

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE BLIDA 1  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Biologie

SPECIALITE :  
BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE, IMMUNOLOGIE

THEME :

**RECHERCHE DES EFFETS DOSE ET TEMPS DEPENDANTS DE LA  
TOXICITE CHRONIQUE PAR VOIE ORALE D'IMIDACLOPRIDE AU  
NIVEAU DES PARENCHYMES THYROIDIEN ET SPLENIQUE CHEZ LES  
RATS FEMELLES DE SOUCHE WISTAR**

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> REMILI Sihem**

Soutenu le 06/11/2014

Devant le jury composé de :

- M <sup>me</sup> CHAKHMA A.	MAA	UB1	Présidente
- M <sup>me</sup> ZATRA Y.	MAA	UB1	Examinatrice
- Dr. SAADI L.	MCA	UB1	Promotrice

Promotion 2013/2014

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude à promotrice **Dr. Saadi L.**, maitre de conférences à l'université Blida 1, de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel sujet, pour sa confiance, ses précieux conseils et son soutien.

Je remercie M<sup>me</sup> **CHAKHMAA.**, maitre assistante à l'université Blida 1, d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury.

Mes vifs remerciements vont à M<sup>me</sup> **ZATRAY.**, maitre assistante à l'université Blida 1, d'avoir accepté d'assurer l'examen de mon travail.

J'adresse également mes remerciements à tous mes enseignants, qui m'ont donné les bases de la science et du savoir.

Un grand merci à l'ensemble du personnel des laboratoires, notamment le laboratoire de cytologie du CHU Hussein Dey et le laboratoire de Physiologie Animale de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba.

Enfin, nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui a beaucoup sacrifié pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère  
A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger.

Que Dieu les gardes et les protège.

A mes adorables sœurs Zahida et Lina.

A mon frère Mohamed Islam.

A mes amies avec lesquelles j'ai partagé des moments de joie et de bonheur.

A tous ceux qui me sont chers.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime,

Je dédie ce travail.

**Sihem**

## **RESUME**

L'objectif de cette étude de rechercher la toxicité chronique par voie orale de deux faibles doses d'imidaclopride (1/120 et 1/85 DL50) et leurs effets dose et temps-dépendants au niveau des parenchymes thyroïdien et splénique chez des rats femelles de souche Wistar. Une étude histopathologique est réalisée sur un effectif de 50 rats dont 14 témoins répartis en deux lots (un de 30 jours et l'autre de 60 jours) et 36 traités répartis en quatre lots (deux traités pendant 30 jours et deux autres traités pendant 60 jours). D'après les résultats obtenus après 30 jours de traitement et en comparaison à ceux des témoins, les parenchymes thyroïdien et splénique préservent leur organisation structurale générale néanmoins quelques altérations sont soulevées au niveau des follicules thyroïdiens de tous les rats traités(1/120 DL50 et 1/85 DL50), l'augmentation du nombre des petits follicules et la perte du colloïde dans certains follicules. Cependant, les follicules des rats traités par 1/85 DL50 présentent des thyrocytes avec un cytoplasme clair. Ces mêmes changements sont retrouvés après 60 jours de traitement chez tous les rats traités avec la présence de l'aspect clair du cytoplasme de certaines thyrocytes chez les rats traités par 1/120 DL50. Le parenchyme splénique montre, après 30 jours de traitement, une prolifération de la pulpe blanche qui est plus nette avec la dose 1/85 DL50. Après 60 jours, les centres germinatifs et les zones marginales deviennent plus importants chez tous les rats traités avec présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge des rats traités par 1/85 DL50. Tous ces résultats

plaident en faveur de la présence des effets dose et temps dépendants de l'imidaclopride à faible doses au niveau des parenchymes thyroïdien et splénique.

**Mots clés :** Effet-dose dépendant ; Effet-temps dépendant ; Imidaclopride ; Rats femelles ; Toxicité par voie orale ; Histopathologie.

### **Abstract**

The objective of this study is to researching the chronic oral toxicity of two low doses of imidacloprid (1/120 and 1/85 LD50) and their effects dose and time-dependent at the thyroid parenchyma and spleen in female rats Wistar strain. A histopathological study was performed on 50 rats including 14 controls divided into two lots (one of 30 days and the other for 60 days) and 36 treated divides in four lots (two treated for 30 days and two others treated for 60 days). According to the results obtained 30 days after treatment and compared to controls, The thyroid parenchyma and splenic preserve their general structural organization However, some alterations are raised at the thyroid follicles of all treated rats, an increase in the number of microfollicles and the loss of colloid in some follicles. However, follicles in rats treated with 1/85 LD50 present thyreocytes with clear cytoplasm. These same changes are found after 60 days of treatment in all rats treated with 1/120 LD50, the presence of the clear appearance of the cytoplasm of some thyreocytes. The splenic parenchyma shows, after 30 days of treatment, a proliferation of white pulp that is sharper with 1/85 LD50 dose. After 60 days, the germinal centers and marginal areas become more important and the presence of blood congestion in the red pulp. All these results support the presence of dose-dependent effects and time of imidacloprid at low doses of thyroid parenchyma and spleen.

**Keywords:** dose-dependent effect; Time-dependent effect; imidacloprid ; Female rats; Oral toxicity; Histopathology.

### المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن السمية المزمنة لتركيزين منخفضين الاميداكلوبريد (120/1 و DL50 85/1 ) عن طريق الجرعة و التأثيرات المتعلقة بالتركيز و الوقت على مستوى الغدة الدرقية و الطحال عند الجرذان الانثوية من سلالة ويستار. تم انجاز دراسة نسيجية مرضية على 50 جرذ حيث 14 جرذان شاهدة مقسمة إلى مجموعتين (واحدة من 30 يوما و أخرى 60 يوما) و 36 معالجة مقسمة الى أربع مجموعات (اثان لمدة 30 يوما واثنين آخرين 60 يوما). استنادا إلى نتائج تم الحصول عليها بعد 30 يوما من العلاج ومقارنة مع الشواهد ، البرانشيم الدرقي و الطحالي حافظ على التنظيم الهيكلي العام و مع ذلك، تطرح بعض التغييرات على مستوى جريبات الغدة الدرقية عند جميع الجرذان المعالجة من ارتفاع عدد الجريبات الصغيرة و فقدان المادة الغروية و تظهر الجريبات لدى الجرذان المعالجة ب (DL 50 85/1) thyreocytes مع السيئوبلازم واضح. لقد تم العثور على نفس هذه التغييرات بعد 60 يوما من العلاج عند جميع الجرذان المعالجة. مع وجود مظهر واضح من السيئوبلازم في thyreocytes لدى بعض الجرذان المعالجة ب (DL5 120/1). يظهر البرانشيم الطحالي بعد 30 يوما من العلاج تضخم اللب الأبيض الذي هو أكثر وضوحا مع جرعة (DL5 85/1). بعد 60 يوما، المراكز الجرثومية والمناطق الهامشية أصبحت أكثر أهمية مع وجود احتقان دموي على مستوى اللب الأحمر. كل هذه النتائج تدعم وجود تأثيرات تعتمد على الجرعة المستعملة والوقت للايميداكلوبريد على مستوى الغدة الدرقية والطحال.

**كلمات المفتاح:** تأثير مرتبط بالتركيز. تأثير مرتبط بالوقت. الايميداكلوبريد. جرذان اناث. السمية عن طريق الفم. التشريح المرضي.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

- ADN : acide désoxyribonucléique .
- DL50 : Dose Létal 50.
- EDTA : Acide éthylènediamine tétra-acétique.
- HE : Hématoxyline –Eosine.
- IMI : Imidaclopride.

## **GLOSSAIRE**

**Clastogène** : se dit d'un agent qui provoque des cassures de chromosomes (Costa *etal.*,2011).

**Superoxyde dismutase** : catalyse la dismutation des radicaux superoxyde, la mesure de l'activité de SOD était basée sur l'adrénaline qui se transforme spontanément à Adrenochrome en présence d'air à pH 10,2 selon Misra et Fridovich (1972).

**Glutamate oxaloacétate transaminase** : est une enzyme glycoprotéique présente



dans le cytoplasme et les mitochondries, son élévation est le reflet d'une lésion cellulaire (Campos et *al.*, 2011).

**Glutamate pyruvate transaminase** : est une enzyme cytosolique caractéristique du foie, sa libération dans le milieu extracellulaire est donc le signe d'une atteinte hépatique (Campos et *al.*, 2011).

**Myéloperoxydase** : (MPO), est en plus de son activité de peroxydation, catalyse également la conversion de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de chlorure (Cl<sup>-</sup>) à l'acide hypochloreux (HOCl) (Andrews et Krinski 1982) .

**Malondialdéhyde** : (MDA), est le produit de la peroxydation des lipides, résultant de l'interaction entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et cellulaire et sous-cellulaire ou membranes (Aslan et *al.*, 1997).

**Xanthine oxydase** : (XO), une enzyme importante oxydant, son activité a été mesurée par spectrophotométrie par la formation d'acide urique à partir de la xanthine par l'augmentation d'absorption à 293 nm (Prajda et Weber 1975).

### LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tableau I	Composition de l'alimentation.	Annexe 1
Tableau II	Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 30 jours.	Annexe 2

<b>Tableau III</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 30 jours d'expérimentation.	14
<b>Tableau IV</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.	15
<b>Tableau V</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.	15
<b>Tableau VI</b>	Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 60 jours.	Annexe 2
<b>Tableau VII</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 60 jours d'expérimentation.	16
<b>Tableau VIII</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.	17
<b>Tableau IX</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.	18
<b>Tableau X</b>	Valeurs individuelles et moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%) de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.	Annexe 2
<b>Tableau XI</b>	Valeurs moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%) de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.	Annexe 2
<b>Tableau XII</b>	Signification statistique des différences des poids absolus et relatifs chez les rats traités par l'imidaclopride par rapport aux témoins.	Annexe 2

<b>Tableau XIII</b>	Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la période du traitement par l'imidaclopride.	Annexe 2
<b>Tableau XIV</b>	Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la dose et la période du traitement par l'imidaclopride	Annexe 2

### LISTE DES FIGURES

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 1</b>	Répartition des lots	10

<b>Figure 2</b>	Effet de 30 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.	19
<b>Figure 3</b>	Effet de 60 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.	20
<b>Figure 4</b>	Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles témoins après 30 et 60 jours d'expérimentation. Coloration: HE; Gr: x100 (a et c avec zoom) ; x400 (b et d).	22
<b>Figure 5</b>	Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours. Coloration: HE (a et b) Gr: x100 (a) ; x400 (b).	23
<b>Figure 6</b>	Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours. Coloration: HE (a et b) ; Trichome de Masson (c). Gr: x100 (a) ; x400 (b et c).	24
<b>Figure 7</b>	Effet de la dose 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).	25
<b>Figure 8</b>	Effet de la dose 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).	26
<b>Figure 9</b>	Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins Coloration: HE; Gr: x100 (a); x400 (b). Trichrome de Masson ; x100(c) ; x400 (d).	28

<b>Figure 10</b>	Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 30 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x100 (a et b).	29
<b>Figure 11</b>	Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 60 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x400 (a et b)	30

## SOMMAIRE

**INTRODUCTION.....1**

## **CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

<b>I.1.TOXICITE PAR VOIE ORALE DE L'IMIDACLOPRIDE.....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Toxicité sur les glandes sexuelles et la fertilité .....	3
I.1.2. au niveau du foie, système nerveux et les reins.....	4
I.1.3. Au niveau du système immunitaire.....	5

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

<b>II.1. MATERIEL.....</b>	<b>7</b>
II.1.1.Animaux et régimes.....	7
II.1.2. Insecticide.....	7
II.1.3. Appareillage et réactifs.....	9
<b>II.2. METHODES.....</b>	<b>9</b>
II.2.1. Expérimentation.....	9
II.2.2.Sacrifice des animaux et prélèvements des échantillons.....	11
II.2.3. Détermination des hormones thyroïdiennes .....	11
II.2.4. Etude histologique de la glande thyroïde et la rate.....	11
II.2.5. analyse statistique.....	13

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.1. RESULTATS.....</b>	<b>14</b>
III.1.1.Evolution pondérale.....	14
III.1.2. Histopathologie du parenchyme thyroïdien.....	21
III.1.3 Histopathologie du parenchyme splénique.....	27
<b>III.2. DISCUSSION.....</b>	<b>31</b>

<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>33</b>
---------------------------------------	-----------

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXES**



# **INTRODUCTION**





## INTRODUCTION

L'imidaclopride, 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-ylideneamine, était largement utilisé dans le monde entier pour la défense des cultures grâce à sa faible persistance dans le sol, sa haute activité insecticide à de faibles doses (Demsia et *al.*, 2007) et à sa faible toxicité chez les mammifères (Tomizawa et Casida, 2003). Récemment, la commission Européenne a lancé la restriction de son utilisation pour le traitement des semences, l'application au sol (en granulés) et le traitement foliaire des végétaux, y compris les céréales. Ceci à compter du premier décembre 2013 (INRAA, 2013).

Plusieurs recherches expérimentales ont souligné l'impact négatif de l'imidaclopride sur la santé humaine et animale. Chez les rats, cet insecticide provoque une toxicité sub-chronique dose-dépendante. La dose de 20 mg/kg/j pendant 90 jours induit une augmentation des poids du foie, des reins, des surrénales, une diminution du poids des ovaires, une nécrose des cellules nerveuses, des hépatocytes, une dégénérescence des glomérules rénaux et des modifications morpho-pathologiques au niveaux des follicules ovariens (Bhardwaj et *al.*, 2010 ; Kapoor et *al.*, 2011). Par ailleurs, la 1/10 DL50 d'imidaclopride entraîne une augmentation de l'activité antioxydante chez des rats administrés pendant 90 jours (EL-Gendy et *al.*, 2010). Aourag (2013) a montré que le traitement d'imidaclopride à raison de 1/85 DL50 pendant 30 jours entraîne une hépatotoxicité.

Les recherches menées dans notre laboratoire sur la toxicité d'imidaclopride ont aussi révélé des signes de toxicité aiguë et subaiguë par voie orale des doses faibles d'imidaclopride (1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/85 et 1/120) au niveau de plusieurs tissus chez les rats femelles. Ces signes marquent la présence d'un processus inflammatoire caractérisé généralement par une congestion sanguine et une infiltration cellulaire (Boukenoui et Mahboubi, 2010 ; Hema, 2011, Boukenoui, 2012, Mahboubi, 2012). La toxicité d'imidaclopride chez les rats femelles est bien prononcée à partir de 30 jours et elle est moins importante avec les plus faibles doses (1/85 et 1/120) (Boukenoui, 2012, Mahboubi, 2012).

Cependant, tous les organes sont sensibles aux différents traitements à l'imidaclopride (Boukarzi, 2012 ; Arkame, 2012, Agoud, 2012) mais la thyroïde reste l'organe le plus sensible. Selon Mahboubi (2012), l'imidaclopride est un agent perturbateur de la fonction thyroïdienne. Le parenchyme glandulaire montre un aspect de tissu nécrosé avec effondrement des follicules au cours de traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 pendant 30 jours.

Afin de poursuivre nos études sur la recherche de la toxicité chronique des doses faibles d'imidaclopride au niveau tissulaire et ses caractéristiques y compris l'effets dose et temps dépendants, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à la recherche de la toxicité chronique par voie orale de deux doses 1/120 et 1/85 DL50 pendant 60 jours. Ces recherches comportent le suivi des poids corporels des rats et des organes, ainsi que l'étude histopathologie des thyroïdes et des rates après 30 jours et 60 jours de traitement à l'imidaclopride.

Notre travail comporte trois chapitres. Le premier est consacré aux rappels bibliographiques sur la toxicité de l'imidaclopride. Le deuxième décrit le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre présente les résultats et leur discussion. Une conclusion générale et des perspectives sont proposées à la fin de ce travail.

## **I.1. TOXICITE PAR VOIE ORALE DE L'IMIDACLOPRIDE**

L'imidaclopride est un insecticide néonicotinoïde comme un agent toxique de classe II par l'agence de protection de l'environnement. Pour cette raison, il est marqué obligatoirement par un signe «avertir» ou «attention» (Al-Sayeda, 2007).

La recherche de la toxicité de l'imidaclopride (IMI) chez les mammifères a fait l'objet de nombreuses études expérimentales qui ont montré que la contamination avec cet insecticide peut induire une altération morpho-fonctionnelle de certains organes comme le foie, les reins (Arfat et *al.*, 2014), la rate (Prarabdh et *al.*, 2013) et le cerveau (Milindmitra et *al.*, 2014). Chez les rats, la toxicité touche surtout le foie, les reins, la thyroïde, les yeux et le système nerveux (Duzguner et Erdogan, 2012).

### **I.1.1. Toxicité sur les glandes sexuelles et la fertilité**

D'après Kapoor et *al.* (2011), une exposition de 20mg/kg/jr entraîne des altérations cellulaires tels que la présence de lipofuschine dans les cellules de la granulosa et des changements de taux de l'hormone lutéinisante, l'hormone folliculo-stimulante, la progestérone, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et de niveau de lipide peroxydation chez les rats femelles. Alors que la dose 5 et 10mg/kg/jr n'a aucun effet toxique sur les ovaires qui garde une architecture normale.

Une étude de toxicité développementale a montré que la dose de 72 mg/kg/j d'IMI administrée par voie orale pendant les 6 à 19 jours de gestation chez des lapins a entraîné une augmentation importante de la toxicité maternelle se traduisant par une augmentation du nombre d'avortements et de résorptions de toute la portée ainsi qu'une légère augmentation des altérations squelettiques (Koshlukova, 2006).

La recherche de la toxicité chronique de l'imidaclopride sur la fertilité des rats males a affirmé que des doses de 0,5, 2 et 8mg/kg/j provoquent une diminution des concentrations en spermatozoïdes dans l'épididyme, du taux de testostérone et une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux. L'apoptose et la fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) séminal étaient aussi observées chez les groupes traités à 2 et 8 mg/kg d'IMI (Ramazan et *al.*, 2012).

Une autre étude a montré une atrophie des tubules séminifères, une réduction de la mobilité des spermatozoïdes et même un arrêt de la spermatogénèse à des doses de 7 et 14 mg/kg/j d'imidaclopride (Najafi et *al.*, 2010).

### **I.1.2. Au niveau du foie, du système nerveux et les reins**

Plusieurs études en toxicologie expérimentale ont montré l'effet néfaste de l'imidaclopride sur les organes vitaux. Chez des rats femelles, l'administration de l'imidaclopride à raison de 20 mg/kg par voie orale pendant 90 jours a induit une augmentation du poids relatif du foie et une élévation des taux sériques de plusieurs enzymes y compris, la glutamate oxaloacétate transaminase et la glutamate pyruvate transaminase. Au niveau tissulaire, cette même dose a produit des nécroses aux niveaux des hépatocytes montrant des noyaux enflés et des lésions cytoplasmique et des cellules de purkinji ainsi qu'une perte des dendrites et des granules dans la couche granulaire du cervelet (Bharwaj et *al.*, 2010 ; Kapoor et *al.*, 2011).

L'examen histologique du foie a aussi montré une dilatation de la veine centrale et des sinusoides suite à un traitement de quatre semaines à 1/10 DL50 d'IMI des rats femelles (Harmandeep et *al.*, 2013). El-Gendy et *al.* (2010) ont rapporté qu'à cette même dose, l'activité antioxydant des glutathion peroxydase, myéloperoxydase, malondialdéhyde et la xanthine oxydase augmente dans le cas d'une exposition de 90 jours.

Duzunger et Erdogan (2012), ont décrit lors d'une exposition chronique à l'imidaclopride à raison de 1mg/kg/jour, l'installation d'une inflammation au niveau du foie et du système nerveux central via la production de cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumoral alpha, interleukine (1beta, 12 et 16)) et une altération du système antioxydant.

Cependant, l'administration d'IMI à raison de 307 mg/kg/j est à l'origine de tremblements, d'anomalies de la démarche et de déficiences du reflex de redressement ainsi que de réductions de la force de préhension, de la réponse à des stimulus, de la température corporelle et de l'activité motrice et locomotrice chez le rat (Sheets, 1994 *in* Koshlukova ,2006).

Chez les souris mâles, Arfat et *al.* (2014) ont rapporté qu'une toxicité par voie orale de la dose 15mg/kg/jr d'IMI pendant 15 jours a induit une dégénérescence des tubules et des glomérules et une hémolyse dans les reins.

Chez les animaux domestiques, une forte exposition aux produits vétérinaires présentant de l'imidaclopride dans leurs constitutions provoque des vomissements, salivation, difficulté de locomotion, tremblements, réaction cutanées et des signes de fatigue (Alvinerie, 2005). Notamment chez les chiennes traitées d'IMI, la consommation alimentaire diminue de 9-14% accompagnée d'une élévation du taux du cholestérol plasmatique et une augmentation du poids relatif du foie et du cerveau. Des tremblements violents et des changements morphologiques du foie et de la thyroïde ont aussi été rapportés (Allen et *al.*, 1989).

### **I.1.3. Au niveau du système immunitaire**

Chez les souris traitées par 5 et 10 mg/kg/j d'IMI, une réduction de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ainsi que des congestions splénique, hépatique, rénale et pulmonaire sont révélées. Cette toxicité par voie orale est associée à une déplétion lymphocytaire et une augmentation du nombre de neutrophiles et de cellules réticulo-endothéliales. Alors qu'à 2,5mg/kg/jour, il n'y a aucun changement significatif dans les réponses immunitaires (Prarabdh et *al.*, 2013).

L'exposition sub-chronique de l'IMI à faibles doses sur des lapins a révélé son effet toxique sur les lymphocytes mais aucune différence significative n'a été observée sur la fréquence des micronoyaux (Polychronis et *al.*, 2012).

*In vitro*, l'imidaclopride est jugé clastogène sur les lymphocytes humains, induisant des lacunes au niveau les chromatides (Costa et *al.*, 2011). Des échanges de chromatides sœurs ont aussi été reportés pendant la phase S impliquant par la suite la rupture des deux brins d'ADN, suivie d'un échange de duplex d'ADN entiers (Van Veen et Hawley, 2003).

Parallèlement, de nombreux travaux sont menés au sein de notre laboratoire confirmant la présence d'altérations structurales à des doses d'IMI bien inférieures à celles décrites par la littérature au niveau des différents parenchymes : pulmonaire

(Boukersi, 2012 ; Arkame, 2013), hépatique (Boukenoui et Mahboubi, 2010 ; Kerkar et Kheldoun, 2010 ; Agoud, 2013), thyroïdien (Boudegzdame, 2013 ; Mahboubi, 2013), rénal (Aourag, 2013), ovarien (Mahboubi, 2013), surrénalien et de la rate (Boukenoui, 2013). Ces altérations sont associées aux perturbations des hormones thyroïdiennes (Boudegzdame, 2013) et biochimiques (Kerkar et Kheldoun, 2010) chez des rats femelles de souche Wistar traités par plusieurs doses faibles d'imidaclopride, Confidor®, à savoir les 1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/85 et 1/120 DL50.

La présente étude a pour objectif, la recherche de la toxicité chronique par voie orale de deux faibles doses d'imidaclopride (1/120 et 1/85 DL50) et leurs effets dose et temps dépendants au niveau de la thyroïde et de la rate chez des rats femelles en croissance. Elle est réalisée au niveau des laboratoires de physiologie animale de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, du service d'anatomopathologie CHU-Hussein Dey- Alger et du laboratoire d'analyse médicale de Hadjout durant la période étalée de mois de mai au septembre 2014.

## **II.1. MATERIEL**

### **II.1.1. Animaux et régimes**

Notre étude est portée sur 50 rats femelles de souche Wistar, en croissance, acquièrent auprès de l'institut pasteur de Kouba. Le poids moyen dont est situé entre 119,86 g et 185,77 g.

Avant toute expérimentation, les animaux sont gardés une semaine dans l'animalerie où la température ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), le degré d'hygrométrie ( $70\pm 10\%$ ), avec une période de lumière qui commence à 7h du matin sont contrôlés. Tous les animaux reçoivent un régime alimentaire standard équilibré sous forme de bouchons (Tableau I de l'annexe I) provenant de la société industrielle de concentré à Bouzerea, Alger. L'alimentation et l'eau sont fournies *ad-libitum*.

### **II.1.2. Insecticide**

L'imidaclopride (IMI), insecticide commercialisé présenté dans un flacon contenant un litre de solution concentrée (200 g/ml), est utilisée sous forme diluée selon les doses choisies (1/120 et 1/85 DL50) et d'après le poids de chaque animal.



