OW, Bissell MJ. (1995).** Cellular growth and survival are mediated by beta-1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. *J Cell Sci*, 108:1945-57.
- Howlin J, McBryan J, Martin F. (2006).** Pubertal mammary gland development: insights from mouse models. *J Mammary Gland BiolNeoplasia*, 11: 283-297.
- Hsueh A W, Peck E J and Clark J H. (1973).** *J. Endocr*, 58: 503-511.
- Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy S K, Sachidanandam R, Hannon GJ. (2007).** A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev*, 21: 3238-43.

- Ibarra I, Erlich Y, Muthuswamy SK, Sachidanandam R & Hannon GJ. (2007)** A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev*, 21: 3238-43.
- Imagawa W, Yang J, Guzman R, Nandi S. (1994).** Control of mammary gland development. *Physiol Reprod*, 2:1033-65.
- Jahn G A, Djiane J, Houdebine L M. (1987).** Inhibition of casein synthesis by progesterone : Modulation in relation to concentration of hormones that synergize with prolactin. *J Steroid Biochem*, 32(3): 373-379.
- Jammes H and Djiane J. (1988).** Le développement de la glande mammaire et son contrôle hormonal dans l'espèce bovine. *productions-animales*, 1(5) : 299-310.
- Javan R, Javadi B, Feyzabadi Z. (2017).** Breastfeeding: Physiology and Galactagogue Plants in View of Traditional Persian Medicine. *Breastfeed Med*, 12: 401-409
- Joshi P A, Jackson H W, Beristain A G, Di Grappa M A, Mote P A, Clarke C L, Stingl J, Waterhouse P D and Khokha R. (2010).** Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*, 465: 803–07
- Kelly PA, Kedzia C, Hennighausen L, Ormandy CJ, Kopchick JJ, Binart N. (2002).** The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol*, 197: 127-31.
- Larboulette S. (2003).** Les tumeurs mammaires félines: étude bibliographique et enquête personnelle. Thèse de doctorat vétérinaire. Université de Nante. Nante. 176.
- Larson B L, Smith V R. (1978).** Lactation. A comprehensive treatise. Academic Press, New-York, London. Vol. 7.
- Levay-Young B K, Bandyopadhyay G K, Nandi S. (1987).** Linoleic acid but not cortisol stimulates accumulation of casein by mouse mammary epithelial cells in serum-free collagen gel culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:8448-52.
- Lu Ming-Hsiung and Anderson R. (1973).** Mammary growth in pregnancy and lactation. *Biology of reproduction*, 9: 538-543.
- Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ. (1996).** Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development*, 122:181-93.

- Lydon J P, demayo F J, Funk C R, Mani S K, Hughes A R, Montgomery C A Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley B W. (1995).** Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, 9(18): 66-78. Doi: 10.1101/gad.9.18.2266.
- Magee J P, Rowland IR. (2004).** Phytoestrogens, their mechanism of action: *British J Nutr*, 91: 513–531.
- Marasco L. (2008).** Inside track. Increasing your milk supply with galactogogues. *J Hum Lact*, 24: 455-456.
- Marcotty C, Frankenne F, Meuris S, Hennen G. (1994).** Immunolocalization and expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the mammary gland during rat gestation and lactation. *Mol Cell Endocrinol*, 99: 237-43.
- Monaham S, Salomon D S, Kidwell W R. (1988).** Substratum modulation of epidermal growth factor receptor expression by normal mammary cells. *J Dairy Sci*, 71:1507-14.
- Morrone M, Giordano A, Zingaretti M C, Boiani R, De Matteis R, Kahn B B, Nisoli E, Tonello C, Pisoschi C, Luchetti MM, Marelli M, Cinti S. (2004).** Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(48):16801-6. Doi: 10.1073/pnas.0407647101.
- Ollivier-Bousquet M and Devinoy E. (2005).** Physiology of lactation: Old questions, new approaches, *Livestock Production Science*, 98(1):163173. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.012>.
- Ollivier-Bousquet M, Radvanyi F, Bon C. (1991).** Crotoxin a phospholipase A 2 neurotoxin from snake venom interacts with epithelial mammary cells is internalized and induces secretion. *Mol Cell Endocrinol*, 8:241.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2022).** Soixante-quinzième assemblée mondiale de la santé. Point 27 .3 de l'ordre du jour provisoire. A75/42. 12 avril 2022.
- Pepper M S, Soriano J V, Menoud PA, Sappino A P, Orci L, Montesano R. (1995).** Modulation of hepatocyte growth factor and c-met in the rat mammary gland during pregnancy lactation and involution. *Exp Cell Res*, 219:204-10.
- Petersen O W, Ronnov-Jessen L, Howlett A R, Bissell M J. (1992).** Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:9064-8.