II.1.2.1. première dose

A partir de la DL50 qui est de 424mg/kg/jour chez la femelle (LARAMEE, 2007), nous avons calculé la première dose, 1/120 DL50 d'IMI :

$$\begin{array}{l} \text{DL50} \longrightarrow 424 \text{ mg/kg} \\ \text{1/120 DL50} \longrightarrow X \end{array} \quad X = \frac{424}{120} = 3,533 \text{ mg/kg}$$

$$X = 1/120 \text{ DL50 IMI} = 3,533 \text{ mg/kg}$$

Pour trouver le volume à prélever de la solution mère, nous avons:

$$\begin{array}{l} 200\text{mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 3,533 \text{ mg} \longrightarrow X_1 \end{array} \quad X_1 = \frac{3,533}{200} = 0,0176 \text{ ml}$$

$$X_1 = \text{volume de 1/120 DL50 IMI} = 0,0176 \text{ ml}$$

La dose administrée pour chaque rat est calculée par la suite en fonction de son poids,

Exemple : si le poids corporel est de 114g la dose administrée sera par conséquent :

$$\begin{array}{l} 1000\text{g} \longrightarrow 0,0176 \text{ ml} \\ 114 \text{ g} \longrightarrow X_2 \end{array} \quad X_2 = \frac{114 \times 0,0176}{1000} = 0,0020 \text{ ml}$$

$$X_2 = \text{volume de 1/120 DL50 IMI administré} = 0,0020 \text{ ml}$$

II.1.2.2. Deuxième dose

La deuxième dose est de 1/85 DL50 d'IMI :

$$\begin{array}{l} \text{DL50} \longrightarrow 424 \text{ mg/kg} \\ \text{1/85 DL50} \longrightarrow X_3 \end{array} \quad X_3 = \frac{424}{85} = 4,9882 \text{ mg/kg}$$

$$X_3 = 1/85 \text{ DL50 IMI} = 4,9882 \text{ mg/kg}$$

Pour trouver le volume à prélever de la solution mère, nous avons :

200mg  $\longrightarrow$  1 ml

4,9882 mg  $\longrightarrow$   $X_4$

$$X_4 = \frac{4,9882}{200} = 0,0249 \text{ ml}$$

**$X_4 = \text{volume de } 1/85 \text{ DL50 IMI} = 00,0249 \text{ ml}$**

### **II.1.3. Appareillage et réactifs**

Le matériel non biologique est spécifique à l'étude histopathologie (annexe 1).

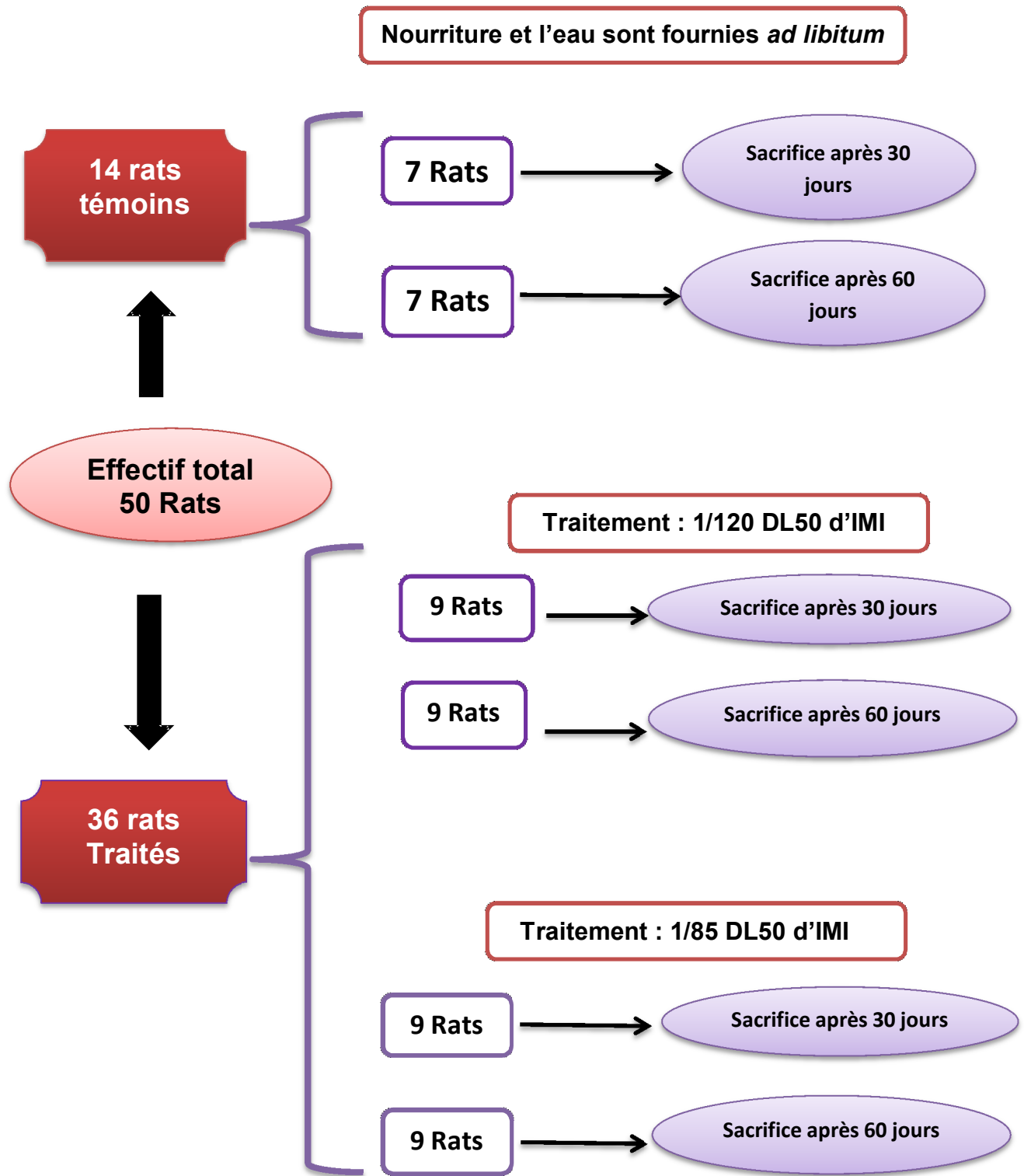
## **II.2. METHODES**

### **II.2.1. Expérimentation**

Les rats sont répartis en six lots (Figure 1):

- 1<sup>er</sup> lot est composé de 7 rats témoins qui reçoivent que de l'eau et de la nourriture quotidiennement pendant 30 jours.
- 2<sup>ème</sup> lot est composé de 7 rats témoins qui reçoivent que de l'eau et de la nourriture quotidiennement pendant 60 jours.
- 3<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/120 DL50d'IMI pendant 30 jours.
- 4<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/120 DL50d'IMI pendant 60 jours.
- 5<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/85DL50d'IMI pendant 30 jours.
- 6<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/85DL50d'IMI pendant 60 jours.

Tous les rats reçoivent de l'eau et de la nourriture à volonté. La prise du poids corporel est réalisée une fois par semaine afin de suivre l'évolution de la masse corporelle ainsi de réduire l'effet du stress durant le gavage.



**Figure 1:** Répartition des lots.

### **II.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons**

Après une légère anesthésie avec le chloroforme, les sacrifices sont réalisés par décapitation après la fin de la période de traitement de chaque groupe et cela la matinée entre 9h et 11h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.

Le sang artério-veineux est recueilli dans des tubes secs, héparinés et des tubes contenant 10% de l'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA) afin de réaliser ultérieurement les différents dosages biochimique et hématologique. Le plasma et le sérum obtenu après une centrifugation à 3000 tours /min pendant 20 minutes sont congelés à -20°C afin de réaliser les dosages hormonales.

Les thyroïdes et les rates sont aussi rapidement prélevées sur un lit de glace. Les rates sont pesées. Alors que les thyroïdes ne sont pas pesés vu la difficulté de les débarrassées du cartilage. Les organes sont ensuite fixés dans le formol à 10% afin de chercher ultérieurement les altérations structurales au microscope photonique.

### **II.2.3. Etude histopathologie de la glande thyroïde et la rate**

Afin de réaliser l'étude histopathologie sur la thyroïde et la rate, nous avons utilisé les étapes décrites selon Martoja et Martoja (1967).

#### **II.2.3.1. Fixation et rinçage**

La fixation sert d'assurer le maintien de la structure morphologique et de l'intégrité chimique des tissus tels qu'elles se présentant au moment de leur prélèvements.

Les organes sont fixés dans le formol à 10% pendant 48 heures puis rincés à l'eau courante pendant 24 heures.

#### **II.2.3.2. Déshydratation et éclaircissement**

Les organes sont imprégnés dans sept bains d'alcool éthylique à concentration croissante :

- Alcool 70° (trois bains de 30 minutes).
- Alcool 95° (deux bains de 30 minutes).
- Alcool 100° (deux bains de 30 minutes).

L'éclaircissement est effectué dans deux bains de xylène pendant 30 minutes chacun.

#### **II.2.3.3. Imprégnation**

Dans une étuve réglée à 56° C, les organes sont imprégnés dans deux bains successifs : le premier bain de 50% de xylène et 50% de paraffine pure et le deuxième bain comprend que de la paraffine pure. La durée est d'une heure pour chacun.

#### **II.2.3.4. Inclusion et mise en bloc**

L'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine.
- Placement des cassettes sur les quelles est inscrit le numéro et l'état de l'animal.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 7 minutes.

#### **II.2.3.5. Confection des coupes et collage des rubans**

Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome « type Leica » avec une épaisseur de 5 µm. Les rubans sont étalés dans un bain d'eau thermostatée (37°C) puis récupérés et collés sur des lames gélatinées et ensuite séchés dans l'étuve à 40°C pendant 24 heures.

#### **II.2.3.7. Déparaffinage et hydratation**

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans quatre bains de xylène pendant

deux minutes chacun. Les coupes sont hydratées dans quatre bains d'éthanol décroissant : 100° ; 95° ; 90° ; 70° pendant deux minutes chacun.

#### **II.2.3.8. Coloration**

Deux méthodes de coloration sont utilisées, l'hématoxyline-éosine et trichrome de Masson (annexe 1).

#### **II.2.3.9. Montage et observation**

Une lamelle est fixée à l'aide d'un l'Eukitt sur chaque coupe. Les lames sont nettoyées par le xylène. L'observation microscopique est réalisée à l'aide d'un microscope photonique aux différents grossissements : x100, x400 . La prise des photos est effectuée par une photo microscope Leica.

#### **II.2.4. Analyse statistique**

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  Ecart-type. Les comparaisons intergroupes des témoins et des traités sont réalisées avec le logiciel StatEL. Le test statistique utilisé est le test t de student. La différence est jugée :

- Non significative (NS) quand  $p > 0,05$ .
- Significative (\*) quand  $0,02 < p < 0,05$ .
- Très significative (\*\*) quand  $0,01 < p < 0,02$ .
- Hautement significative (\*\*\*) quand  $p < 0,01$ .

Le poids relatif des organes est déterminé comme suit :

$$\frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids absolu (g)}} \times 100$$

### III.1. RESULTATS

La recherche des aspects et les caractéristiques de la toxicité chronique par voie orale d'imidaclopride à raison de 1/120 et 1/85 DL50 est basée sur l'étude de l'évolution pondérale et l'étude histopathologique du parenchyme thyroïdien et splénique chez des rats femelles de souche Wistar.

#### III.1.1. Evolution pondérale

##### III.1.1.1. Poids corporel

- Après 30 jours d'expérimentation

Selon les résultats obtenus après 30 jours d'expérimentation, nous avons enregistré une croissance pondérale chez tous les rats du premier lot témoin (156,18 g  $\pm$  20,82 vs 119,86 g  $\pm$  11,39) (Tableau II de l'annexe 2 et III) et traités par 1/120 DL50 d'IMI (166,29 g  $\pm$  9,52 vs 115,97 g  $\pm$  2,88) (Tableau II de l'annexe 2 et IV) ainsi que chez la majorité des rats traités (n=7) par 1/85 DL50 d'IMI (192,85 g  $\pm$  17,63 vs 159,34 g  $\pm$  15,41) (Tableau II de l'annexe 2 et V).

**Tableau III : Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 30 jours d'expérimentation.**

	Lot 1 témoin (30 jours)			
	Avant Expérimentation	Après Expérimentation	% de gain de poids	
1	123,15	139,46	13,24	
2	127,55	152,90	19,87	
3	123,18	185,85	50,87	
4	128,21	148,29	15,66	
5	120,00	148,10	23,41	
6	94,88	134,00	41,23	
7	122,08	184,69	51,28	
<b>Moyenne et ecartype</b>	<b>119,86 <math>\pm</math> 11,39</b>	<b>156,18 <math>\pm</math> 20,82</b>	<b>30,79</b>	<b>Gain</b>

Le gain du poids est de 30,79%, 42,21% et 21,84% respectivement (Tableaux III, IV et V). Il faut noter qu'une perte de poids (149,57g ± 9,29 vs 164,56g ± 0,40 ; -9,1%) est remarquée chez deux rats traités par 1/85 DL50 d'IMI (Tableau V).

**Tableau IV:** Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.

	Poids de premier lot de 1/120 DL50 (30 jours)			Gain
	Avant Expérimentation	Avant Expérimentation	% gain de poids	
1	114,11	185,60	62,65	
2	113,46	172,02	51,61	
3	117,97	166,00	40,71	
4	119,83	164,02	36,87	
5	114,09	161,03	41,14	
6	117,88	163,00	38,27	
7	111,03	161,80	45,72	
8	117,24	156,92	33,84	
9	118,12	152,55	29,14	
<b>M ± E</b>	<b>115,97 ± 2,88</b>	<b>166,29 ± 9,52</b>	<b>42,21</b>	

**Tableau V:** Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.

	Poids de premier lot de 1/85 DL50 (30 jours)			Gain
	Avant Expérimentation	Après Expérimentation	% gain de poids	
1	165,03	212,44	28,72	
2	161,14	162,90	1,09	
3	161,28	194,60	20,65	
4	166,47	212,01	27,35	
5	163,78	183,40	11,97	
6	125,47	184,40	46,96	
7	172,33	200,21	16,17	
<b>Moyenne et écartype</b>	<b>159,34 ± 15,41</b>	<b>192,85 ± 17,6</b>	<b>21,84</b>	
8	164,85	143,00	-13,25	
9	164,28	156,14	-4,95	



Moyenne et ecartype	164,56 ± 0,40	149,57 ± 9,29	-9,1	Régression
---------------------	---------------	---------------	------	------------

- Après 60 jours d'expérimentation

Au cours des 60 jours d'expérimentation, le deuxième lot des rats témoins montre une prise de poids progressive (171,77 g ± 19,75 vs 148,57 g ± 9,84) avec un gain de 17,48% (Tableau VI de l'annexe 2 et tableau VII).

**Tableau VII: Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 60 jours d'expérimentation.**

	Lot 2 témoin (60 jours)			
	Avant Expérimentation	Après Expérimentation	% de gain de poids	
1	157	179,99	14,64	
2	159	172,02	8,18	
3	154	159,00	26,6	
4	154	202,46	31,46	
5	142	173,27	22	
6	141	143,90	2,04	
7	133	Mort	-	
<b>M et E</b>	<b>148,57 ± 9,84</b>	<b>171,77 ± 19,75</b>	<b>17,48</b>	<b>Gain</b>

Par ailleurs, la majorité des rats traités à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 ( $n_1=8$  ;  $n_2= 8$ ) ont montré un gain de poids pendant les premiers 30 jours (10,95% et 24,52% respectivement). Un seul rat de chaque lot traité a présenté une régression pondérale (-8,29% et -4,81% respectivement).

Pendant les 30 jours restant, une trop faible croissance est remarquée seulement chez deux rats traités par 1/120 DL50 d'IMI (2,9%) et devient peu faible chez cinq rats traités par 1/85 DL50 d'IMI (12,64%). Alors que la perte de poids touche plus de rats traités par rapport à la première période d'expérimentation (30 jours). Elle est notée chez six rats traités par 1/120 DL50 d'IMI (-6,39%) et chez quatre rats traités par 1/85 DL50 d'IMI (-15,18%) (Tableaux VII et IX).

**Tableau VIII:** Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.

Poids de deuxième lot de 1/120 DL50 (60 jours)						
N° Rat	Avant Expérimentation	Après 30 jours	% gain de poids	Après Expérimentation	% gain de poids	
1	119,78	146,21	21,97	148,00	1,22	
2	144,69	154,63	6,86	159,23	2,97	
Moyenne et Ecartype	132,23 ± 17,61	150,42 ± 5,95	-	153,61 ± 7,94	2,09	Gain
3	145,19	168,24	15,87	-	-	
4	149,87	158,23	5,57	-	-	
5	151,74	173,43	14,29	-	-	
6	145,04	150,41	3,70	-	-	
8	144,95	153,53	5,91	-	-	
Moyenne et Ecartype	147,35 ± 3,21	160,76 ± 9,77	10,95	-	-	
3	-	-	-	157,20	-6,56	
4	-	-	-	150,00	-5,20	
5	-	-	-	165,47	-4,58	
6	-	-	-	140,00	-6,92	
7	149,43	142,24	-4,81	136,73	-3,87	
8	-	-	-	136,25	-11,25	
9	Mort			-		
M ± E	-			147,60 ±12,01	-6,39	Régression

**Tableau IX: Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.**

<b>Poids de deuxième lot de 1/85 DL50 (60 jours)</b>						
<b>N° Rat</b>	<b>Avant Expérimentation</b>	<b>Après 30 jours</b>	<b>% gain de poids</b>	<b>Après Expérimentation</b>	<b>% gain de poids</b>	
<b>1</b>	104,29	123,33	<b>18,25</b>	128,00	<b>3,78</b>	
<b>2</b>	101,00	135,26	<b>33,83</b>	164,00	<b>21,24</b>	
<b>3</b>	101,26	139,66	<b>37,92</b>	150,80	<b>7,97</b>	
<b>4</b>	108,89	136,52	<b>25,37</b>	150,20	<b>10,23</b>	
<b>5</b>	107,65	138,77	<b>28,90</b>	166,50	<b>19,98</b>	
<b>6</b>	100,02	142,52	<b>42,49</b>	-	-	
<b>7</b>	131,74	143,52	<b>8,94</b>	-	-	
<b>8</b>	114,00	114,54	<b>0,47</b>	-	-	
<b>M ± E</b>	<b>108,60 ± 10,48</b>	<b>134,26 ± 10,12</b>	<b>24,52</b>	<b>151,90 ± 15,28</b>	<b>12,64</b>	<b>Gain</b>
<b>6</b>	-	-	-	138,26	<b>-2,98</b>	
<b>7</b>	-	-	-	120,37	<b>-16,13</b>	
<b>8</b>	-	-	-	92,87	<b>-18,91</b>	
<b>9</b>	101,44	93,03	<b>-8,29</b>	71,90	<b>-22,71</b>	
<b>M ± E</b>	-			<b>105,85 ± 29,33</b>	<b>-15,18</b>	<b>Régression</b>

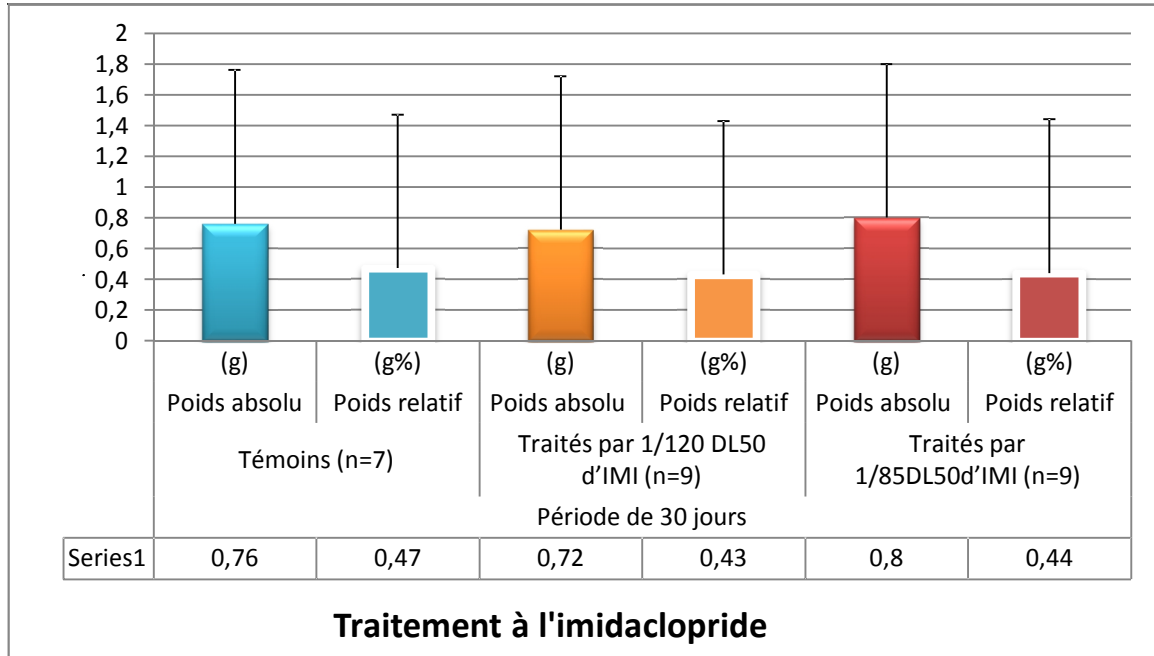
III.1.1.2. Poids des rates

Les résultats rassemblés dans les tableaux X et XI de l'annexe 2 et les figures 2 et 3 présentent les poids absolus et relatifs de la rate et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités à l'imidaclopride.

- Après 30 jours d'expérimentation

En comparaison à ceux des témoins (0,76 g ± 0,13), le poids absolu des rates ne semble pas connaître une modification statistiquement significative après 30 jours de traitement à l'imidaclopride (0,72 g ± 0,08 les rats traités par 1/120 DL50 et 0,8 g ± 0,11 chez les rats traités par 1/85 DL50) (tableaux X et XI de l'annexe 2).

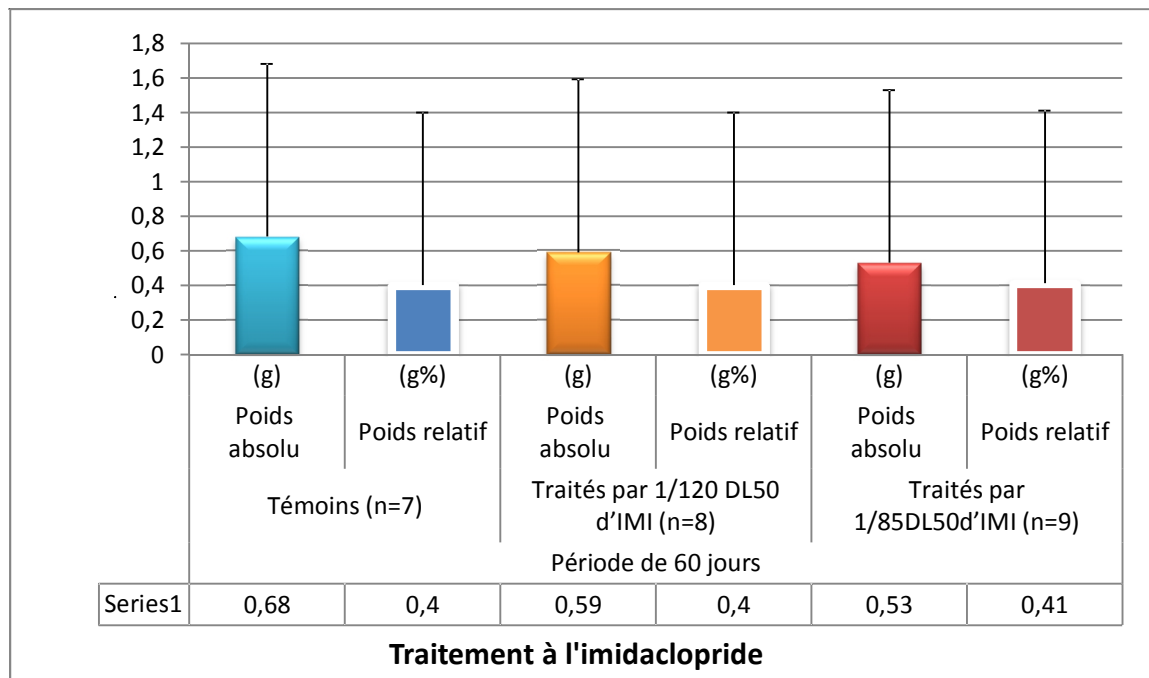
En comparaison avec les témoins (0,47g% ± 0,09), le poids relatif des rates ne semble pas connaître une modification statistiquement significative chez les rats traités par 1/120 et 1/85 DL50 d'IMI (0,43g% ± 0,05 et 0,44g% ± 0,08 respectivement (tableau XI et XII de l'annexe 2).



**Figure 2 : Effet de 30 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.**

- Après 60 jours d'expérimentation

Au cours des 60 jours d'expérimentation et en comparaison à celui des témoins ( $0,68g \pm 0,11$ ), le poids absolu des rates semble connaître une perte de poids chez les rats traités par 1/120 DL50 et 1/85 DL50 d'IMI ( $0,59 g \pm 0,10$  et  $0,53 g \pm 0,16$  respectivement). Cette diminution reste du point de vue statistique non significative. Cependant, le poids relatif des rates a montré une légère augmentation statistiquement non significative par rapport aux témoins ( $0,40g\% \pm 0,06$  ;  $0,41g\% \pm 0,12$  et  $0,40g\% \pm 0,06$  respectivement) (figure 3 et tableaux X ,XI, XII de l'annexe 2).



**Figure 3 : Effet de 60 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.**

Nous constatons aussi qu'avec les deux doses, la durée du traitement à l'imidaclopride (après 30 et 60 jours) semble influencer les poids absolus et relatifs des rates chez les rats traités par 1/120 DL50 ( $0,72g \pm 0,08$  vs  $0,59g \pm 0,10$  et  $0,43g\% \pm 0,05$  vs  $0,40g\% \pm 0,06$  respectivement) et par 1/85 DL50 ( $0,80g \pm 0,11$  vs  $0,53g \pm 0,16$  et  $0,44g\% \pm 0,08$  vs  $0,41g\% \pm 0,12$  respectivement). La diminution des ces poids reste statistiquement non significative (tableaux XII et XIV de l'annexe 2).

### **III.1.2. Histopathologie du parenchyme thyroïdien**

#### **III.1.2.1. Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats témoins**

D'après la microscopie photonique, les coupes fines au niveau de la glande thyroïde des rats témoins présentent un parenchyme constitué de nombreux follicules de diamètres variables, situés dans un stroma conjonctivo-vasculaire (figure 4 a et c). Chaque follicule est délimité d'un épithélium simple formé de thyrocytes possédant des noyaux sombres. Ces cellules entourent une lumière large remplie de colloïde. Le tissu conjonctif interstitiel est plus ou moins important (Figure 4 b et d).

#### **III.1.2.2. Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats traités pendant 30 jours**

- Rats traités par 1/120 DL50

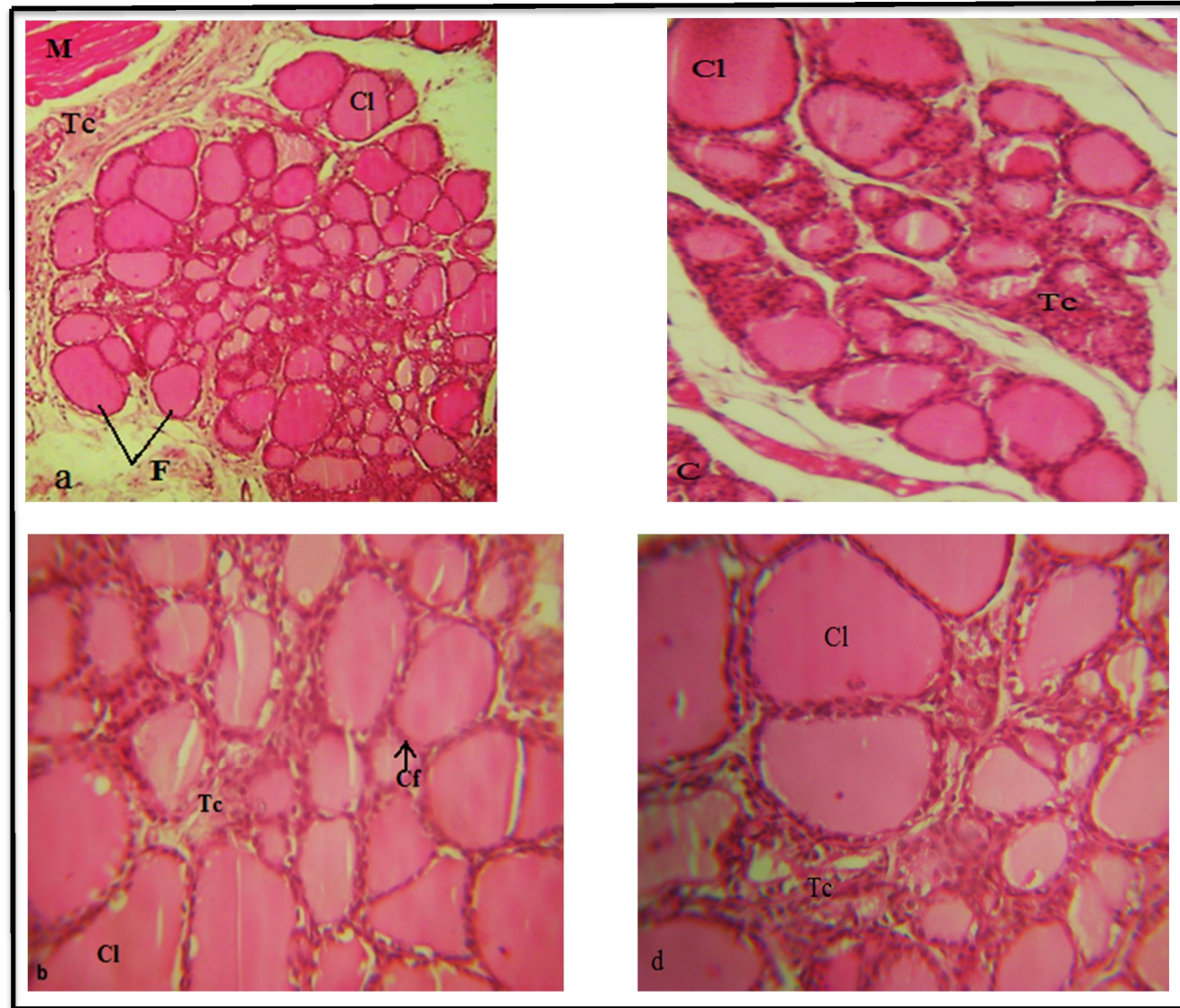
Chez les rats traités par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours, le parenchyme thyroïdien préserve son organisation structurale générale alors que l'augmentation du nombre de petits follicules devient apparente et la colloïde disparaît dans certains follicules (figure 5 a). Au niveau des cellules folliculaires (thyrocytes), le cytoplasme maintient son aspect normal (figure 5 b).

- Rats traités par 1/85 DL50

Le parenchyme thyroïdien chez les rats traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours, présente un aspect général normal avec une augmentation du nombre de petits follicules. La colloïde devient moins apparente dans certains follicules (figure 6 a). Au niveau des cellules folliculaires (thyrocytes), le cytoplasme devient très clair (figure 6 b et c).

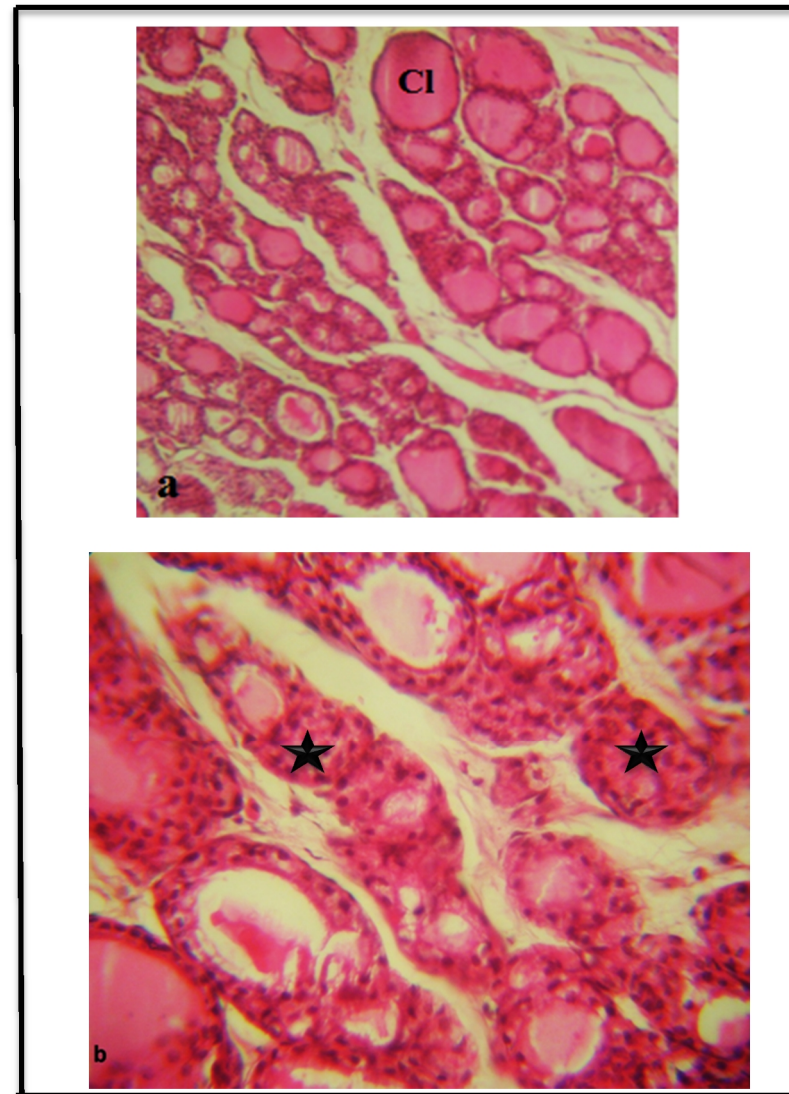
#### **III.1.2.3. Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats traités pendant 60 jours**

Le parenchyme thyroïdien des rats traités par 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 60 jours présente l'installation des altérations retrouvées après 30 jours pour chaque lot (figures 7 et 7 a et b respectivement) avec la présence de l'aspect clair du cytoplasme dans certaines thyrocytes chez les rats traités par 1/120 DL50 (figure 7b).



F : follicules ; Cf : Cellules folliculaires ; Cl : colloïde; Tc: Tissu conjonctif ; M : Muscle.

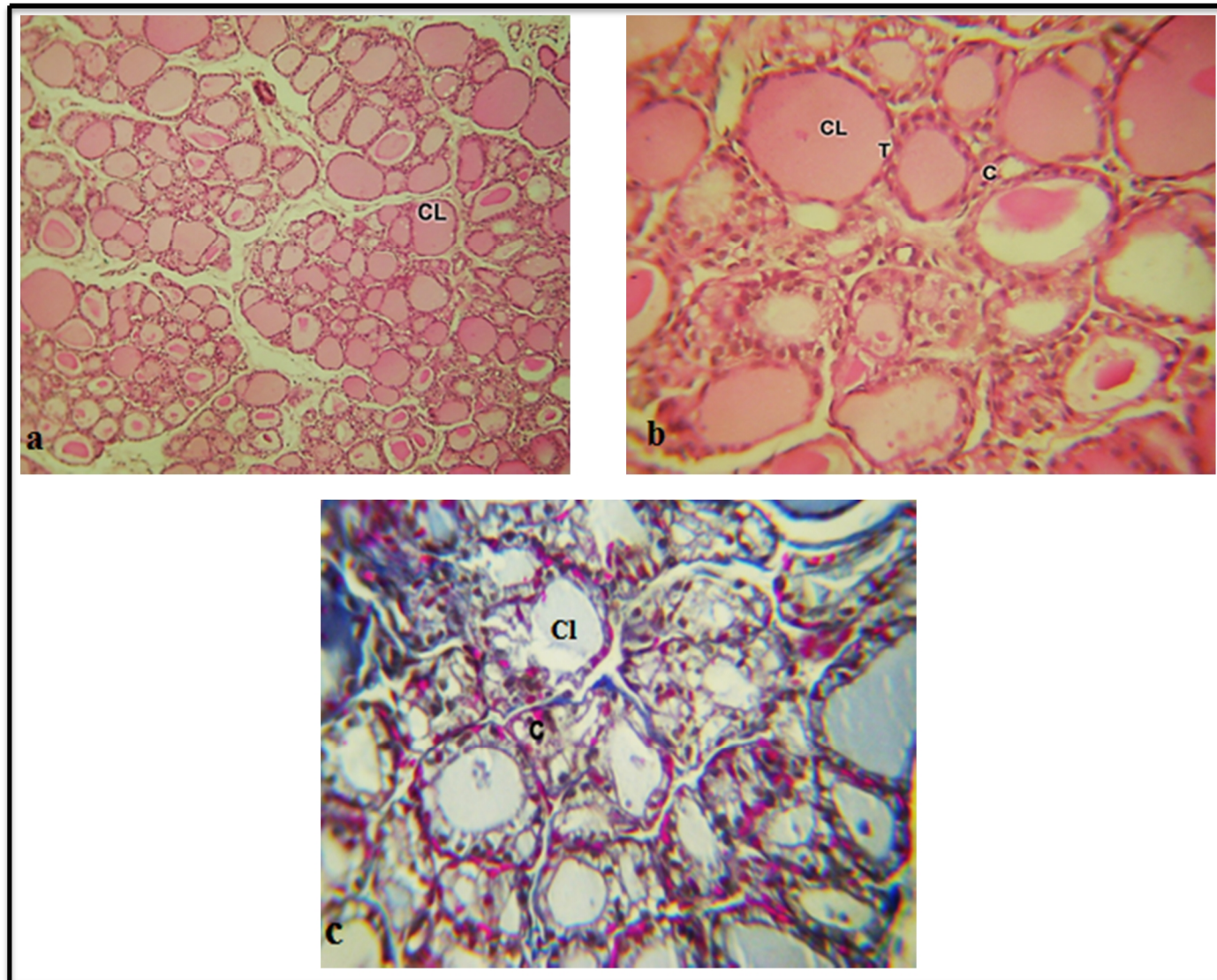
**Figure 4** : Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles témoins après 30 et 60 jours d'expérimentation. Coloration: HE; Gr: x100 (a et c avec zoom) ; x400 (b et d).



★ : Absence du colloïde.

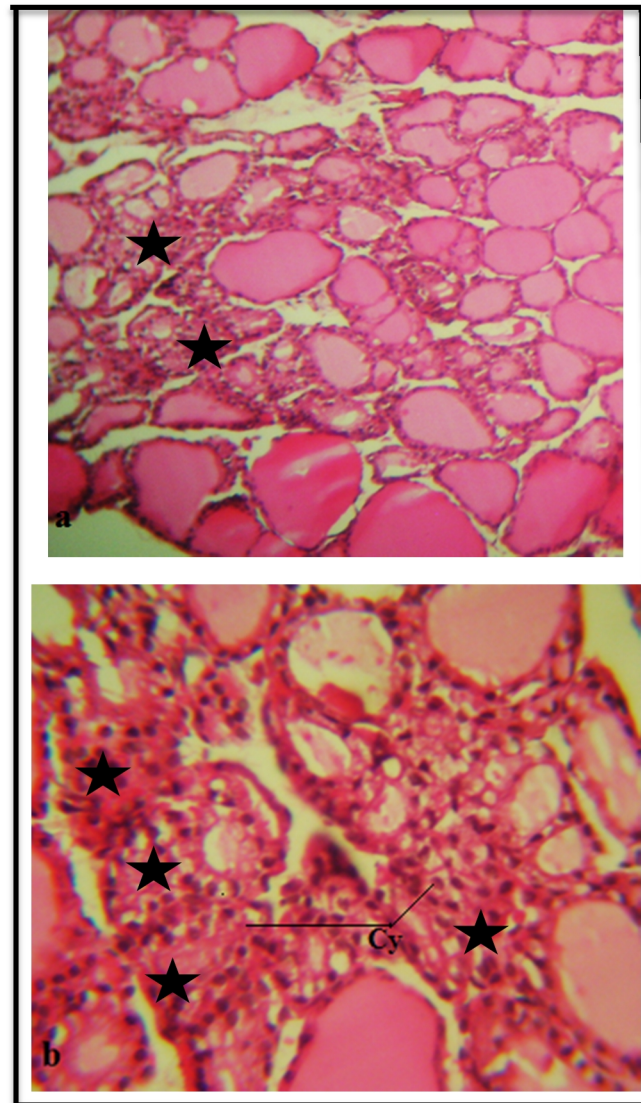
**Figure 5** : Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours.  
Coloration: HE (a et b) Gr: x100 (a); x400 (b).





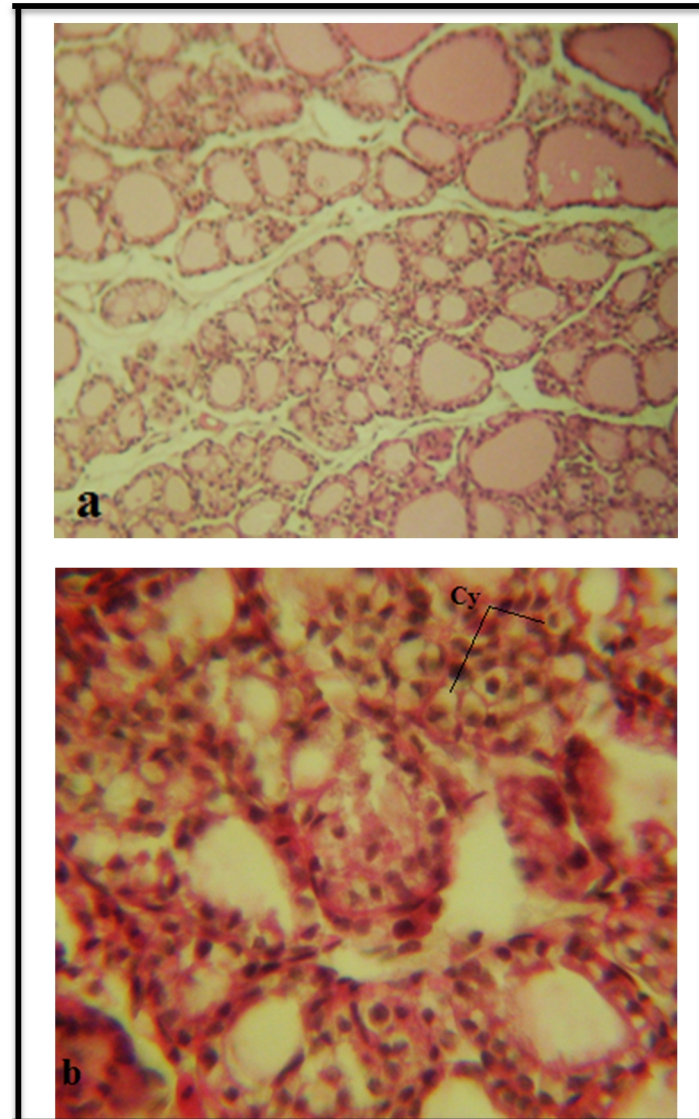
C : Cellules ; Cl : colloïde ; T : Thyrocytes.

**Figure 6** : Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours.  
Coloration: HE (a et b) ; Trichome de Masson (c). Gr: x100 (a) ; x400 (b et c).



★: Absence du colloïde ; Cy : Cytoplasme clair.

**Figure 7** : Effet de la dose 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).



Cy : Cytoplasme clair.

**Figure 8** : Effet de la dose 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).

### **III.1.3. Histopathologie du parenchyme splénique**

#### **III.1.3.1. Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins**

Le parenchyme splénique des rats témoins est constitué de la pulpe rouge et de la pulpe blanche entourées d'une capsule dense qui projette des travées plus fines et ramifiées s'infiltrant dans le parenchyme pulpeux.

La pulpe blanche entoure et suit les artères et s'épaissit en masses ovoïdes, les nodules spléniques ou corpuscules de Malpighi (figure 9a et c). Chaque nodule splénique est formée de quatre composants: l'artériole centrale; le manchon lymphoïde péri-artériolaire; une couronne et d'un centre germinatif (figure 9 b et d).

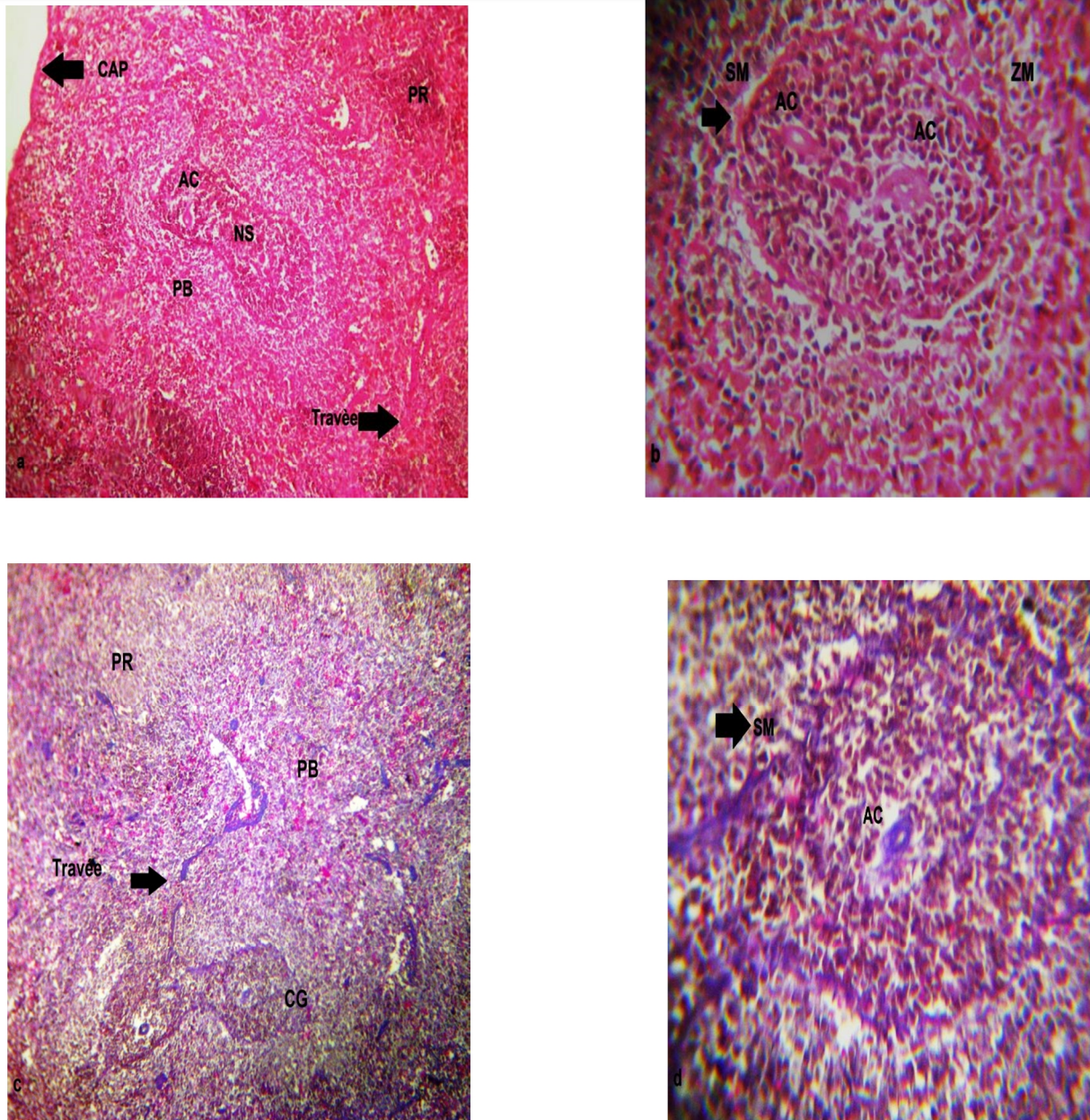
La pulpe rouge est homogène et formée de cordons cellulaires séparés par les capillaires sinusoides (figure 9 a et d). La zone marginale qu'interagissent la pulpe blanche et la pulpe rouge au niveau des sinus vasculaires (Figure 9 b).

#### **III.1.3.2. Structure du parenchyme splénique chez les rats traités pendant 30 jours**

L'observation microscopique des coupes fines au niveau de la rate chez les rats traités (1/120 et 1/85 DL50 IMI), montrent une nette prolifération de la pulpe blanche qui est plus prononcée avec la dose 1/85 DL50. Les nodules spléniques apparaissent fusionnés (figure 10a et b).