- Pierce D F, Johnson M D, Matsui Y, Robinson S D, Gold L I, Purchio A F et al. (1993).**Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF-beta-1. *GenesDev* ,7:2308-17.
- Reichmann E, Ball R, Groner B, Friis R R. (1989).**New mammary epithelial and fibroblastic cell clones in cocultures form structures competent to differentiate functionally. *J Cell Biol*, 108: 1127-38.
- Richards R A, Ellis M H, Rebetzke G J, Chandler P, Bonnett D, Spielmeier W. (2004) .**The effect of different height reducing genes on the early growth of wheat. *Functional Plant Biology*, 31:583-589.
- Rodriguez-Boulan E W, Nelson J. (1989).**Morphogenesis of the Polarized Epithelial Cell Phenotype. *Science*245,718-725. DOI:10.1126/science.2672330.
- Rudland R S, Twiston Davies AC, Tsao S W. (1984).** Rat mammary preadipocytes in culture produce a trophic agent for mammary epithelia-prostaglandin E2. *J Cell Physiol*, 220:364-76.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y. (1991).** Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 64:867-9.
- Saczko J, Michel O, Chwilkowska A, Sawicka E, Mączyńska J, and Kulbacka J. (2017).** Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling. *AdvAnatEmbryol Cell Biol*, 227, 93–105.
- Sakakura T. (1991).**New aspects of stroma-parenchyma relations in mammary gland differentiation. *Int Rev Cytol*, 125:165-202.
- Santell R C, Chang M G and Helferich W G. (1997).** Dietary Genistein Exerts Estrogenic Effects Upon The Uterus, Mammary Gland And The Hypothalamic/Pituitary Axis In Rats. *J. Nutr*, 127 (2): 263–269.
- Schams D, Kohlenberg S, Amselgruber W, Berisha B, Pfaffl MW, Sinowatz F, (2003).** Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J. Endocrinol*, 177 (2): 305–317.
- Schöniger S, Degner S, Jasani B and Heinz-Adolf Schoon . (2019).** Mammary Tumors in Rabbits: Translation of Pathology into Medical Care. *Animals*. 9(10):762.Doi:10.3390/ani9100762.
- Sejrsen K. (1994).**Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle. *Proc Nutr Soc*, 53:103-111.

- Shackleton M, Vaillnat F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, et al. (2006).**
Generation of a functional mammary gland from a single stem cell *Nature*, 439:84-8.
- Streuli CH, Schmidhauser C, Bailey N, Yurchenco P, Skubitz AP, Roskelley C, et al. (1995).**
Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol*, 129:591-603.
- Tanos T, Rojo L J, Echeverria P, Briskin C. (2012).**ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Research*, 14:210.
- Turner C W. (1952).**The mammary gland. I. The anatomy of udder of cattle and domestic animals. Lucas broths.Publisher, Columbia, Missouri.
- Visvader J E, Stingl J. (2014).** Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev*, 28(11):1143-58. doi:10.1101/gad.242511.114. PMID: 24888586; PMCID: PMC4052761.
- Vukicevic S, Kleinman H K, Luyten F P, Roberts A R, Roche N S, Reddi A H. (1992).** Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res*, 202:1-8.
- Wani S and Kumar P. (2016).** Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17.
- Warburton M J, Coles B, Dundas S R, Gusterson B A, O'Hare MJ. (1993).** Hydrocortisone induces the synthesis of alpha2-macroglobulin by rat mammary myoepithelial cells. *Eur J Biochem*, 214:803-9.
- Woodward W A, Chen M S, Behbod F, Rosen J M.(2005).**On mammary stem cells. *J Cell Sci*, 118:3585-94.
- Xinlulu, jinglinshen, jinxinzong, jiayiliu, and yongchengjin. (2021).** Beta-sitosterol promotes milk protein and fat synthese-related genes in bovine mammary epithelial cells. *Animals*, 11:32-38. <http://doi.org/10.3390/ani11113238>.
- Yart L, Finot L, Lollivier V & Dessauge F. (2013).**Oestradiol enhances apoptosis in bovine mammary epithelial cells in vitro. *J. Dairy Res*, 80(1): 113–21.
<https://doi.org/10.1017/S0022029912000714>.