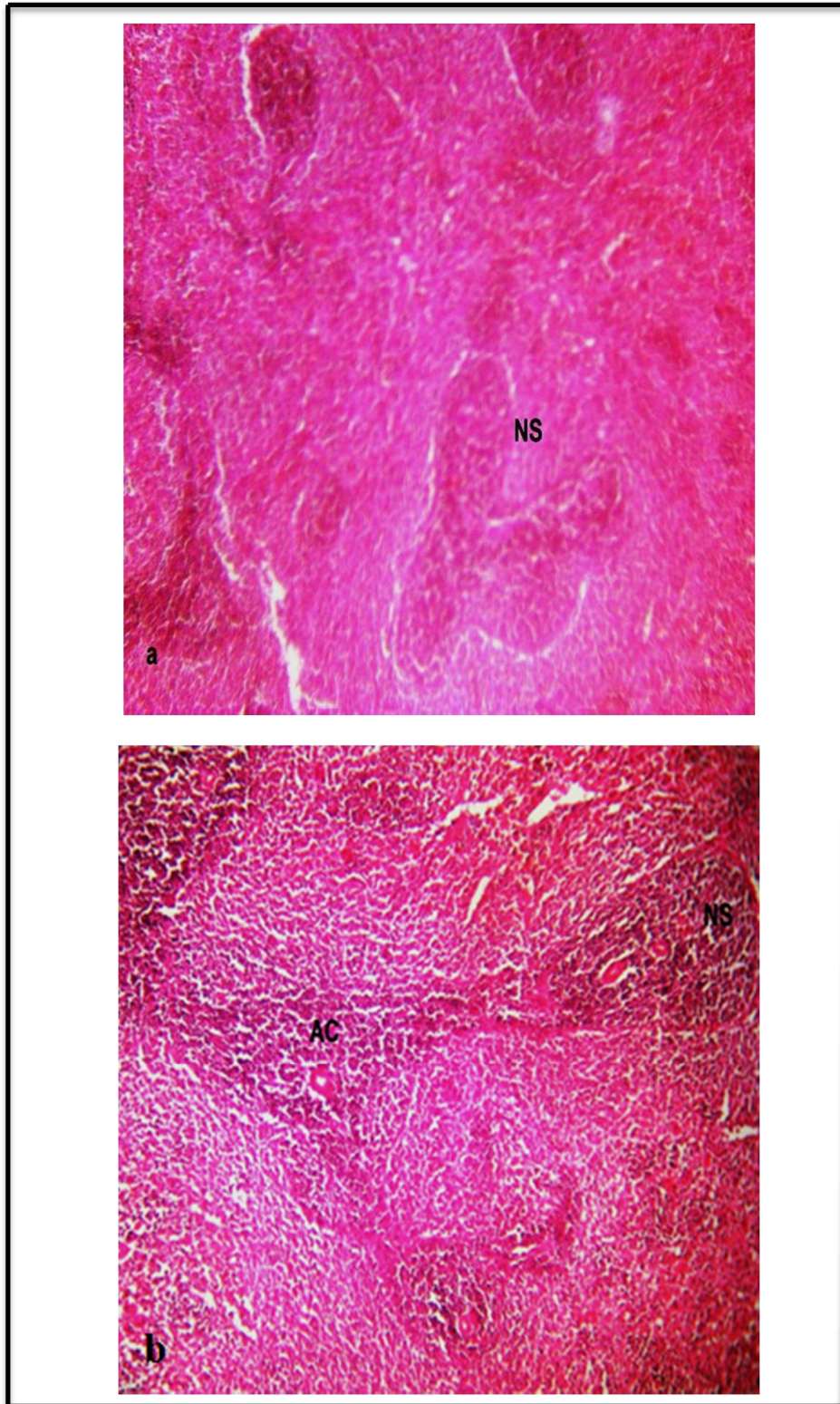
#### **III.1.3.3. Structure du parenchyme splénique chez les rats traités pendant 60 jours**

Chez tous les rats traités, la prolifération de la pulpe blanche devient importante en particulier le centre germinatif. La zone marginale apparait en prolifération avec la présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge (figure 11b) .Ces changements sont plus annoncés chez les rats traités par 1/85 DL50 (figure 11 a et b).



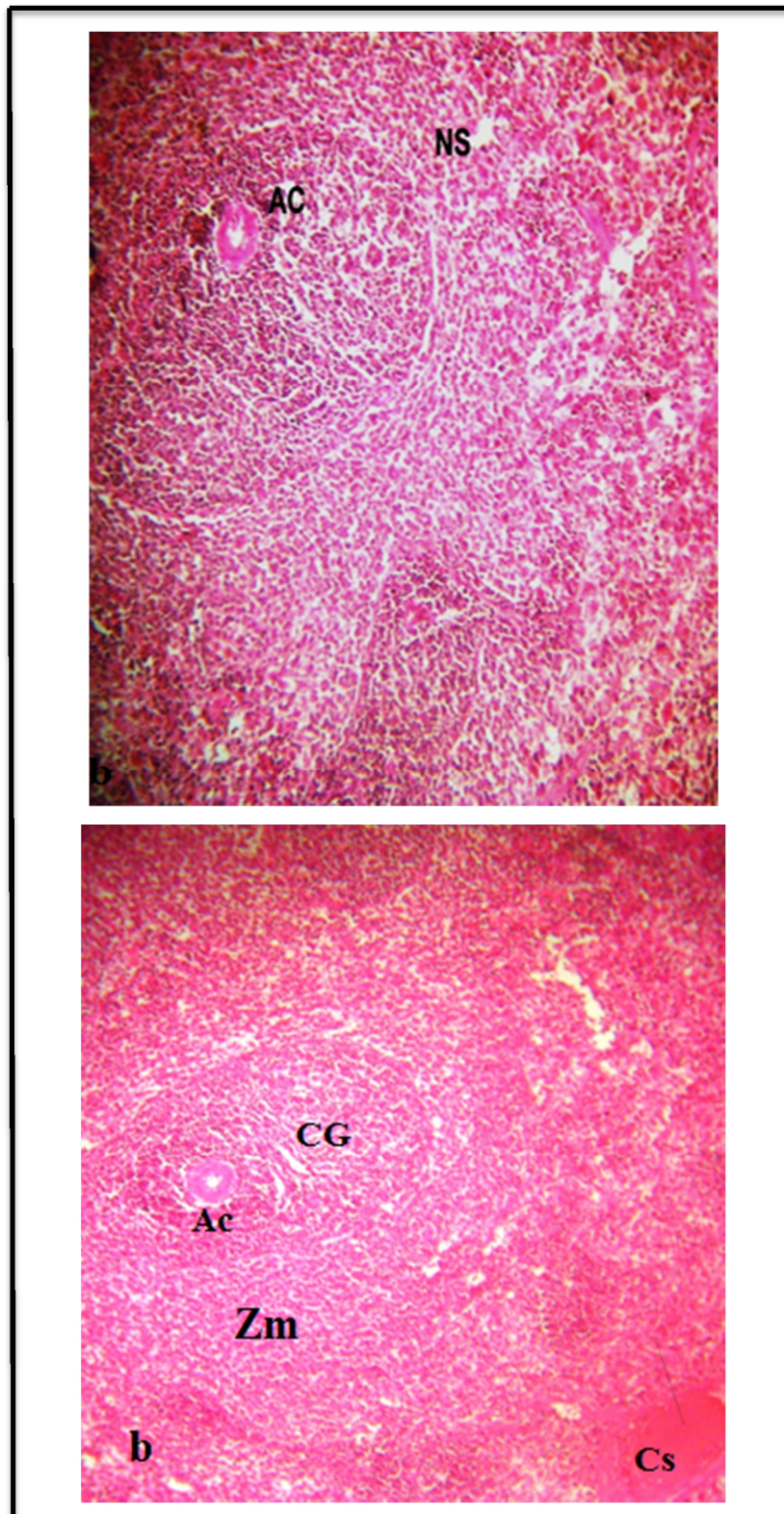
**CAP** : Capsule ; **CG** : Centre Germinatif ; **PB** : Pulpe Blanche ; **PR** : Pulpe Rouge ; **AC** : Artériole Centrale ; **SM** : Sinus Marginale ; **NS** : Nodule splénique ; **ZM** : zone marginale.

**Figure 9** : Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins  
Coloration: HE; Gr: x100 (a); x400 (b); Trichrome de Masson ; x100(c) ; x400 (d).



AC : Artériole Centrale; NS : Nodule splénique.

**Figure 10** : Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 30 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x100 (a et b).



AC : Artériole Centrale; CG : Centre germinatif ; Cs : congestion sanguine ; Zm : Zone marginale ; Ac : Artériole ; NS : Nodule splénique.

**Figure 11** : Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 60 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x400 (a et b).

### **III.2. DISCUSSION**

Dans notre travail, nous avons essayé de chercher la présence et les caractéristiques de la toxicité chronique par voie orale d'imidaclopride à raison de 1/120 et 1/85 DL50 d'imidaclopride à deux périodes, 30 et 60 jours au niveau des parenchymes thyroïdien et de la rate.

Dans nos conditions expérimentales, deux rats sont morts suite à une mauvaise manipulation lors de gavage. Alors que les autres rats témoins et traités par 1/120 DL50 d'IMI ont bénéficié d'un gain de poids après 30 jours d'expérimentation. Par contre, deux rats parmi neuf traités par 1/120 DL50 d'IMI ont perdu du poids. Ces résultats confirment ceux retrouvés auparavant avec les doses 29,33 mg/kg/j et 44 mg/kg/j et 5,10 et 20mg/kg/j d'imidaclopride appliquées chez des rats femelles de souche wistar pendant 22 et 30 jours (Khaldoun et Kerkar, 2010 ; Boukenoui et Mahboubi, 2010 ; Chikar et Remili, 2012).

Après 60 jours d'expérimentation, la majorité des rats traités ont montré une prise de poids pendant les premiers 30 jours qui régresse dans les derniers 30 jours. Cette régression est importante chez les rats traités par 1/85 DL50. Des résultats similaires sont rapportés par Bhardwaj et *al.* (2010) qui ont noté une réduction du poids corporel des rats femelles traités par 20 mg/kg/j d'imidaclopride pendant 90 jours. Ces chercheurs ont considéré cette régression, qui est due à la faible consommation de l'alimentation, comme signe de toxicité chronique.

Il est maintenant connu que l'exposition à divers pesticides est associée aux dommages des organes et les tissus avec la présence des changements pathologiques qui les affectent. D'après nos résultats, une régression non significative des poids des rates est notée après le traitement. Les mêmes résultats sont reportés par Boukenoui (2012). Contrairement aux résultats retrouvés par Prerna et *al.* (2014) qui montre la diminution de façon significative du poids relatif de la rate après l'administration des doses fortes d'imidaclopride à savoir 10 et 20mg/kg/j pendant 60 jours chez des rats femelles.



L'analyse des coupes histologiques des organes étudiées chez les rats traités révèle des altérations structurales plus ou moins importantes au niveau du parenchyme qui se manifestent différemment selon la dose et l'organe.

Le parenchyme thyroïdien préserve son organisation structurale générale alors que l'augmentation du nombre de petits follicules devient apparente et le colloïde disparaît dans certains follicules. Au niveau des thyrocytes, le cytoplasme maintient son aspect normal chez les traités par 1/120 DL50, alors que ce dernier devient très clair chez les traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours. Ces altérations sont aussi installées au niveau de parenchyme pendant 60 jours. Des résultats similaires sont décrits par Chikar et Remili (2012). Ces chercheurs ont noté une réaction inflammatoire, au niveau du parenchyme thyroïdien, manifestée par une dégénérescence des follicules, une augmentation du nombre de micro-follicule, une perte de colloïde chez des rats traités par 5, 10 et 20 mg/kg/j d'imidaclopride pendant 30 jours.

Le parenchyme splénique montre une prolifération de la pulpe blanche chez les rats traités par 1/120 DL50 est qui devient plus prononcée avec la dose 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours ainsi que les nodules spléniques apparaissent fusionnés alors que durant la période de 60 jours la pulpe blanche devient importante et la zone marginale apparaît en prolifération avec la présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge chez les rats traités par 1/120 DL50, Ces changements sont plus marqués chez les rats traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par Boukenoui (2012) avec les mêmes doses. Cet auteur a noté une hyperplasie de la pulpe blanche se manifestant par une augmentation du nombre et du volume des nodules spléniques, une fusion de ces follicules ainsi qu'une déplétion lymphocytaire au niveau nodulaire. Ces signes de toxicité sont dose-dépendants. Prarabdh et *al.* (2012), ont révélé une réduction de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ainsi que la présence des congestions splénique. Cette toxicité est associée à une déplétion lymphocytaire et une augmentation du nombre de neutrophiles et de cellules réticulo-endothéliales chez des souris traitées à 5 et 10 mg/kg/j. Prarabdh et *al.* (2012) ont remarqué des altérations histopathologiques au niveau de la rate des souris exposées à dose élevée de 10 mg/kg/j d'imidaclopride pendant 28 jours qui sont des indicateurs de la destruction des tissus.



## CONCLUSION

À travers cette étude, nous nous sommes intéressés à la recherche d'une toxicité chronique par voie orale de deux faibles doses d'imidaclopride, 1/120 et 1/85 DL50 au niveau des parenchymes thyroïdien et splénique chez des rats femelles de souche Wistar.

En effet, nous avons montré que l'imidaclopride à faibles doses exerce un effet toxique

- sur la croissance générale de l'animal qui est temps-dépendant.
- Sur le poids de la rate qui reste statistiquement non significatif.
- et à l'échelle tissulaire et cellulaire.

Les parenchymes thyroïdien et splénique des rats femelles sont des tissus sensibles à ces faibles doses. Néanmoins, les signes de toxicité sont dose-dépendants.

Après 30 jours, la toxicité à l'échelle structurale se manifeste

- ❖ Au niveau du parenchyme thyroïdien par :
  - une augmentation du nombre de petits follicules.
  - Une perte folliculaire et du colloïde.
  - Présence d'un aspect clair du cytoplasme des thyrocytes en cas de la dose 1/85 DL50.
- ❖ Au niveau du parenchyme splénique par :
  - Une prolifération de la pulpe blanche qui est plus marquée avec la dose 1/85 DL50.
  - La fusion des nodules spléniques.

Il reste à savoir que ces signes de toxicité dépendent aussi du temps de l'administration de l'insecticide. Ils deviennent plus sévères à long terme. Après 60 jours, les altérations du parenchyme thyroïdien sont plus importantes au niveau du cytoplasme. La prolifération de la

pulpe blanche devient assez importante, en particulier le centre germinatif avec la présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge en cas de la dose 1/85 DL50.

Afin d'approfondir cette étude, nous proposons la réalisation

- d'une étude morphométrique en calculant le diamètre des follicules thyroïdiens et leur épithélium, des centres germinatifs et la zone marginale.
- D'une étude immunohistochimique en cherchant la prolifération des lymphocytes qui témoignent une réaction immunitaire spécifique.
- D'une étude ultrastructurale qui relève les altérations au niveau des organites.
- Des dosages biochimiques en relation avec les altérations.

Pour l'intérêt socio-économique et de santé humaine et animale, il est recommandé de remplacer ces produits chimiques par les insecticides biologiques.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**AGOUD, D. 2012.** Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique et chronique d'imidaclopride sur le foie chez les rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 80p.*

**AL-SAYEDA, H. 2007.** Transfert d'un insecticide systémique, l'imidaclopride, chez la tomate : implication du transport phloémien. *Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique, Toulouse, 174 p.*

**ALLEN, T.R., FREI, T. , LUETKEMEIER, H. , VOGEL, O. , BIEDERMANN, K. & WILSON, J. 1989.** 52-week oral toxicity (feeding) study with NTN 33893 technical in the dog. *Unpublished report from Research & Consulting Company AG, report N. 4856.*

**ALVINERIE, M. 2005.** Étude des effets individuels indésirable consécutifs à l'utilisation de l'imidaclopride chez l'Homme et les carnivores domestiques. , 3.

**ANDREWS, P C. KRINSKI, N.I. 1982.** Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate, *Anal. Biochem.* **127**: 346–350.

**AOURAG, H. 2013.** Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique d'imidaclopride sur les reins chez les rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 75p.*

**ARFAT, YASIR. NASIR, MAHMOOD. MUHAMMAD, USMANTAHIR. MARYAM, RASHI D. SAMEER, ANJUM. FAN, ZHAO. DI-JIE, LI. YU-LONG, SUN. LIFANG, HU . CHEN ZHIHAO CHONG, YIN . AI-RONG, QIAN. 2014.** Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicology Reports*, **1** : 554–561.

**ARKAM, F. 2012.** Recherche d'indices d'inflammation subchronique et chronique chez les rats femelles de souche Wistar traités à l'imidaclopride. *Mémoire de Master. USDB. Pp 60.*

**ASLAN, R. SEKEROGLU, M R. GULTEKIN, F. 1997.** Blood lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals. Relation to age, sex, habits, life style and environment. *J. Environ. Sci. Health A* **32**: 2101–2109.

**BHARDWAJ, SHIPRA. M. K, SRIVASTAVA . UPASANA, KAPOOR , L.P. SRIVASTAVA.2010.** A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food and chemical toxicolog*, **48**: 1185-1190.

**BOUDEGZDEM, N. 2013.** Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique et chronique d'imidaclopride sur la thyroïde des rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 76p.*

**BOUKARZI, H. 2012.** Recherche d'indices d'inflammation subchronique et chronique chez les rats femelles de souche Wistar traités à l'imidaclopride. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 80p.*

**BOUKENOUI, K.2013.** Contribution à la recherche des effets de deux doses d'imidaclopride sur les glandes surrénales et la structure de la rate chez les rats de souche *Mémoire de master t, USDB.*

**BOUKENOUI, K. et MAHBOUBI, Y. 2010.** Recherche des aspects de la toxicité orale d'une dose supplémentaire d'imidaclopride et l'effet de *Lavandula stoechas* chez les rats adultes de souche Wistar. *Mémoire d'ingénieur, USDB. Pp 45.*

**CAMPOS,FRANCISCO.MANUEL,RODRIGUEZ–YANEZ.MAR, CASTELLANOS.SUSANA, ARIAS. Maria, PEREZ- MATO. TOMAS, SOBRINO. MIGUEL, BLANCO. JOAQUIN, SERENA. and JOSE , CASTILLO. 2011.** Blood levels of glutamate oxaloacetate transaminase are more strongly associated with good outcome in acute ischaemic stroke than glutamate pyruvate transaminase levels. *Department of Neurology-Stroke Unit, Clinical Neurosciences Research Laboratory, University of Santiago de Compostela..*

**CHIKAR, A. et REMILI, S. 2012.** Contribution à la recherche de la toxicité d'un insecticide, imidaclopride au niveau thyroïde chez les rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de fin d'étude*, USDB.

**COSTA, C., SILVARI, V., MELCHINI, A., CATANIA, S., HEFFRON, J.J., TROVATO, A. and DEPASQUALE, R. 2011.** Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.*, **672**: 40–44.

**DEMSIA, G. VLASTOD . GOUMENOU, M. MATTHOPOULOS, DP. 2007.** Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone marrow. *Mutation research*, **634**:32-39.

**DUZGUNER, V. et ERDOGAN ,S. 2012.** Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

**EL-GENDY, K.S. ALY, NM. MAHMOUD, FH. KENAWY, A. and EL- SABE ,EK. 2010.** The role of vitamin as antioxidant in protection of oxidative stress. *Food and chemical toxicology*.**48**: 215-221.

**HARMANDEEP, KAUR .TOOR, GURINDER. KAUR .SANGHA, KULDEEP. SINGH .KHERA. 2013.** Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **105**: 1-4.

**HEMA, R. 2011.** Recherche des aspects de la toxicité orale de 1/15 DL50 d'imidaclopride sur la glande thyroïde chez les rats femelles adultes de souche Wistar. *Mémoire de fin d'étude* , USDB.

**INRAA, 2013.** Bulletin de Veille Technologique et Économique. *INRAA., ALGERIE*.

**KAPOOR ,UPASANA. M K ,SRIVASTAVA. L P, SRIVASTAVA .2011.** Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats . *Food and Chemical Toxicology* ;**49** :3086–3089.

**KHALDOUN,N. KERKAR ,N. 2010.** Contribution de la recherché des indices de la toxicité chronique d'un insecticide imidaclopride, avec deux doses différentes chez le rat femelle adultes de souche Wistar. *Mémoire d'ingénieur, USDB.*

**KOSHLUKOVA, E . 2006.** Imidacloprid risk characterisation document . California environmental protection agency , *departement of pesticide regulation.*

**LARAMEE, S. 2007.** L'abeille domestique comme bioindicateur ecotoxicologique de polluants : le cas de l'insecticide imidaclopride .*Thèse du grade de maitre en environnement. Université Sherbrooke, Québec, 74p.*

**MAHBOUBI ,Y.2013.** Contribution à la recherche des effets de deux doses d'imidaclopride sur l'aspect morpho fonctionnel de la thyroïde et la structure ovarienne chez les rats de souche Wistar .*Mémoire de master USDB.*

**MARTOJA,R. MARTOJA-PIERSON, N. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris Masson. 345p.

**MILINDMITRA,LONARE.MANJO,KUMAR.SACHIN,RAUT.PRARABDHA,BADGUJAR SAGAR ,DOLTADE . AVINASH ,TELANG. 2014.** Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin. *Neurochemistry International* **78**:122–129.

**MISRA, H P. FRIDOVICH, I. 1972.** The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Biol. Chem.* **247**:3170–3175.

**NAJAFI, GOLAMREZA. MAZDAK, RAZI .AREF ,HOSHYAR . SIMINEH ,SHAHMOHAMADLOO. SAJAD ,FEYZI. 2010.** The Effect of Chronic Exposure with Imidaclopride Insecticide on Fertility in Mature Male Rats. *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility* Vol 4, No 1., Pages: 9-16.

**PRADJA,N. WEBER,G. 1975.**Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas, *FEBS Lett.* **59**: 245–249.



**PRERNA,VOHRA. KULDEEP, SINGH KHERA. GURINDER, KAUR SANGHA.2014.** Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. *Department of Zoology, College of Basic Sciences and Humanities, Punjab Agricultural University, Ludhiana 141004, Punjab, India.*

**POLYCHRONIS, R. EMPOULAKIS, A. ESTES, M. HEARN, D.H. BURRACK, H.J. and PIERSON, E.A. 2012.** Prevalence of *Candidatus* Erwinia Dacicola in Wild and Laboratory Olive Fruit Fly Populations and Across Developmental Stages. *Environmental Entomology.*, Pages: 265-274.

**PRARABDH , BADGUJAR . S K ,JAIN. AJIT ,SINGH. J S ,PUNIA. R P, GUPTA. GAURI A, CHANDRATRE. 2013.** Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. *Environmental toxicology and pharmacology* ,3 5 :408–418.

**RAMAZAN, BAL. MUSTAFA, NAZIROGL. GAFFARI, TURK. ÖKKES, Yilmaz. TUNCAY, KULOGLU. EBRU, ETEM. GIYASETTIN , BAYDAS. 2012.** Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. Copyright © *John Wiley & Sons, Ltd.*

**SHEETS, LP. 1994.** An acute oral neurotoxicity screening study with technical grade imidacloprid (NTN 33893) in rats. *Miles, Inc. (Mobay). Study No. 10634-1.*

**TOMIZAWA, M. et CASIDA, JE. 2003.** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 48 : 339–364.

**VAN VEEN ,JE. et HAWLEY ,RS. 2003.** Meiosis: when even two is a crowd. *Curr Biol* 13: R831–833.



## **1. Matériel et réactifs**

### **1.1. Petit matériel**

Les cages.

Seringue et aiguilles de gavage.

La trousse pour dissection.

Entonnoir.

Les cassettes en plastique.

Les moules en métal (Port-cassette).

Les lames.

Les portes lames.

Boite de coloration.

Les lamelles.

### **1.2. Réactifs**

L'insecticide Imidaclopride.

Tubes à EDTA, héparinés et secs.

Liquide de fixation « formol commercialise à 35% ».

Alcool (100°, 95°, 70°).

Xylène.

Gélatine.

Colorants hématoxyline et éosine et bleu d'aniline.

Liquide de montage (Eukitt).

1.3. Alimentation des rats

**Tableau I:** Composition de l'alimentation.

<b>Composition des bouchons</b>	
Protéines (%)	20
Matières grasses brutes (%)	4
Cendre brutes	6,5
Cellulose brute (%)	5,5
Calcium (%)	1,1
Phosphore (%)	0,8
Vitamine A (UL /kg)	22000
Vitamine D3 (UL/kg)	2200
Vitamine E (UL/kg)	100
Sulfate de cuivre pentahydraté/ cuivre (mg/kg)	8

2. Appareillages

Balance de précision.

Balance ordinaire.

Centrifugeuse.

Etuve à 37° de type « Sakura ».

Distributeur de paraffine de type « Leica ».

Platine refroidissante de type « Leica ».

Microtome de type « Leica ».

Bain Marie de type « Firlabo ».

Microscope optique de type « Leica ».



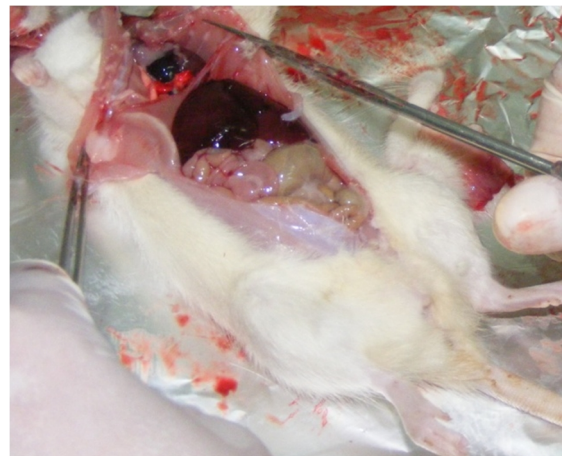
Trousse de dissection



Aiguille de gavage



Gavage



Dissection et prélèvement des organes



Tubes EDTA

Tubes héparinés



Tubes secs



Cassettes en plastique



Moules metaliques



Portes lames



Balance de precision



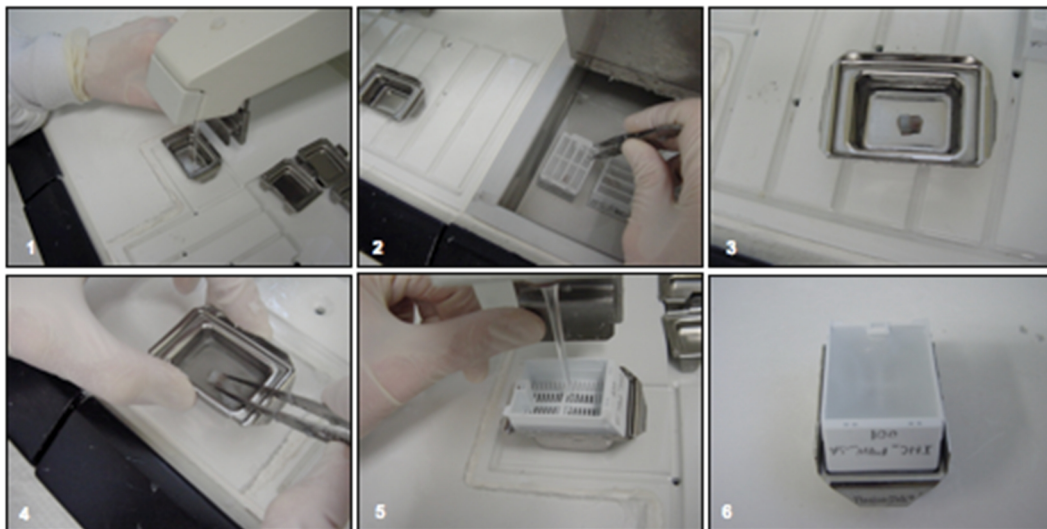
Balance electronique



Centrifugeuse



Distributeur de paraffine «Leica»



Confection des blocs de paraffine



Platine refroidissante «Leica»



Microtome «Leica»  
Confection des rubans



Etuve à 37° C





Batterie de coloration



Montage des coupes colorées  
l'Eukitt



Microscope photonique « Leica »  
Pour Observation

### 3. Fiches techniques

#### 3.1. Fiche technique N°1 : Fixation

Formol 10%.....1000 ml

#### 3.2. Fiche technique N°2 : Collage des rubans

Gélatine (MARTOJA , 1968)

Gélatine en poudre.....4g

Eau distillée.....100 ml

#### 3.3. Fiche technique N°3 : Coloration

❖ **Coloration à l'hématoxyline-eosine** : cette méthode est réalisée selon les étapes suivantes :

- Un bain d'hématoxyline pendant trois minutes.
- Rinçage à l'eau courante.
- Un bain d'éosine pendant 30 secondes.
- Rinçage à l'eau courante.
- Différencier successivement dans les alcools jusqu'à l'alcool absolu.
- Passer dans deux bains de xylènes.

❖ **Trichrome de Masson** : les pièces sont colorées selon les étapes suivantes :

- Un passage des coupes dans un bain d'hématoxyline d'Harris pendant 2 minutes.
- Lavage à l'eau courante.
- Dépôt des lames dans un bain de fushine pendant 30 secondes puis le rinçage par l'eau distillée.
- Un bain de phosphomolybdique phosphotigestique pendant 5 minutes.
- Coloration dans un bain de bleu d'aniline pendant 3 minutes.
- Dépôt dans un bain d'eau courante afin d'éliminer l'excès de colorant.
- Différenciation successive dans des alcools éthyliques jusqu'à l'alcool absolu, 2 minutes chacun.
- Un bain de xylène pendant 3 minutes.

#### 4. Calcul statistique

##### 4.1. Moyenne

Soit  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$  une suite finie de nombre.

La moyenne arithmétique est le rapport :

$$m = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X_i}{n}$$

m : la moyenne arithmétique

n : l'effectif

x : caractère quantitatif

##### 4.2. L'écart type

L'écart type est la racine de la variance.

$$\delta = v^{1/2}$$

$\delta$  : l'écart type

v : la variance

##### 4.3. La variance

La variance d'une série des valeurs du caractère est la valeur moyenne arithmétique des carrés des écarts de ces valeurs par rapport à leur moyenne arithmétique.

$$v = \frac{\sum (X_i - m)^2}{n}$$

- v : La variance
- m : La moyenne arithmétique
- n : L'effectif
- x : Caractère quantitatif

#### 4.4. Test d'homogénéité de deux échantillons

##### **n < 30 : loi de Student**

Hypothèse nulle ( $H_0$ ) : Les deux échantillons sont semblables ; le traitement n'a pas d'effet.

On va calculer « **la variance commune estimée** » :

$$\delta = \frac{n_1 \delta_1^2 + n_2 \delta_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad 1/2$$

Ensuite l'écart réduit :

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{\delta \left[ \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]^{1/2}}$$

**t** : l'écart réduit.

**m<sub>1</sub>** : la moyenne arithmétique de l'échantillon 1

**m<sub>2</sub>** : la moyenne arithmétique de l'échantillon 2

**δ** : la variance commune estimée

**n<sub>1</sub>** : nombre de l'échantillon 1

**n<sub>2</sub>** : nombre de l'échantillon 2

On compare ce (t) calculé avec la valeur de t % (ddl =  $n_1 + n_2 - 2$ ) théorique tirée de la table de Student.

Si  $t < t \%$  : l'hypothèse nulle est retenue ; la différence n'est pas significative, le traitement n'a pas d'effet.

Si  $t > t \%$  : l'hypothèse nulle est rejetée ; la différence est significative donc le traitement a un effet.

**Table de Student.**

ddl	$\alpha\%$	20%	10%	5%	2%	1%
1		3,087	6,314	12,706	30,821	63,657
2		1,886	2,920	4,303	6,905	9,925
3		1,628	2,353	3,182	4,541	5,841
4		1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5		1,476	2,015	2,571	3,385	4,032
6		1,440	1,943	2,447	3,148	3,707
7		1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8		1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9		1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10		1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11		1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12		1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13		1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14		1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15		1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16		1,337	1,746	2,120	2,583	2,924
17		1,333	1,740	2,110	2,5672	2,898
18		1,330	1,734	2,101	2,552	2,978
19		1,328	1,729	2,093	2,539	2,964
20		1,325	1,725	2,085	2,528	2,845
21		1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22		1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23		1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24		1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25		1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26		1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27		1,314	1,703	2,052	2,478	2,771
28		1,313	1,701	2,048	2,467	2,765
29		1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30		1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
40		1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
60		1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
120		1,289	1,658	1,980	2,358	2,617
$\infty$		1,282	1,645	1,960	2,326	2,576

**Tableau de dilution des alcools (Table de Gay-Lussac).**

Quantité d'eau en cm<sup>3</sup> à ajouter à 100 cm<sup>3</sup> d'alcool à diluer

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

**Tableau II : Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 30 jours.**

Lots de rats	N°	Poids corporel initial (j <sub>0</sub> )	Poids Corporel 2 <sup>me</sup> semaine	Poids Corporel 3 <sup>me</sup> semaine	Poids Corporel 4 <sup>me</sup> semaine
<b>Témoins</b>	1	123,15	128,13	134,78	139,46
	2	127,55	132,75	144,14	152,90
	3	123,18	127,99	150,06	185,85
	4	128,21	134,55	142,77	148,29
	5	120,00	129,69	138,15	148,10
	6	94,88	115,87	130,00	134,00
	7	122,08	128,77	164,13	184,69
<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>119,86 ± 11,399</b>	<b>128,25 ± 5,994</b>	<b>143,43 ± 11,228</b>	<b>156,18 ± 20,828</b>
<b>1/120 DL50 d'IMI</b>	1	114,11	127,05	140,23	185.60
	2	113,46	125,42	153,23	172.02
	3	117,97	135,21	147,47	166.00
	4	119,83	132,75	145,98	164.02
	5	114,09	132,63	147,22	161.03
	6	117,88	129,99	146,69	163,00
	7	111,03	125,33	142,54	161,80
	8	117,24	118,47	140,26	156,92
	9	118,12	116,73	132,07	152,55
<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>115,97 ± 2,882</b>	<b>127,06 ± 6,369</b>	<b>143,96 ± 6,035</b>	<b>158,56 ± 4,796</b>

<b>1/85 DL50 d'IMI</b>	1	165,03	159,71	208,41	212,44
	2	161,14	137,36	162,77	162,90
	3	172,33	180,44	189,34	200,21
	4	161,28	162,74	185,32	194,60
	5	164,85	156,11	147,96	143,00
	6	163,78	182,9	178,75	183,40
	7	166,47	161,57	179,41	212,01
	8	164,28	141,63	143,53	156,14
	9	125,75	128,26	189,02	184,40
<b>Moyenne</b>		<b>160,54</b>	<b>156,74</b>	<b>176,05</b>	<b>185,77</b>
<b>±</b>		<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>
<b>ecartype</b>		<b>13,456</b>	<b>18,471</b>	<b>20,974</b>	<b>25,074</b>

**Tableau VI : Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 60 jours.**

<b>Lots des Rats</b>	<b>N</b>	<b>Poids corporel initial j<sub>0</sub></b>	<b>Poids Corporel 2me semaine</b>	<b>Poids Corporel 3me semaine</b>	<b>Poids Corporel 4me semaine</b>	<b>Poids Corporel 5me semaine</b>	<b>Poids Corporel 6me semaine</b>	<b>Poids Corporel 7me semaine</b>	<b>Poids Corporel 8me semaine</b>
<b>Témoins</b>	1	157	160,04	167,99	170,44	170,88	173,15	175,04	179,99
	2	159	164,01	168,77	160,10	163,02	165,77	169,41	172,02
	3	154	157,00	153,89	156,28	159,93	163,24	161,99	159,00
	4	154	159,04	161,88	167,44	175,00	183,75	189,77	202,46
	5	142	145,09	149,13	153,78	158,22	164,21	168,45	173,27
	6	141	139,88	137,52	134,88	138,05	140,22	141,55	143,90
	7	133	125,21	99,05	Mort	Mort	Mort	Mort	Mort



**ANNEXES 2**

**RESULTATS**

<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>148,57 ± 9,846</b>	<b>150,03 ± 9,483</b>	<b>148,31 ± 24,3749</b>	<b>157,15 ± 12,643</b>	<b>160,85 ± 12,908</b>	<b>165,05 ± 14,396</b>	<b>167,70 ± 15,880</b>	<b>171,77 ± 19,756</b>
<b>1/120 DL50 d'IMI</b>	1	145,04	147,44	151,00	150,41	148,52	144,22	141,21	140,00
	2	145,19	163,88	170,13	168,24	164,13	161,33	159,98	157,20
	3	145,01	116,45	Mort	Mort	Mort	Mort	Mort	Mort
	4	149,87	152,00	156,48	158,23	156,13	153,98	151,87	150,00
	5	151,74	144,69	163,07	173,43	171,75	168,45	167,00	165,47
	6	149,43	141,11	142,85	142,24	141,00	141,46	138,13	136,73
	7	144,95	144,87	155,47	153,53	150,55	146,54	140,14	136,25
	8	119,78	134,44	145,23	146,21	146,48	147,24	147,86	148,00
	9	144,69	151,50	150,02	154,63	156,02	156,11	157,45	159,23
<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>147,37 ± 3,205</b>	<b>144,89 ± 17,511</b>	<b>160,17 ± 8,272</b>	<b>162,57 ± 10,276</b>	<b>160,13 ± 10,030</b>	<b>156,99 ± 10,365</b>	<b>155,01 ± 11,086</b>	<b>153,16 ± 10,817</b>
<b>1/85 DL50 d'IMI</b>	1	104,29	111,05	122,23	123,33	125,21	127,59	126,23	128,00
	2	100,02	97,99	144,29	142,52	145,36	140,55	135,45	138,26
	3	101,44	124,12	95,09	93,03	90,14	88,89	73,21	71,90
	4	101,00	104,63	129,45	135,26	141,52	152,41	159,25	164,00
	5	107,65	113,52	132,21	138,77	145,58	150,45	160,11	166,50
	6	108,89	117,00	132,36	136,52	143,88	145,41	148,72	150,20
	7	101,26	113,40	137,25	139,66	145,52	146,00	148,75	150,80
	8	131,74	120,78	140,45	143,52	141,41	136,26	128,26	120,37
	9	114,00	104,55	112,23	114,54	110,22	97,52	95,41	92,87
<b>Moyenne ± Ecartype</b>		<b>107,81 ± 10,093</b>	<b>111,89 ± 8,367</b>	<b>129,16 ± 14,367</b>	<b>129,68 ± 14,362</b>	<b>132,09 ± 19,807</b>	<b>131,67 ± 23,156</b>	<b>130,59 ± 29,430</b>	<b>131,43 ± 32,073</b>

**Tableau X: Valeurs individuelles et moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%)de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.**

N° rat	Périodes de 30 jours						Périodes de 60 jours					
	Témoins (n=7)		Traites par 1/120 DL50 d'IMI (n=9)		Traités par 1/85 DL50d'IMI (n=9)		Témoins (n=7)		Traites par 1/120 DL50 d'IMI (n=9)		Traités par 1/85 DL50d'IMI (n=9)	
	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)
1	0,640	0,458	0,699	0,376	0,588	0,276	0,672	0,373	0,510	0,364	0,480	0,375
2	0,622	0,406	0,704	0,409	0,692	0,424	0,674	0,391	0,611	0,388	0,721	0,521
3	0,715	0,384	0,695	0,418	0,961	0,479	0,760	0,477	Mort	Mort	0,480	0,667
4	0,620	0,418	0,711	0,432	0,822	0,422	0,666	0,328	0,780	0,520	0,581	0,354
5	0,923	0,623	0,877	0,544	0,785	0,548	0,840	0,484	0,650	0,392	0,712	0,427
6	0,808	0,602	0,700	0,429	0,934	0,509	0,505	0,350	0,570	0,416	0,542	0,359
7	0,847	0,458	0,644	0,398	0,786	0,370	Mort	Mort	0,460	0,337	0,700	0,464
8	-	-	0,838	0,534	0,836	0,535	-	-	0,662	0,447	0,305	0,253
9	-	-	0,627	0,411	0,877	0,475	-	-	0,485	0,304	0,275	0,296
<b>M</b>	<b>0,76</b>	<b>0,478</b>	<b>0,72</b>	<b>0,439</b>	<b>0,80</b>	<b>0,448</b>	<b>0,68</b>	<b>0,40</b>	<b>0,59</b>	<b>0,401</b>	<b>0,53</b>	<b>0,412</b>
<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>
<b>E</b>	<b>0,130</b>	<b>0,095</b>	<b>0,082</b>	<b>0,059</b>	<b>0,116</b>	<b>0,086</b>	<b>0,111</b>	<b>0,065</b>	<b>0,106</b>	<b>0,063</b>	<b>0,166</b>	<b>0,125</b>

**Tableau XI:** Valeurs moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%) de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.

		Période de 30 jours					Période de 60 jours					
N° rat	Témoins (n=7)		Traités par 1/120 DL50 d'IMI (n=9)		Traités par 1/85DL50d'IMI (n=9)		Témoins (n=7)		Traités par 1/120 DL50 d'IMI (n=8)		Traités par 1/85DL50d'IMI (n=9)	
	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)
M ± E	0,76 ± 0,13	0,47 ± 0,09	0,72 ± 0,08	0,43 ± 0,05	0,80 ± 0,11	0,44 ± 0,08	0,68 ± 0,11	0,40 ± 0,06	0,59 ± 0,10	0,40 ± 0,06	0,53 ± 0,16	0,41 ± 0,12

**Tableau XII:** Signification statistique des différences des poids absolus et relatifs chez les rats traités par l'imidaclopride par rapport aux témoins.

		1/85 DL50		1/120 DL50	
Poids absolu (g)	Lots des rats	Traités 1/85 / Témoins (30 jours)	Traités 1/85/ Témoins (60 jours)	Traités 1/120 / Témoins (30jours)	Traités 1/120 / Témoins (60 jours)
	M ± E	0,80 ± 0,11 / 0,76 ± 0,13	0,53 ± 0,16 / 0,68 ± 0,11	0,72 ± 0,08 / 0,76 ± 0,13	0,59 ± 0,10 / 0,68 ± 0,11
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 14 tc= 0,130 tt= 2,145	ddl = 13 tc= 0,446 tt= 2,160	ddl = 14 tc= 0,135 tt= 2,145	ddl = 12 tc= 0,471 tt= 2,179
	%de risque (p)	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>
Poids relatif (g%)	Moyenne et Ecartype	0,44 ±0,08 / 0,47 ±0,09	0,41 ± 0,12 / 0,40 ±0,06	0,43 ± 0,05 / 0,47 ± 0,09	0,40 ± 0,06 / 0,40 ±0,06
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 14 tc= 0,333 tt= 2,145	ddl = 13 tc= 0,039 tt= 2,160	ddl = 14 tc= 0,156 tt= 2,145	ddl = 12 tc= 0,003 tt= 2,179
	% de risque (p)	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>

**Tableau XIII**: Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la période du traitement par l'imidaclopride.

Lots des rats	Traités 1/85(30 jours) / traités 1/85 (60 jours)	Traités 1/120 (30 jours) / traités 1/120 (60 jours)	
<b>Poids absolu (g)</b>	Moyenne Et Ecartype	0,80 ± 0,11 / 0,53 ± 0,16	0,72 ± 0,08 / 0,59 ± 0,10
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 16 tc=0,90 tt= 2,120	ddl = 15 tc= 0,48 tt= 2,131
	% de risque (P)	P<0,05	P<0,05
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>
	<b>Poids relatif (g%)</b>	Moyenne Et Ecartype	0,44 ± 0,08 / 0,41 ± 0,12
L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau		ddl = 16 tc= 0,121 tt= 2,120	ddl = 15 tc=0,153 tt= 2,131
% de risque (p)		P<0,05	P<0,05
La différence		<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>

**Tableau XIV:** Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la dose et la période du traitement par l'imidaclopride.

		1/120 DL50 D'IMI / 1/85 DL50 D'IMI	
Poids absolu (g)	Lots des rats	30 jours /30 jours	60 jours / 60 jours
	M ± E	0,72 ± 0,08 / 0,80 ± 0,11	0,59 ± 0,10 / 0,53 ± 0,16
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 16 tc=0,29 tt= 2,12	ddl = 15 tc= 0,19 tt= 2,13
	% de risque (p)	<b>P&lt;0,05</b>	<b>P&lt;0,05</b>
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>
Poids relatif (g%)	M ± E	0,439 ± 0,059 / 0,448 ± 0,086	0,401 ± 0,063 / 0,412 ± 0,125
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 16 tc= 0,03 tt=2,12	ddl = 15 tc=0,03 tt=2,13
	% de risque (p)	<b>P&lt;0,05</b>	<b>P&lt;0,05</b>
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE BLIDA 1  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLOME MASTER EN SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Biologie

SPECIALITE :  
BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE, IMMUNOLOGIE

THEME :

**RECHERCHE DES EFFETS DOSE ET TEMPS DEPENDANTS DE LA  
TOXICITE CHRONIQUE PAR VOIE ORALE D'IMIDACLOPRIDE AU  
NIVEAU DES PARENCHYMES THYROIDIEN ET SPLENIQUE CHEZ LES  
RATS FEMELLES DE SOUCHE WISTAR**

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> REMILI Sihem**

Soutenu le 06/11/2014

Devant le jury composé de :

- M <sup>me</sup> CHAKHMA A.	MAA	UB1	Présidente
- M <sup>me</sup> ZATRA Y.	MAA	UB1	Examinatrice
- Dr. SAADI L.	MCA	UB1	Promotrice

Promotion 2013/2014

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude à promotrice **Dr. Saadi L.**, maitre de conférences à l'université Blida 1, de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel sujet, pour sa confiance, ses précieux conseils et son soutien.

Je remercie **M<sup>me</sup> CHAKHMAA.**, maitre assistante à l'université Blida 1, d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury.

Mes vifs remerciements vont à **M<sup>me</sup> ZATRAY.**, maitre assistante à l'université Blida 1, d'avoir accepté d'assurer l'examen de mon travail.

J'adresse également mes remerciements à tous mes enseignants, qui m'ont donné les bases de la science et du savoir.

Un grand merci à l'ensemble du personnel des laboratoires, notamment le laboratoire de cytologie du CHU Hussein Dey et le laboratoire de Physiologie Animale de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba.

Enfin, nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui a beaucoup sacrifié pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère  
A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger.

Que Dieu les gardes et les protège.

A mes adorables sœurs Zahida et Lina.

A mon frère Mohamed Islam.

A mes amies avec lesquelles j'ai partagé des moments de joie et de bonheur.

A tous ceux qui me sont chers.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime,

Je dédie ce travail.

**Sihem**



## **RESUME**

L'objectif de cette étude de rechercher la toxicité chronique par voie orale de deux faibles doses d'imidaclopride (1/120 et 1/85 DL50) et leurs effets dose et temps-dépendants au niveau des parenchymes thyroïdien et splénique chez des rats femelles de souche Wistar. Une étude histopathologique est réalisée sur un effectif de 50 rats dont 14 témoins répartis en deux lots (un de 30 jours et l'autre de 60 jours) et 36 traités répartis en quatre lots (deux traités pendant 30 jours et deux autres traités pendant 60 jours). D'après les résultats obtenus après 30 jours de traitement et en comparaison à ceux des témoins, les parenchymes thyroïdien et splénique préservent leur organisation structurale générale néanmoins quelques altérations sont soulevées au niveau des follicules thyroïdiens de tous les rats traités(1/120 DL50 et 1/85 DL50), l'augmentation du nombre des petits follicules et la perte du colloïde dans certains follicules. Cependant, les follicules des rats traités par 1/85 DL50 présentent des thyrocytes avec un cytoplasme clair. Ces mêmes changements sont retrouvés après 60 jours de traitement chez tous les rats traités avec la présence de l'aspect clair du cytoplasme de certaines thyrocytes chez les rats traités par 1/120 DL50. Le parenchyme splénique montre, après 30 jours de traitement, une prolifération de la pulpe blanche qui est plus nette avec la dose 1/85 DL50. Après 60 jours, les centres germinatifs et les zones marginales deviennent plus importants chez tous les rats traités avec présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge des rats traités par 1/85 DL50. Tous ces résultats

plaident en faveur de la présence des effets dose et temps dépendants de l'imidaclopride à faible doses au niveau des parenchymes thyroïdien et splénique.

**Mots clés :** Effet-dose dépendant ; Effet-temps dépendant ; Imidaclopride ; Rats femelles ; Toxicité par voie orale ; Histopathologie.