Yingying M, Jing Zhang, Cong Yuan, Fenglin Zhang, Qin Fu, Han Su, Xiaotong Zhu, Lina Wang, Ping Gao, Gang Shu, Qingyan Jiang, Songbo Wang. (2018). Oleic acid stimulates HC11 mammary epithelial cells proliferation and mammary gland développement in peripubertal mice through activation of CD36-Ca²⁺ and PI3K/Akt signaling pathway. *Oncotarget*, 9(16):12982-12994.

Sites internet:

- <https://slideplayer.fr/slide/immunohistochimie>
- <https://www.google.com/search/fiche+technique+tp+histologie-8>

Résumé:

Notre étude préliminaire, réalisée pour évaluer l'effet du traitement avec la poudre de racine de *Bunium incrassatum* (Talghouda) sur l'immunoexpression des récepteurs aux stéroïdes, afin d'évaluer la capacité galactagogue de cette plante chez la lapine allaitante de population locale.

Notre étude a été réalisée sur trois lapines allaitantes ; deux témoins (10^{ème} et 20^{ème} j de lactation) et une traitée pendant (20j) par l'incorporation quotidienne de 5g de poudre du *B.incrassatum*.

Ce travail est divisé en deux parties : La première partie est l'évolution des gonadotrophines FSH et LH et les stéroïdes œstradiol et progestérone ainsi que les modifications histologiques qui s'installe au niveau des glandes mammaires après 10 et 20 jours de lactation. La 2^{ème} partie est une étude comparative du point de vue histologique et immunohistochimique après 20 jours traitement par 5g de poudre de cette plante. Après traitement, les lapines ont été sacrifiées, leurs organes prélevés, dégraissés, pesés et fixés dans du formol à 10 %, et le sang a été recueilli dans des tubes. Nos résultats indiquent que les composants de cette plante médicinale peuvent en quantités spécifiques, avoir un effet positif (une augmentation du diamètre de l'unité fonctionnelle), qui peut conduire à une amélioration de la sécrétion laitière et des modifications des concentrations plasmatiques des hormones (œstrogène, progestérone, FSH, LH). Ainsi que l'immunoexpression de des récepteurs aux stéroïdes.

On conclusion, il ressort de recherche qu'il est possible d'incorporer la poudre des racines du *BI* comme une supplémentation nutritionnelle au cours de la lactation pour améliorer les performances de la glande mammaire.

Mots clé: Galactagogue, *Bunium Incrassatum*, Lapines allaitantes, Glande mammaire, Immunohistochimie, Récepteurs aux œstrogènes, lactation.

Abstract:

Our preliminary study carried out to evaluate the effect of treatment with *Bunium Incrassatum* (Talgouda) root powder on the immunoexpression of steroid receptors in order to evaluate the galactagogue capacity of this plant in Lactating local does (female rabbits).

Our study was carried out on three lactating does, two treated as controls (10 -20days) and one treated for 20 days by the daily incorporation of 5g of *BI* powder.

This work is divided into two parts: the first part is the evolution of the gonadotrophins FSH and LH and the steroids (Estradiol and progesterone) as well as histological modifications which settles at the level of the mammary glandes after 10 and 20 days of lactation. The second part is a comparative study from the histological and immunohistochemical point of view after 20 days treatment with 5g of powder of *BI*. After treatment, does were sacrificed, their organs removed, defatted, weighed and fixed in 10% of formalin, and blood was collected in tubes. Our results indicate that the components of this medicinal plant can in specific amounts, have a positive effect (an increase in the diameter of the functional unit)which can lead to an improvement of milk secretion and changes in plasma concentrations of hormones (estrogen, progesterone, FSH, LH) as well as the immunoexpression of steroids receptors.

In conclusion, research shows that it is possible to incorporate the powder of the roots of *BI* as a nutritional supplement during lactation to improve the performance of the mammary gland.

Key words; Galactagogue, *Bunium Incrassatum*, Lactating does, Mammary gland, Immunohistochemistry, lactation, Estrogen receptors.