### **Abstract**

The objective of this study is to researching the chronic oral toxicity of two low doses of imidacloprid (1/120 and 1/85 LD50) and their effects dose and time-dependent at the thyroid parenchyma and spleen in female rats Wistar strain. A histopathological study was performed on 50 rats including 14 controls divided into two lots (one of 30 days and the other for 60 days) and 36 treated divides in four lots (two treated for 30 days and two others treated for 60 days). According to the results obtained 30 days after treatment and compared to controls, The thyroid parenchyma and splenic preserve their general structural organization However, some alterations are raised at the thyroid follicles of all treated rats, an increase in the number of microfollicles and the loss of colloid in some follicles. However, follicles in rats treated with 1/85 LD50 present thyreocytes with clear cytoplasm. These same changes are found after 60 days of treatment in all rats treated with 1/120 LD50, the presence of the clear appearance of the cytoplasm of some thyreocytes. The splenic parenchyma shows, after 30 days of treatment, a proliferation of white pulp that is sharper with 1/85 LD50 dose. After 60 days, the germinal centers and marginal areas become more important and the presence of blood congestion in the red pulp. All these results support the presence of dose-dependent effects and time of imidacloprid at low doses of thyroid parenchyma and spleen.

**Keywords:** dose-dependent effect; Time-dependent effect; imidacloprid ; Female rats; Oral toxicity; Histopathology.

### المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن السمية المزمنة لتركيزين منخفضين الاميداكلوبريد (120/1 و DL50 85/1 ) عن طريق الجرعة و التأثيرات المتعلقة بالتركيز و الوقت على مستوى الغدة الدرقية و الطحال عند الجرذان الانثوية من سلالة ويستار. تم انجاز دراسة نسيجية مرضية على 50 جرذ حيث 14 جرذان شاهدة مقسمة إلى مجموعتين (واحدة من 30 يوما و أخرى 60 يوما) و 36 معالجة مقسمة الى أربع مجموعات (اثان لمدة 30 يوما واثنين آخرين 60 يوما). استنادا إلى نتائج تم الحصول عليها بعد 30 يوما من العلاج ومقارنة مع الشواهد ، البرانشيم الدرقي و الطحالي حافظ على التنظيم الهيكلي العام و مع ذلك، تطرح بعض التغييرات على مستوى جريبات الغدة الدرقية عند جميع الجرذان المعالجة من ارتفاع عدد الجريبات الصغيرة و فقدان المادة الغروية و تظهر الجريبات لدى الجرذان المعالجة ب (DL 50 85/1) thyreocytes مع السيترولازم واضح. لقد تم العثور على نفس هذه التغييرات بعد 60 يوما من العلاج عند جميع الجرذان المعالجة. مع وجود مظهر واضح من السيترولازم في thyreocytes لدى بعض الجرذان المعالجة ب (DL5 120/1). يظهر البرانشيم الطحالي بعد 30 يوما من العلاج تضخم اللب الأبيض الذي هو أكثر وضوحا مع جرعة (DL5 85/1). بعد 60 يوما، المراكز الجرثومية و المناطق الهامشية أصبحت أكثر أهمية مع وجود احتقان دموي على مستوى اللب الأحمر. كل هذه النتائج تدعم وجود تأثيرات تعتمد على الجرعة المستعملة و الوقت للاميداكلوبريد على مستوى الغدة الدرقية و الطحال.

**كلمات المفتاح:** تأثير مرتبط بالتركيز. تأثير مرتبط بالوقت. الاميداكلوبريد. جرذان اناث. السمية عن طريق الفم. التشريح المرضي.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

- ADN : acide désoxyribonucléique .
- DL50 : Dose Létal 50.
- EDTA : Acide éthylènediamine tétra-acétique.
- HE : Hématoxyline –Eosine.
- IMI : Imidaclopride.

## **GLOSSAIRE**

**Clastogène** : se dit d'un agent qui provoque des cassures de chromosomes (Costa *etal.*,2011).

**Superoxyde dismutase** : catalyse la dismutation des radicaux superoxyde, la mesure de l'activité de SOD était basée sur l'adrénaline qui se transforme spontanément à Adrenochrome en présence d'air à pH 10,2 selon Misra et Fridovich (1972).

**Glutamate oxaloacétate transaminase** : est une enzyme glycoprotéique présente

dans le cytoplasme et les mitochondries, son élévation est le reflet d'une lésion cellulaire (Campos et *al.*, 2011).

**Glutamate pyruvate transaminase** : est une enzyme cytosolique caractéristique du foie, sa libération dans le milieu extracellulaire est donc le signe d'une atteinte hépatique (Campos et *al.*, 2011).

**Myéloperoxydase** : (MPO), est en plus de son activité de peroxydation, catalyse également la conversion de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de chlorure (Cl<sup>-</sup>) à l'acide hypochloreux (HOCl) (Andrews et Krinski 1982) .

**Malondialdéhyde** : (MDA), est le produit de la peroxydation des lipides, résultant de l'interaction entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et cellulaire et sous-cellulaire ou membranes (Aslan et *al.*, 1997).

**Xanthine oxydase** : (XO), une enzyme importante oxydant, son activité a été mesurée par spectrophotométrie par la formation d'acide urique à partir de la xanthine par l'augmentation d'absorption à 293 nm (Prajda et Weber 1975).

### LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tableau I	Composition de l'alimentation.	Annexe 1
Tableau II	Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 30 jours.	Annexe 2

<b>Tableau III</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 30 jours d'expérimentation.	14
<b>Tableau IV</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.	15
<b>Tableau V</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.	15
<b>Tableau VI</b>	Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 60 jours.	Annexe 2
<b>Tableau VII</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 60 jours d'expérimentation.	16
<b>Tableau VIII</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.	17
<b>Tableau IX</b>	Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.	18
<b>Tableau X</b>	Valeurs individuelles et moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%) de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.	Annexe 2
<b>Tableau XI</b>	Valeurs moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%) de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.	Annexe 2
<b>Tableau XII</b>	Signification statistique des différences des poids absolus et relatifs chez les rats traités par l'imidaclopride par rapport aux témoins.	Annexe 2

<b>Tableau XIII</b>	Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la période du traitement par l'imidaclopride.	Annexe 2
<b>Tableau XIV</b>	Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la dose et la période du traitement par l'imidaclopride	Annexe 2

### **LISTE DES FIGURES**

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Figure 1</b>	Répartition des lots	10



<b>Figure 2</b>	Effet de 30 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.	19
<b>Figure 3</b>	Effet de 60 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.	20
<b>Figure 4</b>	Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles témoins après 30 et 60 jours d'expérimentation. Coloration: HE; Gr: x100 (a et c avec zoom) ; x400 (b et d).	22
<b>Figure 5</b>	Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours. Coloration: HE (a et b) Gr: x100 (a) ; x400 (b).	23
<b>Figure 6</b>	Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours. Coloration: HE (a et b) ; Trichome de Masson (c). Gr: x100 (a) ; x400 (b et c).	24
<b>Figure 7</b>	Effet de la dose 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).	25
<b>Figure 8</b>	Effet de la dose 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).	26
<b>Figure 9</b>	Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins Coloration: HE; Gr: x100 (a); x400 (b). Trichrome de Masson ; x100(c) ; x400 (d).	28

<b>Figure 10</b>	Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 30 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x100 (a et b).	29
<b>Figure 11</b>	Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 60 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x400 (a et b)	30

## SOMMAIRE

**INTRODUCTION.....1**

## **CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

<b>I.1.TOXICITE PAR VOIE ORALE DE L'IMIDACLOPRIDE.....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Toxicité sur les glandes sexuelles et la fertilité .....	3
I.1.2. au niveau du foie, système nerveux et les reins.....	4
I.1.3. Au niveau du système immunitaire.....	5

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

<b>II.1. MATERIEL.....</b>	<b>7</b>
II.1.1.Animaux et régimes.....	7
II.1.2. Insecticide.....	7
II.1.3. Appareillage et réactifs.....	9
<b>II.2. METHODES.....</b>	<b>9</b>
II.2.1. Expérimentation.....	9
II.2.2.Sacrifice des animaux et prélèvements des échantillons.....	11
II.2.3. Détermination des hormones thyroïdiennes .....	11
II.2.4. Etude histologique de la glande thyroïde et la rate.....	11
II.2.5. analyse statistique.....	13

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.1. RESULTATS.....</b>	<b>14</b>
III.1.1.Evolution pondérale.....	14
III.1.2. Histopathologie du parenchyme thyroïdien.....	21
III.1.3 Histopathologie du parenchyme splénique.....	27
<b>III.2. DISCUSSION.....</b>	<b>31</b>

<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....</b>	<b>33</b>
---------------------------------------	-----------

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXES**



# **INTRODUCTION**



## **INTRODUCTION**

L'imidaclopride, 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-ylideneamine, était largement utilisé dans le monde entier pour la défense des cultures grâce à sa faible persistance dans le sol, sa haute activité insecticide à de faibles doses (Demsia et *al.*, 2007) et à sa faible toxicité chez les mammifères (Tomizawa et Casida, 2003). Récemment, la commission Européenne a lancé la restriction de son utilisation pour le traitement des semences, l'application au sol (en granulés) et le traitement foliaire des végétaux, y compris les céréales. Ceci à compter du premier décembre 2013 (INRAA, 2013).

Plusieurs recherches expérimentales ont souligné l'impact négatif de l'imidaclopride sur la santé humaine et animale. Chez les rats, cet insecticide provoque une toxicité sub-chronique dose-dépendante. La dose de 20 mg/kg/j pendant 90 jours induit une augmentation des poids du foie, des reins, des surrénales, une diminution du poids des ovaires, une nécrose des cellules nerveuses, des hépatocytes, une dégénérescence des glomérules rénaux et des modifications morpho-pathologiques au niveaux des follicules ovariens (Bhardwaj et *al.*, 2010 ; Kapoor et *al.*, 2011). Par ailleurs, la 1/10 DL50 d'imidaclopride entraîne une augmentation de l'activité antioxydante chez des rats administrés pendant 90 jours (EL-Gendy et *al.*, 2010). Aourag (2013) a montré que le traitement d'imidaclopride à raison de 1/85 DL50 pendant 30 jours entraîne une hépatotoxicité.

Les recherches menées dans notre laboratoire sur la toxicité d'imidaclopride ont aussi révélé des signes de toxicité aiguë et subaiguë par voie orale des doses faibles d'imidaclopride (1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/85 et 1/120) au niveau de plusieurs tissus chez les rats femelles. Ces signes marquent la présence d'un processus inflammatoire caractérisé généralement par une congestion sanguine et une infiltration cellulaire (Boukenoui et Mahboubi, 2010 ; Hema, 2011, Boukenoui, 2012, Mahboubi, 2012). La toxicité d'imidaclopride chez les rats femelles est bien prononcée à partir de 30 jours et elle est moins importante avec les plus faibles doses (1/85 et 1/120) (Boukenoui, 2012, Mahboubi, 2012).

Cependant, tous les organes sont sensibles aux différents traitements à l'imidaclopride (Boukarzi, 2012 ; Arkame, 2012, Agoud, 2012) mais la thyroïde reste l'organe le plus sensible. Selon Mahboubi (2012), l'imidaclopride est un agent perturbateur de la fonction thyroïdienne. Le parenchyme glandulaire montre un aspect de tissu nécrosé avec effondrement des follicules au cours de traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 pendant 30 jours.

Afin de poursuivre nos études sur la recherche de la toxicité chronique des doses faibles d'imidaclopride au niveau tissulaire et ses caractéristiques y compris l'effets dose et temps dépendants, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à la recherche de la toxicité chronique par voie orale de deux doses 1/120 et 1/85 DL50 pendant 60 jours. Ces recherches comportent le suivi des poids corporels des rats et des organes, ainsi que l'étude histopathologie des thyroïdes et des rates après 30 jours et 60 jours de traitement à l'imidaclopride.

Notre travail comporte trois chapitres. Le premier est consacré aux rappels bibliographiques sur la toxicité de l'imidaclopride. Le deuxième décrit le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre présente les résultats et leur discussion. Une conclusion générale et des perspectives sont proposées à la fin de ce travail.



## **I.1. TOXICITE PAR VOIE ORALE DE L'IMIDACLOPRIDE**

L'imidaclopride est un insecticide néonicotinoïde comme un agent toxique de classe II par l'agence de protection de l'environnement. Pour cette raison, il est marqué obligatoirement par un signe «avertir» ou «attention» (Al-Sayeda, 2007).

La recherche de la toxicité de l'imidaclopride (IMI) chez les mammifères a fait l'objet de nombreuses études expérimentales qui ont montré que la contamination avec cet insecticide peut induire une altération morpho-fonctionnelle de certains organes comme le foie, les reins (Arfat et *al.*, 2014), la rate (Prarabdh et *al.*, 2013) et le cerveau (Milindmitra et *al.*, 2014). Chez les rats, la toxicité touche surtout le foie, les reins, la thyroïde, les yeux et le système nerveux (Duzguner et Erdogan, 2012).

### **I.1.1. Toxicité sur les glandes sexuelles et la fertilité**

D'après Kapoor et *al.* (2011), une exposition de 20mg/kg/jr entraîne des altérations cellulaires tels que la présence de lipofuschine dans les cellules de la granulosa et des changements de taux de l'hormone lutéinisante, l'hormone folliculo-stimulante, la progestérone, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et de niveau de lipide peroxydation chez les rats femelles. Alors que la dose 5 et 10mg/kg/jr n'a aucun effet toxique sur les ovaires qui garde une architecture normale.

Une étude de toxicité développementale a montré que la dose de 72 mg/kg/j d'IMI administrée par voie orale pendant les 6 à 19 jours de gestation chez des lapins a entraîné une augmentation importante de la toxicité maternelle se traduisant par une augmentation du nombre d'avortements et de résorptions de toute la portée ainsi qu'une légère augmentation des altérations squelettiques (Koshlukova, 2006).

La recherche de la toxicité chronique de l'imidaclopride sur la fertilité des rats males a affirmé que des doses de 0,5, 2 et 8mg/kg/j provoquent une diminution des concentrations en spermatozoïdes dans l'épididyme, du taux de testostérone et une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux. L'apoptose et la fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) séminal étaient aussi observées chez les groupes traités à 2 et 8 mg/kg d'IMI (Ramazan et *al.*, 2012).

Une autre étude a montré une atrophie des tubules séminifères, une réduction de la mobilité des spermatozoïdes et même un arrêt de la spermatogénèse à des doses de 7 et 14 mg/kg/j d'imidaclopride (Najafi et *al.*, 2010).

### **I.1.2. Au niveau du foie, du système nerveux et les reins**

Plusieurs études en toxicologie expérimentale ont montré l'effet néfaste de l'imidaclopride sur les organes vitaux. Chez des rats femelles, l'administration de l'imidaclopride à raison de 20 mg/kg par voie orale pendant 90 jours a induit une augmentation du poids relatif du foie et une élévation des taux sériques de plusieurs enzymes y compris, la glutamate oxaloacétate transaminase et la glutamate pyruvate transaminase. Au niveau tissulaire, cette même dose a produit des nécroses aux niveaux des hépatocytes montrant des noyaux enflés et des lésions cytoplasmique et des cellules de purkinji ainsi qu'une perte des dendrites et des granules dans la couche granulaire du cervelet (Bharwaj et *al.*, 2010 ; Kapoor et *al.*, 2011).

L'examen histologique du foie a aussi montré une dilatation de la veine centrale et des sinusoides suite à un traitement de quatre semaines à 1/10 DL50 d'IMI des rats femelles (Harmandeep et *al.*, 2013). El-Gendy et *al.* (2010) ont rapporté qu'à cette même dose, l'activité antioxydant des glutathion peroxydase, myéloperoxydase, malondialdéhyde et la xanthine oxydase augmente dans le cas d'une exposition de 90 jours.

Duzunger et Erdogan (2012), ont décrit lors d'une exposition chronique à l'imidaclopride à raison de 1mg/kg/jour, l'installation d'une inflammation au niveau du foie et du système nerveux central via la production de cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumoral alpha, interleukine (1beta, 12 et 16)) et une altération du système antioxydant.

Cependant, l'administration d'IMI à raison de 307 mg/kg/j est à l'origine de tremblements, d'anomalies de la démarche et de déficiences du reflex de redressement ainsi que de réductions de la force de préhension, de la réponse à des stimulus, de la température corporelle et de l'activité motrice et locomotrice chez le rat (Sheets, 1994 *in* Koshlukova ,2006).

Chez les souris mâles, Arfat et *al.* (2014) ont rapporté qu'une toxicité par voie orale de la dose 15mg/kg/jr d'IMI pendant 15 jours a induit une dégénérescence des tubules et des glomérules et une hémolyse dans les reins.

Chez les animaux domestiques, une forte exposition aux produits vétérinaires présentant de l'imidaclopride dans leurs constitutions provoque des vomissements, salivation, difficulté de locomotion, tremblements, réaction cutanées et des signes de fatigue (Alvinerie, 2005). Notamment chez les chiennes traitées d'IMI, la consommation alimentaire diminue de 9-14% accompagnée d'une élévation du taux du cholestérol plasmatique et une augmentation du poids relatif du foie et du cerveau. Des tremblements violents et des changements morphologiques du foie et de la thyroïde ont aussi été rapportés (Allen et *al.*, 1989).

### **I.1.3. Au niveau du système immunitaire**

Chez les souris traitées par 5 et 10 mg/kg/j d'IMI, une réduction de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ainsi que des congestions splénique, hépatique, rénale et pulmonaire sont révélées. Cette toxicité par voie orale est associée à une déplétion lymphocytaire et une augmentation du nombre de neutrophiles et de cellules réticulo-endothéliales. Alors qu'à 2,5mg/kg/jour, il n'y a aucun changement significatif dans les réponses immunitaires (Prarabdh et *al.*, 2013).

L'exposition sub-chronique de l'IMI à faibles doses sur des lapins a révélé son effet toxique sur les lymphocytes mais aucune différence significative n'a été observée sur la fréquence des micronoyaux (Polychronis et *al.*, 2012).

*In vitro*, l'imidaclopride est jugé clastogène sur les lymphocytes humains, induisant des lacunes au niveau les chromatides (Costa et *al.*, 2011). Des échanges de chromatides sœurs ont aussi été reportés pendant la phase S impliquant par la suite la rupture des deux brins d'ADN, suivie d'un échange de duplex d'ADN entiers (Van Veen et Hawley, 2003).

Parallèlement, de nombreux travaux sont menés au sein de notre laboratoire confirmant la présence d'altérations structurales à des doses d'IMI bien inférieures à celles décrites par la littérature au niveau des différents parenchymes : pulmonaire

(Boukersi, 2012 ; Arkame, 2013), hépatique (Boukenoui et Mahboubi, 2010 ; Kerkar et Kheldoun, 2010 ; Agoud, 2013), thyroïdien (Boudegzdame, 2013 ; Mahboubi, 2013), rénal (Aourag, 2013), ovarien (Mahboubi, 2013), surrénalien et de la rate (Boukenoui, 2013). Ces altérations sont associées aux perturbations des hormones thyroïdiennes (Boudegzdame, 2013) et biochimiques (Kerkar et Kheldoun, 2010) chez des rats femelles de souche Wistar traités par plusieurs doses faibles d'imidaclopride, Confidor®, à savoir les 1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/85 et 1/120 DL50.

La présente étude a pour objectif, la recherche de la toxicité chronique par voie orale de deux faibles doses d'imidaclopride (1/120 et 1/85 DL50) et leurs effets dose et temps dépendants au niveau de la thyroïde et de la rate chez des rats femelles en croissance. Elle est réalisée au niveau des laboratoires de physiologie animale de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, du service d'anatomopathologie CHU-Hussein Dey- Alger et du laboratoire d'analyse médicale de Hadjout durant la période étalée de mois de mai au septembre 2014.

## **II.1. MATERIEL**

### **II.1.1. Animaux et régimes**

Notre étude est portée sur 50 rats femelles de souche Wistar, en croissance, acquièrent auprès de l'institut pasteur de Kouba. Le poids moyen dont est situé entre 119,86 g et 185,77 g.

Avant toute expérimentation, les animaux sont gardés une semaine dans l'animalerie où la température ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), le degré d'hygrométrie ( $70\pm 10\%$ ), avec une période de lumière qui commence à 7h du matin sont contrôlés. Tous les animaux reçoivent un régime alimentaire standard équilibré sous forme de bouchons (Tableau I de l'annexe I) provenant de la société industrielle de concentré à Bouzerea, Alger. L'alimentation et l'eau sont fournies *ad-libitum*.

### **II.1.2. Insecticide**

L'imidaclopride (IMI), insecticide commercialisé présenté dans un flacon contenant un litre de solution concentrée (200 g/ml), est utilisée sous forme diluée selon les doses choisies (1/120 et 1/85 DL50) et d'après le poids de chaque animal.

II.1.2.1. première dose

A partir de la DL50 qui est de 424mg/kg/jour chez la femelle (LARAMEE, 2007), nous avons calculé la première dose, 1/120 DL50 d'IMI :

DL50 → 424 mg/kg

$$X = \frac{424}{120} = 3,533 \text{ mg/kg}$$

1/120 DL50 → X

$$X = 1/120 \text{ DL50 IMI} = 3,533 \text{ mg/kg}$$

Pour trouver le volume à prélever de la solution mère, nous avons:

200mg → 1 ml

$$X_1 = \frac{3,533}{200} = 0,0176 \text{ ml}$$

3,533 mg → X<sub>1</sub>

$$X_1 = \text{volume de } 1/120 \text{ DL50 IMI} = 0,0176 \text{ ml}$$

La dose administrée pour chaque rat est calculée par la suite en fonction de son poids,

Exemple : si le poids corporel est de 114g la dose administrée sera par conséquent :

1000g → 0,0176 ml

$$X_2 = \frac{114 \times 0,0176}{1000} = 0,0020 \text{ ml}$$

114 g → X<sub>2</sub>

$$X_2 = \text{volume de } 1/120 \text{ DL50 IMI administré} = 0,0020 \text{ ml}$$

II.1.2.2. Deuxième dose

La deuxième dose est de 1/85 DL50 d'IMI :

DL50 → 424 mg/kg

$$X_3 = \frac{424}{85} = 4,9882 \text{ mg/kg}$$

1/85 DL50 → X<sub>3</sub>

$$X_3 = 1/85 \text{ DL50 IMI} = 4,9882 \text{ mg/kg}$$

Pour trouver le volume à prélever de la solution mère, nous avons :

200mg  $\longrightarrow$  1 ml

4,9882 mg  $\longrightarrow$   $X_4$

$$X_4 = \frac{4,9882}{200} = 0,0249 \text{ ml}$$

**$X_4 = \text{volume de } 1/85 \text{ DL50 IMI} = 00,0249 \text{ ml}$**

### **II.1.3. Appareillage et réactifs**

Le matériel non biologique est spécifique à l'étude histopathologie (annexe 1).

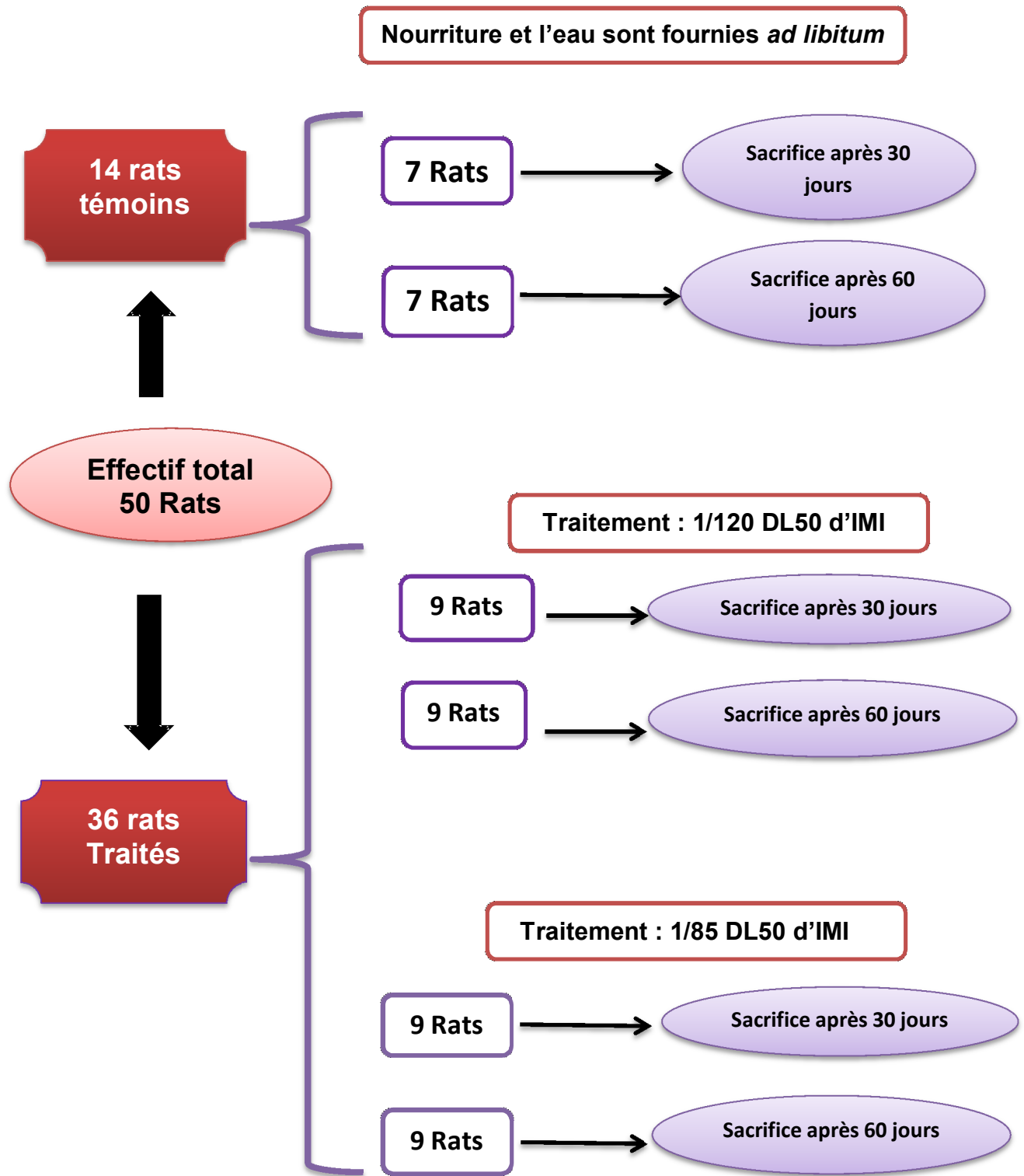
## **II.2. METHODES**

### **II.2.1. Expérimentation**

Les rats sont répartis en six lots (Figure 1):

- 1<sup>er</sup> lot est composé de 7 rats témoins qui reçoivent que de l'eau et de la nourriture quotidiennement pendant 30 jours.
- 2<sup>ème</sup> lot est composé de 7 rats témoins qui reçoivent que de l'eau et de la nourriture quotidiennement pendant 60 jours.
- 3<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/120 DL50d'IMI pendant 30 jours.
- 4<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/120 DL50d'IMI pendant 60 jours.
- 5<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/85DL50d'IMI pendant 30 jours.
- 6<sup>ème</sup> lot est composé de 9 rats gavés quotidiennement d'une solution d'imidaclopride à raison de 1/85DL50d'IMI pendant 60 jours.

Tous les rats reçoivent de l'eau et de la nourriture à volonté. La prise du poids corporel est réalisée une fois par semaine afin de suivre l'évolution de la masse corporelle ainsi de réduire l'effet du stress durant le gavage.



**Figure 1:** Répartition des lots.



### **II.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons**

Après une légère anesthésie avec le chloroforme, les sacrifices sont réalisés par décapitation après la fin de la période de traitement de chaque groupe et cela la matinée entre 9h et 11h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.

Le sang artério-veineux est recueilli dans des tubes secs, héparinés et des tubes contenant 10% de l'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA) afin de réaliser ultérieurement les différents dosages biochimique et hématologique. Le plasma et le sérum obtenu après une centrifugation à 3000 tours /min pendant 20 minutes sont congelés à -20°C afin de réaliser les dosages hormonales.

Les thyroïdes et les rates sont aussi rapidement prélevées sur un lit de glace. Les rates sont pesées. Alors que les thyroïdes ne sont pas pesés vu la difficulté de les débarrassées du cartilage. Les organes sont ensuite fixés dans le formol à 10% afin de chercher ultérieurement les altérations structurales au microscope photonique.

### **II.2.3. Etude histopathologie de la glande thyroïde et la rate**

Afin de réaliser l'étude histopathologie sur la thyroïde et la rate, nous avons utilisé les étapes décrites selon Martoja et Martoja (1967).

#### **II.2.3.1. Fixation et rinçage**

La fixation sert d'assurer le maintien de la structure morphologique et de l'intégrité chimique des tissus tels qu'elles se présentant au moment de leur prélèvements.

Les organes sont fixés dans le formol à 10% pendant 48 heures puis rincés à l'eau courante pendant 24 heures.

#### **II.2.3.2. Déshydratation et éclaircissement**

Les organes sont imprégnés dans sept bains d'alcool éthylique à concentration croissante :

- Alcool 70° (trois bains de 30 minutes).
- Alcool 95° (deux bains de 30 minutes).
- Alcool 100° (deux bains de 30 minutes).

L'éclaircissement est effectué dans deux bains de xylène pendant 30 minutes chacun.

#### **II.2.3.3. Imprégnation**

Dans une étuve réglée à 56° C, les organes sont imprégnés dans deux bains successifs : le premier bain de 50% de xylène et 50% de paraffine pure et le deuxième bain comprend que de la paraffine pure. La durée est d'une heure pour chacun.

#### **II.2.3.4. Inclusion et mise en bloc**

L'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine.
- Placement des cassettes sur les quelles est inscrit le numéro et l'état de l'animal.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 7 minutes.

#### **II.2.3.5. Confection des coupes et collage des rubans**

Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome « type Leica » avec une épaisseur de 5 µm. Les rubans sont étalés dans un bain d'eau thermostatée (37°C) puis récupérés et collés sur des lames gélatinées et ensuite séchés dans l'étuve à 40°C pendant 24 heures.

#### **II.2.3.7. Déparaffinage et hydratation**

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans quatre bains de xylène pendant

deux minutes chacun. Les coupes sont hydratées dans quatre bains d'éthanol décroissant : 100° ; 95° ; 90° ; 70° pendant deux minutes chacun.

#### **II.2.3.8. Coloration**

Deux méthodes de coloration sont utilisées, l'hématoxyline-éosine et trichrome de Masson (annexe 1).

#### **II.2.3.9. Montage et observation**

Une lamelle est fixée à l'aide d'un l'Eukitt sur chaque coupe. Les lames sont nettoyées par le xylène. L'observation microscopique est réalisée à l'aide d'un microscope photonique aux différents grossissements : x100, x400 . La prise des photos est effectuée par une photo microscope Leica.

#### **II.2.4. Analyse statistique**

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  Ecart-type. Les comparaisons intergroupes des témoins et des traités sont réalisées avec le logiciel StatEL. Le test statistique utilisé est le test t de student. La différence est jugée :

- Non significative (NS) quand  $p > 0,05$ .
- Significative (\*) quand  $0,02 < p < 0,05$ .
- Très significative (\*\*) quand  $0,01 < p < 0,02$ .
- Hautement significative (\*\*\*) quand  $p < 0,01$ .

Le poids relatif des organes est déterminé comme suit :

$$\frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids absolu (g)}} \times 100$$

### III.1. RESULTATS

La recherche des aspects et les caractéristiques de la toxicité chronique par voie orale d'imidaclopride à raison de 1/120 et 1/85 DL50 est basée sur l'étude de l'évolution pondérale et l'étude histopathologique du parenchyme thyroïdien et splénique chez des rats femelles de souche Wistar.

#### III.1.1. Evolution pondérale

##### III.1.1.1. Poids corporel

- Après 30 jours d'expérimentation

Selon les résultats obtenus après 30 jours d'expérimentation, nous avons enregistré une croissance pondérale chez tous les rats du premier lot témoin (156,18 g ± 20,82 vs 119,86 g ± 11,39) (Tableau II de l'annexe 2 et III) et traités par 1/120 DL50 d'IMI (166,29 g ± 9,52 vs 115,97 g ± 2,88) (Tableau II de l'annexe 2 et IV) ainsi que chez la majorité des rats traités (n=7) par 1/85 DL50 d'IMI (192,85 g ± 17,63 vs 159,34 g ± 15,41) (Tableau II de l'annexe 2 et V).

**Tableau III : Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 30 jours d'expérimentation.**

	Lot 1 témoin (30 jours)			
	Avant Expérimentation	Après Expérimentation	% de gain de poids	
1	123,15	139,46	13,24	
2	127,55	152,90	19,87	
3	123,18	185,85	50,87	
4	128,21	148,29	15,66	
5	120,00	148,10	23,41	
6	94,88	134,00	41,23	
7	122,08	184,69	51,28	
<b>Moyenne et ecartype</b>	<b>119,86 ± 11,39</b>	<b>156,18 ± 20,82</b>	<b>30,79</b>	<b>Gain</b>

Le gain du poids est de 30,79%, 42,21% et 21,84% respectivement (Tableaux III, IV et V). Il faut noter qu'une perte de poids (149,57g ± 9,29 vs 164,56g ± 0,40 ; -9,1%) est remarquée chez deux rats traités par 1/85 DL50 d'IMI (Tableau V).

**Tableau IV:** Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.

	Poids de premier lot de 1/120 DL50 (30 jours)			Gain
	Avant Expérimentation	Avant Expérimentation	% gain de poids	
1	114,11	185,60	62,65	
2	113,46	172,02	51,61	
3	117,97	166,00	40,71	
4	119,83	164,02	36,87	
5	114,09	161,03	41,14	
6	117,88	163,00	38,27	
7	111,03	161,80	45,72	
8	117,24	156,92	33,84	
9	118,12	152,55	29,14	
<b>M ± E</b>	<b>115,97 ± 2,88</b>	<b>166,29 ± 9,52</b>	<b>42,21</b>	

**Tableau V:** Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 imidaclopride pendant 30 jours.

	Poids de premier lot de 1/85 DL50 (30 jours)			Gain
	Avant Expérimentation	Après Expérimentation	% gain de poids	
1	165,03	212,44	28,72	
2	161,14	162,90	1,09	
3	161,28	194,60	20,65	
4	166,47	212,01	27,35	
5	163,78	183,40	11,97	
6	125,47	184,40	46,96	
7	172,33	200,21	16,17	
<b>Moyenne et écartype</b>	<b>159,34 ± 15,41</b>	<b>192,85 ± 17,6</b>	<b>21,84</b>	
8	164,85	143,00	-13,25	
9	164,28	156,14	-4,95	

Moyenne et ecartype	164,56 ± 0,40	149,57 ± 9,29	-9,1	Régression
---------------------	---------------	---------------	------	------------

- Après 60 jours d'expérimentation

Au cours des 60 jours d'expérimentation, le deuxième lot des rats témoins montre une prise de poids progressive (171,77 g ± 19,75 vs 148,57 g ± 9,84) avec un gain de 17,48% (Tableau VI de l'annexe 2 et tableau VII).

**Tableau VII: Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats témoins au cours de 60 jours d'expérimentation.**

	Lot 2 témoin (60 jours)			
	Avant Expérimentation	Après Expérimentation	% de gain de poids	
1	157	179,99	14,64	
2	159	172,02	8,18	
3	154	159,00	26,6	
4	154	202,46	31,46	
5	142	173,27	22	
6	141	143,90	2,04	
7	133	Mort	-	
<b>M et E</b>	<b>148,57 ± 9,84</b>	<b>171,77 ± 19,75</b>	<b>17,48</b>	<b>Gain</b>

Par ailleurs, la majorité des rats traités à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 ( $n_1=8$  ;  $n_2= 8$ ) ont montré un gain de poids pendant les premiers 30 jours (10,95% et 24,52% respectivement). Un seul rat de chaque lot traité a présenté une régression pondérale (-8,29% et -4,81% respectivement).

Pendant les 30 jours restant, une trop faible croissance est remarquée seulement chez deux rats traités par 1/120 DL50 d'IMI (2,9%) et devient peu faible chez cinq rats traités par 1/85 DL50 d'IMI (12,64%). Alors que la perte de poids touche plus de rats traités par rapport à la première période d'expérimentation (30 jours). Elle est notée chez six rats traités par 1/120 DL50 d'IMI (-6,39%) et chez quatre rats traités par 1/85 DL50 d'IMI (-15,18%) (Tableaux VII et IX).

**Tableau VIII:** Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.

Poids de deuxième lot de 1/120 DL50 (60 jours)							
N° Rat	Avant Expérimentation	Après 30 jours	% gain de poids		Après Expérimentation	% gain de poids	
1	119,78	146,21	21,97		148,00	1,22	
2	144,69	154,63	6,86		159,23	2,97	
Moyenne et Ecartype	132,23 ± 17,61	150,42 ± 5,95	-		153,61 ± 7,94	2,09	Gain
3	145,19	168,24	15,87		-	-	
4	149,87	158,23	5,57		-	-	
5	151,74	173,43	14,29		-	-	
6	145,04	150,41	3,70		-	-	
8	144,95	153,53	5,91		-	-	
Moyenne et Ecartype	147,35 ± 3,21	160,76 ± 9,77	10,95		-	-	
3	-	-	-		157,20	-6,56	
4	-	-	-		150,00	-5,20	
5	-	-	-		165,47	-4,58	
6	-	-	-		140,00	-6,92	
7	149,43	142,24	-4,81		136,73	-3,87	
8	-	-	-		136,25	-11,25	
9	Mort				-	-	
M ± E	-				147,60 ±12,01	-6,39	Régression

**Tableau IX: Valeurs individuelles et moyennes des gains de poids corporels chez les rats traitées par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours.**

<b>Poids de deuxième lot de 1/85 DL50 (60 jours)</b>						
<b>N° Rat</b>	<b>Avant Expérimentation</b>	<b>Après 30 jours</b>	<b>% gain de poids</b>	<b>Après Expérimentation</b>	<b>% gain de poids</b>	
<b>1</b>	104,29	123,33	<b>18,25</b>	128,00	<b>3,78</b>	
<b>2</b>	101,00	135,26	<b>33,83</b>	164,00	<b>21,24</b>	
<b>3</b>	101,26	139,66	<b>37,92</b>	150,80	<b>7,97</b>	
<b>4</b>	108,89	136,52	<b>25,37</b>	150,20	<b>10,23</b>	
<b>5</b>	107,65	138,77	<b>28,90</b>	166,50	<b>19,98</b>	
<b>6</b>	100,02	142,52	<b>42,49</b>	-	-	
<b>7</b>	131,74	143,52	<b>8,94</b>	-	-	
<b>8</b>	114,00	114,54	<b>0,47</b>	-	-	
<b>M ± E</b>	<b>108,60 ± 10,48</b>	<b>134,26 ± 10,12</b>	<b>24,52</b>	<b>151,90 ± 15,28</b>	<b>12,64</b>	<b>Gain</b>
<b>6</b>	-	-	-	138,26	<b>-2,98</b>	
<b>7</b>	-	-	-	120,37	<b>-16,13</b>	
<b>8</b>	-	-	-	92,87	<b>-18,91</b>	
<b>9</b>	101,44	93,03	<b>-8,29</b>	71,90	<b>-22,71</b>	
<b>M ± E</b>	-			<b>105,85 ± 29,33</b>	<b>-15,18</b>	<b>Régression</b>



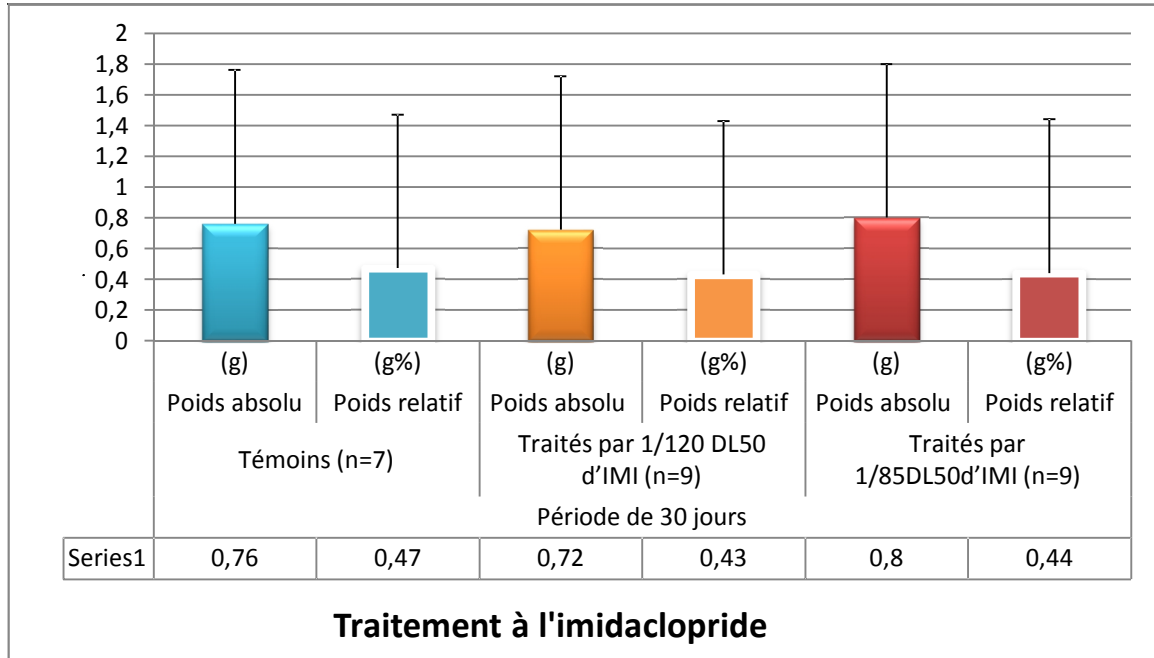
III.1.1.2. Poids des rates

Les résultats rassemblés dans les tableaux X et XI de l'annexe 2 et les figures 2 et 3 présentent les poids absolus et relatifs de la rate et leurs significations statistiques chez les rats témoins et traités à l'imidaclopride.

- Après 30 jours d'expérimentation

En comparaison à ceux des témoins (0,76 g ± 0,13), le poids absolu des rates ne semble pas connaître une modification statistiquement significative après 30 jours de traitement à l'imidaclopride (0,72 g ± 0,08 les rats traités par 1/120 DL50 et 0,8 g ± 0,11 chez les rats traités par 1/85 DL50) (tableaux X et XI de l'annexe 2).

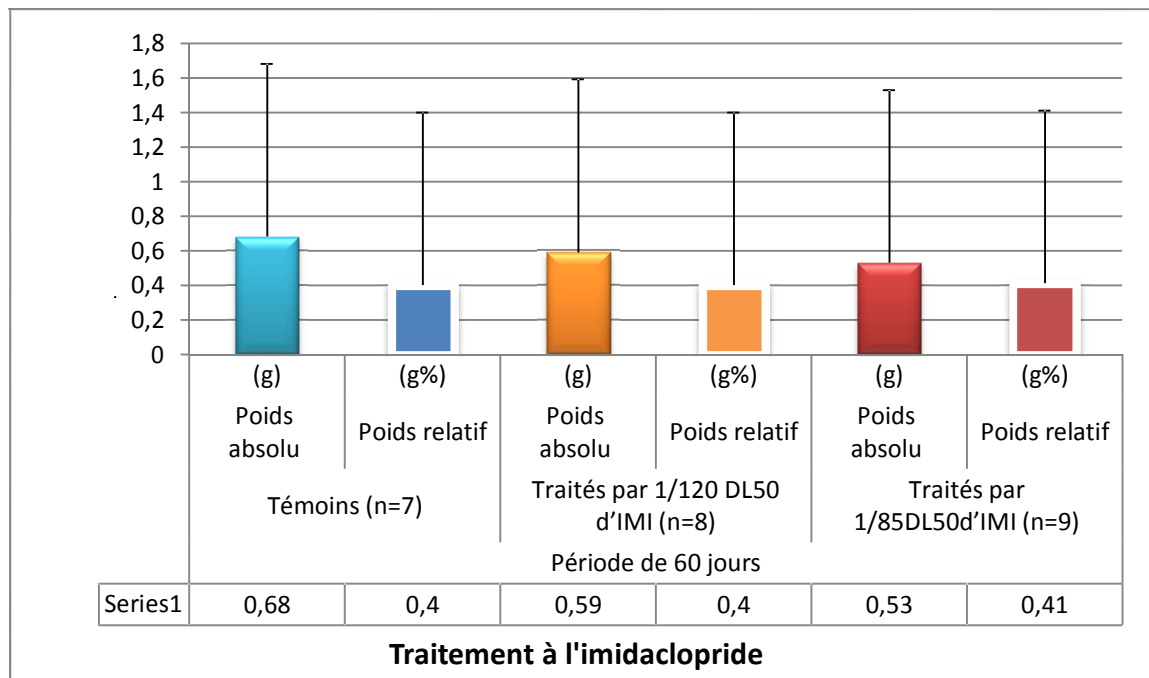
En comparaison avec les témoins (0,47g% ± 0,09), le poids relatif des rates ne semble pas connaître une modification statistiquement significative chez les rats traités par 1/120 et 1/85 DL50 d'IMI (0,43g% ± 0,05 et 0,44g% ± 0,08 respectivement (tableau XI et XII de l'annexe 2).



**Figure 2 : Effet de 30 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.**

- Après 60 jours d'expérimentation

Au cours des 60 jours d'expérimentation et en comparaison à celui des témoins ( $0,68g \pm 0,11$ ), le poids absolu des rates semble connaître une perte de poids chez les rats traités par 1/120 DL50 et 1/85 DL50 d'IMI ( $0,59 g \pm 0,10$  et  $0,53 g \pm 0,16$  respectivement). Cette diminution reste du point de vue statistique non significative. Cependant, le poids relatif des rates a montré une légère augmentation statistiquement non significative par rapport aux témoins ( $0,40g\% \pm 0,06$  ;  $0,41g\% \pm 0,12$  et  $0,40g\% \pm 0,06$  respectivement) (figure 3 et tableaux X ,XI, XII de l'annexe 2).



**Figure 3 : Effet de 60 jours de traitement à deux doses d'imidaclopride sur les poids absolu et relatif des rates chez les rats femelles.**

Nous constatons aussi qu'avec les deux doses, la durée du traitement à l'imidaclopride (après 30 et 60 jours) semble influencer les poids absolus et relatifs des rates chez les rats traités par 1/120 DL50 ( $0,72g \pm 0,08$  vs  $0,59g \pm 0,10$  et  $0,43g\% \pm 0,05$  vs  $0,40g\% \pm 0,06$  respectivement) et par 1/85 DL50 ( $0,80g \pm 0,11$  vs  $0,53g \pm 0,16$  et  $0,44g\% \pm 0,08$  vs  $0,41g\% \pm 0,12$  respectivement). La diminution des ces poids reste statistiquement non significative (tableaux XII et XIV de l'annexe 2).

### **III.1.2. Histopathologie du parenchyme thyroïdien**

#### **III.1.2.1. Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats témoins**

D'après la microscopie photonique, les coupes fines au niveau de la glande thyroïde des rats témoins présentent un parenchyme constitué de nombreux follicules de diamètres variables, situés dans un stroma conjonctivo-vasculaire (figure 4 a et c). Chaque follicule est délimité d'un épithélium simple formé de thyrocytes possédant des noyaux sombres. Ces cellules entourent une lumière large remplie de colloïde. Le tissu conjonctif interstitiel est plus ou moins important (Figure 4 b et d).

#### **III.1.2.2. Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats traités pendant 30 jours**

- Rats traités par 1/120 DL50

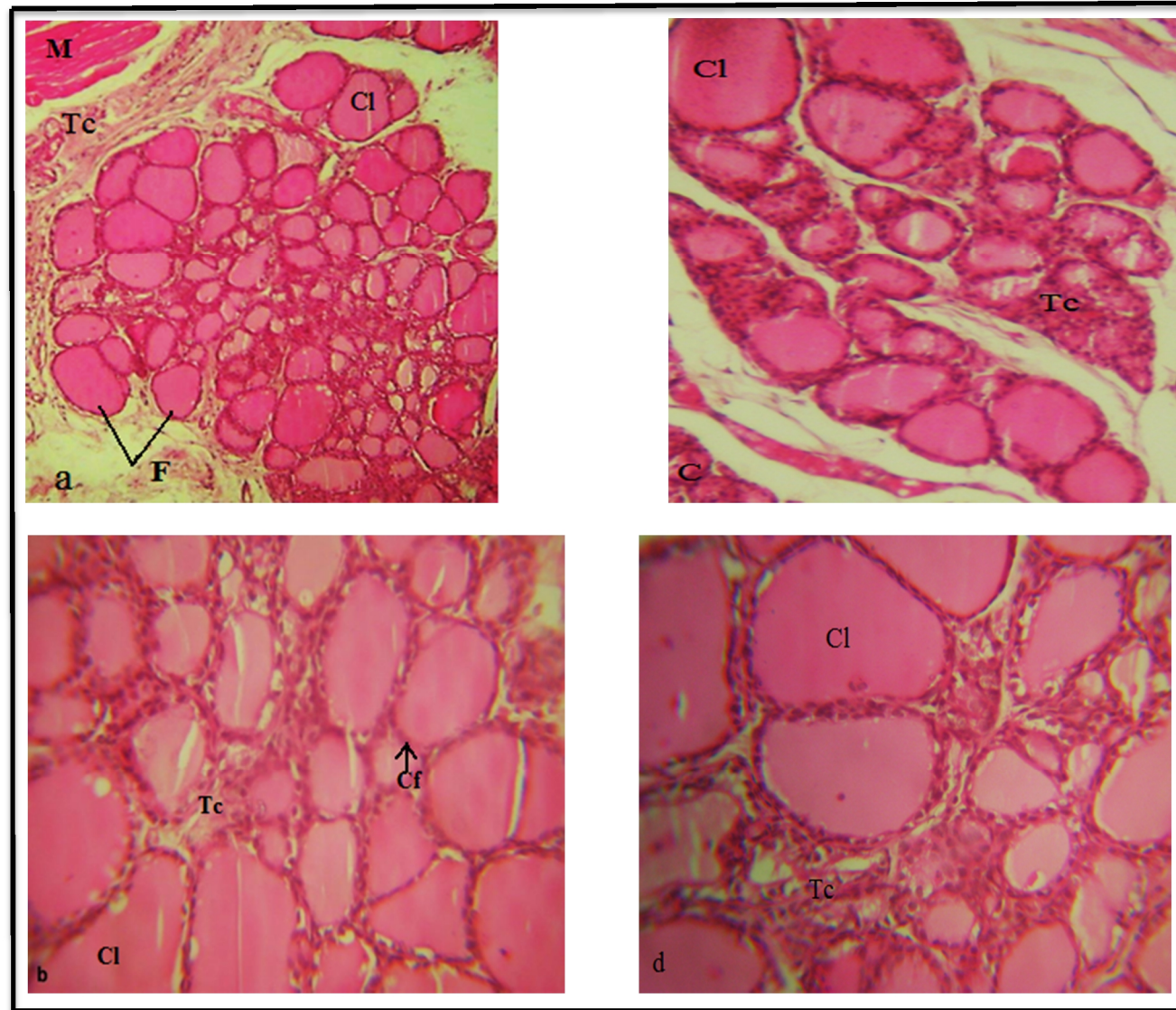
Chez les rats traités par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours, le parenchyme thyroïdien préserve son organisation structurale générale alors que l'augmentation du nombre de petits follicules devient apparente et la colloïde disparaît dans certains follicules (figure 5 a). Au niveau des cellules folliculaires (thyrocytes), le cytoplasme maintient son aspect normal (figure 5 b).

- Rats traités par 1/85 DL50

Le parenchyme thyroïdien chez les rats traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours, présente un aspect général normal avec une augmentation du nombre de petits follicules. La colloïde devient moins apparente dans certains follicules (figure 6 a). Au niveau des cellules folliculaires (thyrocytes), le cytoplasme devient très clair (figure 6 b et c).

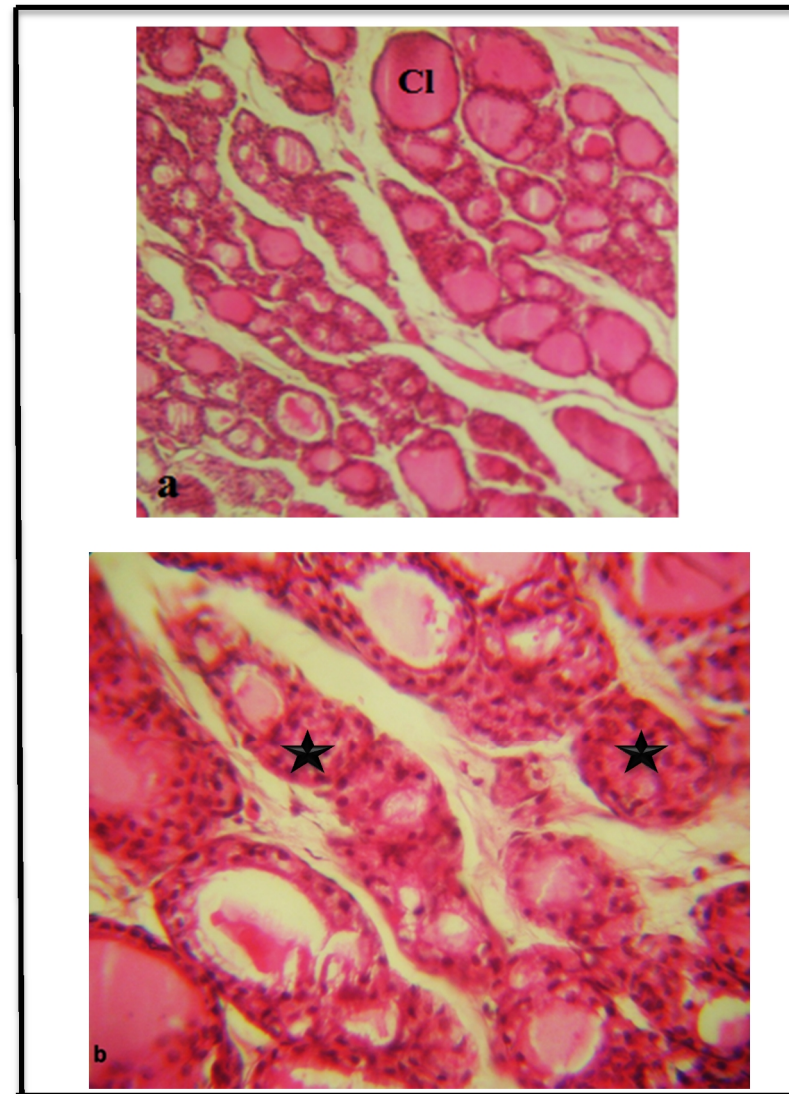
#### **III.1.2.3. Structure du parenchyme thyroïdien chez les rats traités pendant 60 jours**

Le parenchyme thyroïdien des rats traités par 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 60 jours présente l'installation des altérations retrouvées après 30 jours pour chaque lot (figures 7 et 7 a et b respectivement) avec la présence de l'aspect clair du cytoplasme dans certaines thyrocytes chez les rats traités par 1/120 DL50 (figure 7b).



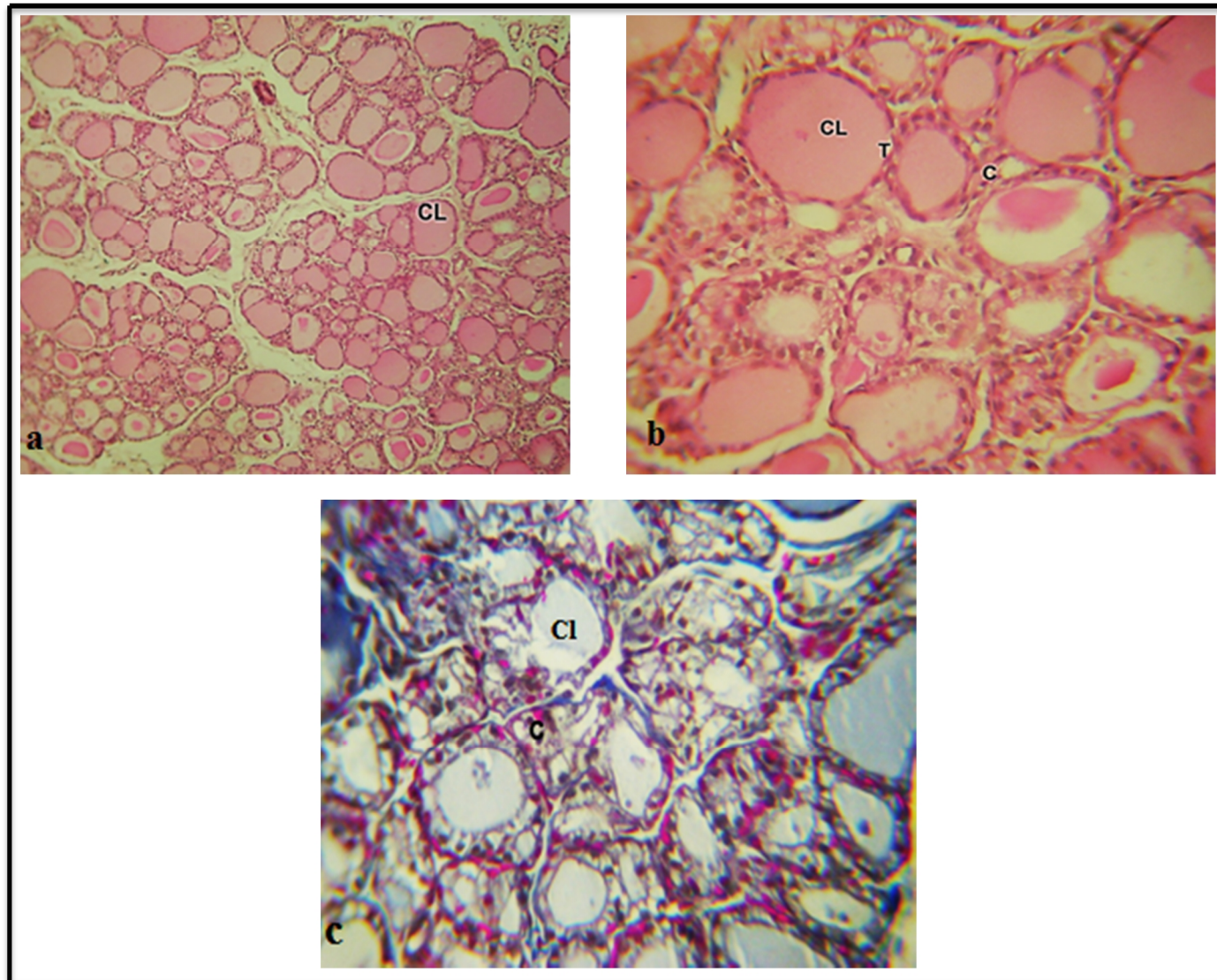
F : follicules ; Cf : Cellules folliculaires ; Cl : colloïde; Tc: Tissu conjonctif ; M : Muscle.

**Figure 4** : Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles témoins après 30 et 60 jours d'expérimentation. Coloration: HE; Gr: x100 (a et c avec zoom) ; x400 (b et d).



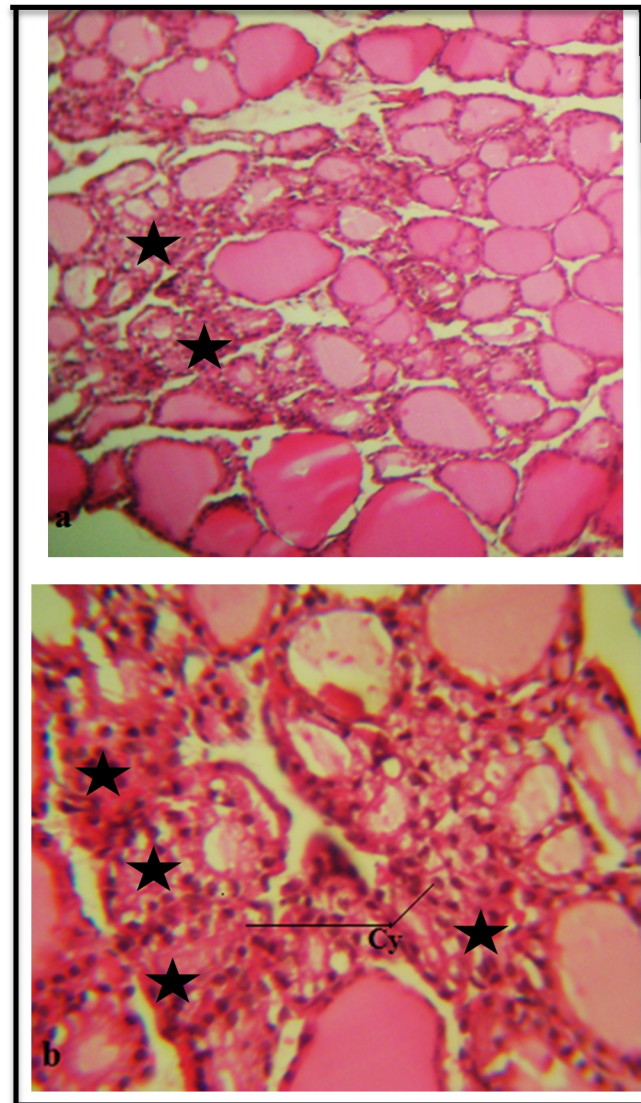
★ : Absence du colloïde.

**Figure 5** : Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours.  
Coloration: HE (a et b) Gr: x100 (a); x400 (b).



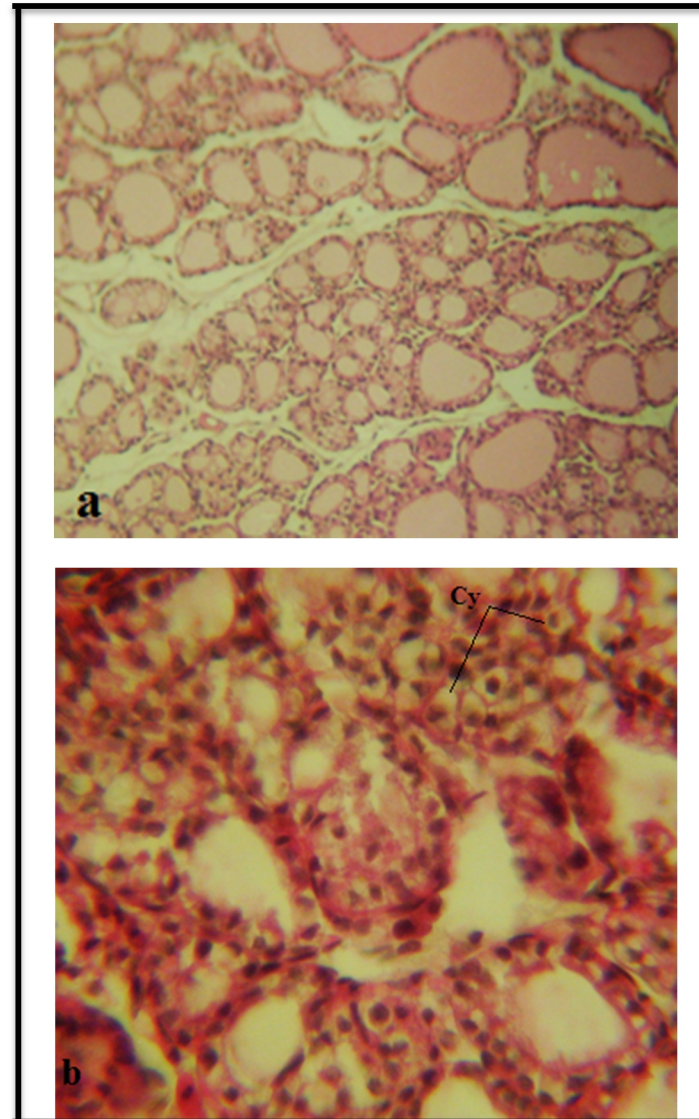
C : Cellules ; Cl : colloïde ; T : Thyrocytes.

**Figure 6** : Structure d'un parenchyme thyroïdien chez les rats femelles traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours.  
Coloration: HE (a et b) ; Trichome de Masson (c). Gr: x100 (a) ; x400 (b et c).



★: Absence du colloïde ; Cy : Cytoplasme clair.

**Figure 7** : Effet de la dose 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).



Cy : Cytoplasme clair.

**Figure 8** : Effet de la dose 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 60 jours sur la structure du parenchyme thyroïdien chez les rats femelles. Coloration: HE (a et b). Gr: x100 (a); x400 (b).



### **III.1.3. Histopathologie du parenchyme splénique**

#### **III.1.3.1. Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins**

Le parenchyme splénique des rats témoins est constitué de la pulpe rouge et de la pulpe blanche entourées d'une capsule dense qui projette des travées plus fines et ramifiées s'infiltrant dans le parenchyme pulpeux.

La pulpe blanche entoure et suit les artères et s'épaissit en masses ovoïdes, les nodules spléniques ou corpuscules de Malpighi (figure 9a et c). Chaque nodule splénique est formée de quatre composants: l'artériole centrale; le manchon lymphoïde péri-artériolaire; une couronne et d'un centre germinatif (figure 9 b et d).

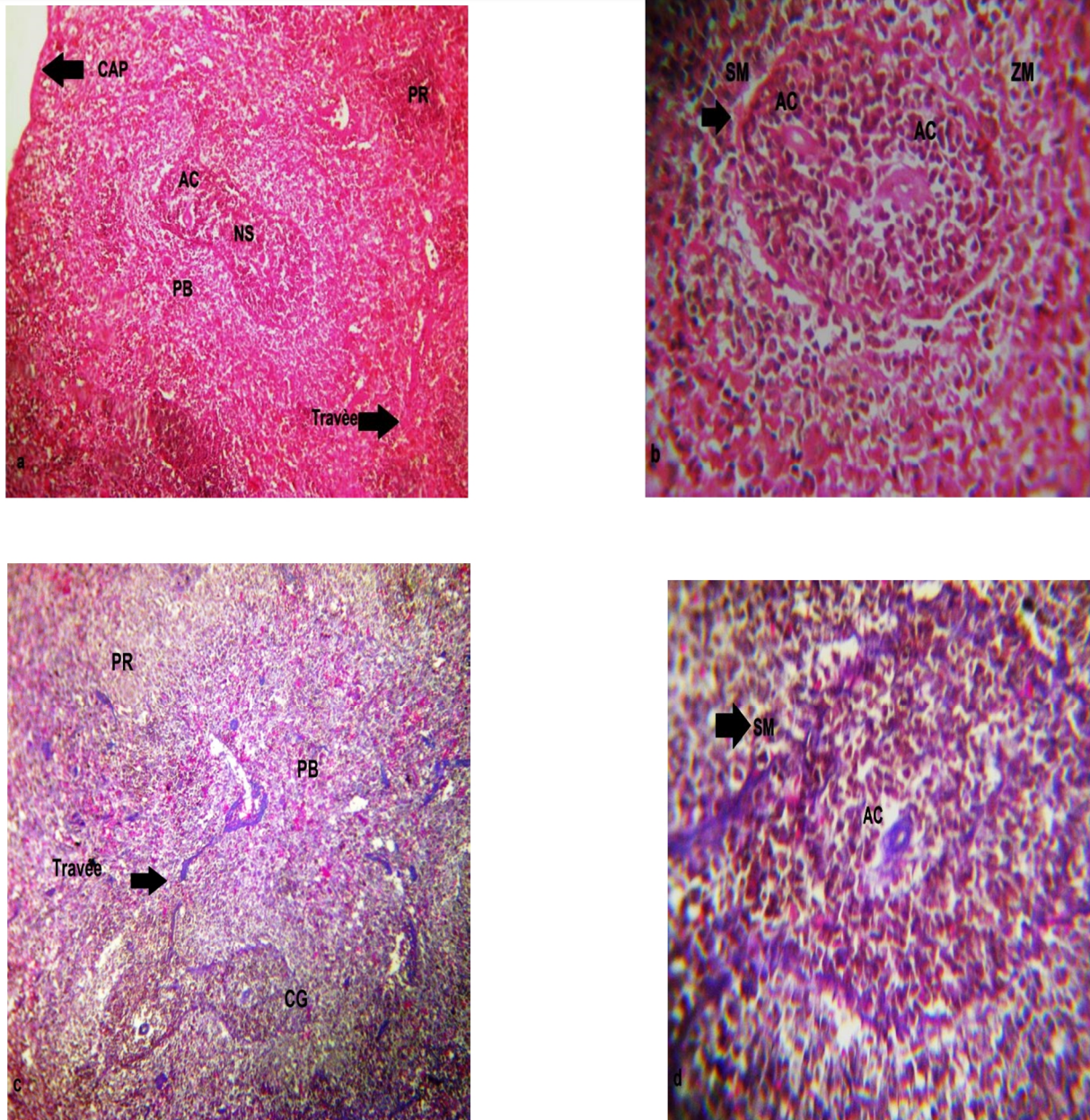
La pulpe rouge est homogène et formée de cordons cellulaires séparés par les capillaires sinusoides (figure 9 a et d). La zone marginale qu'interagissent la pulpe blanche et la pulpe rouge au niveau des sinus vasculaires (Figure 9 b).

#### **III.1.3.2. Structure du parenchyme splénique chez les rats traités pendant 30 jours**

L'observation microscopique des coupes fines au niveau de la rate chez les rats traités (1/120 et 1/85 DL50 IMI), montrent une nette prolifération de la pulpe blanche qui est plus prononcée avec la dose 1/85 DL50. Les nodules spléniques apparaissent fusionnés (figure 10a et b).

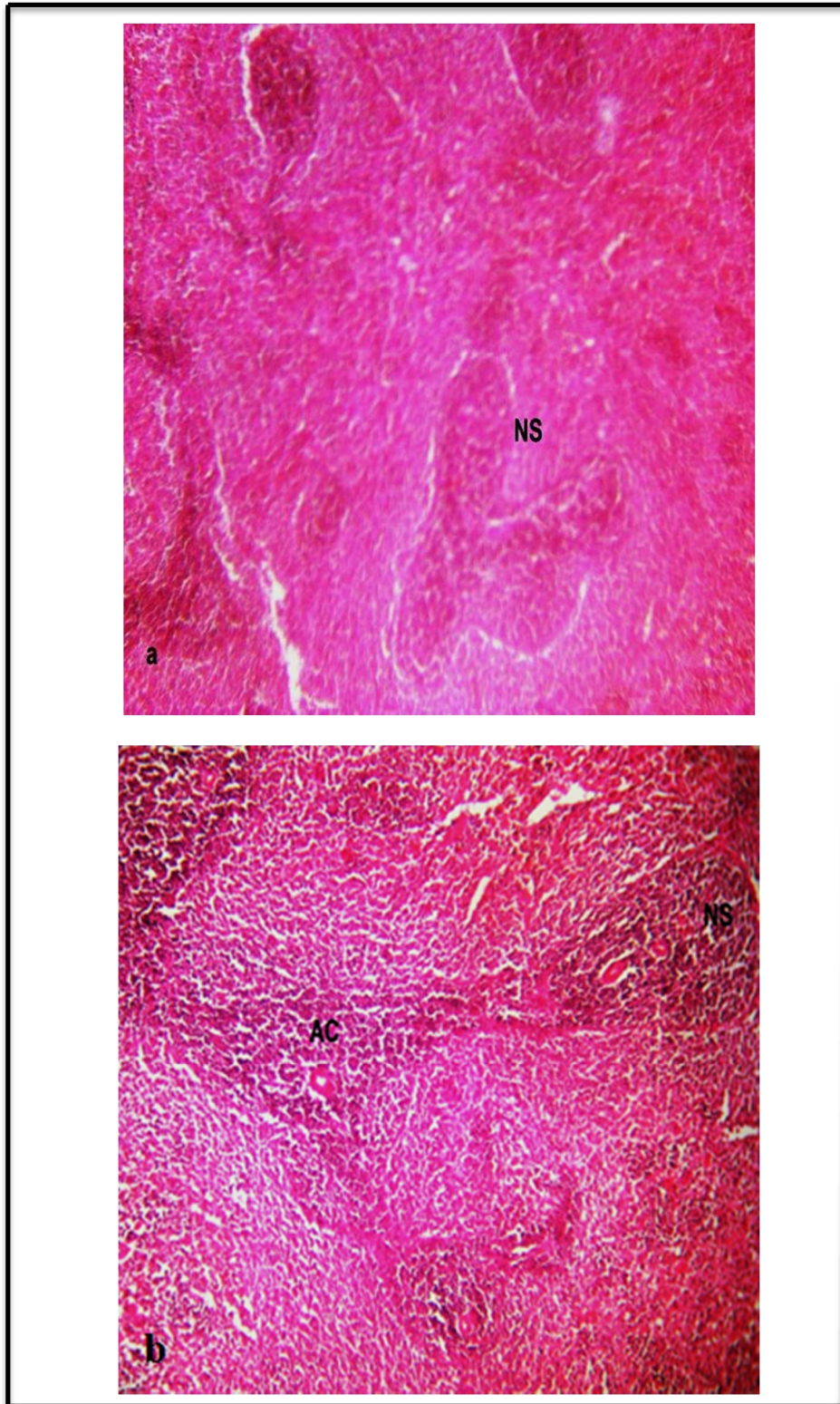
#### **III.1.3.3. Structure du parenchyme splénique chez les rats traités pendant 60 jours**

Chez tous les rats traités, la prolifération de la pulpe blanche devient importante en particulier le centre germinatif. La zone marginale apparait en prolifération avec la présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge (figure 11b) .Ces changements sont plus annoncés chez les rats traités par 1/85 DL50 (figure 11 a et b).



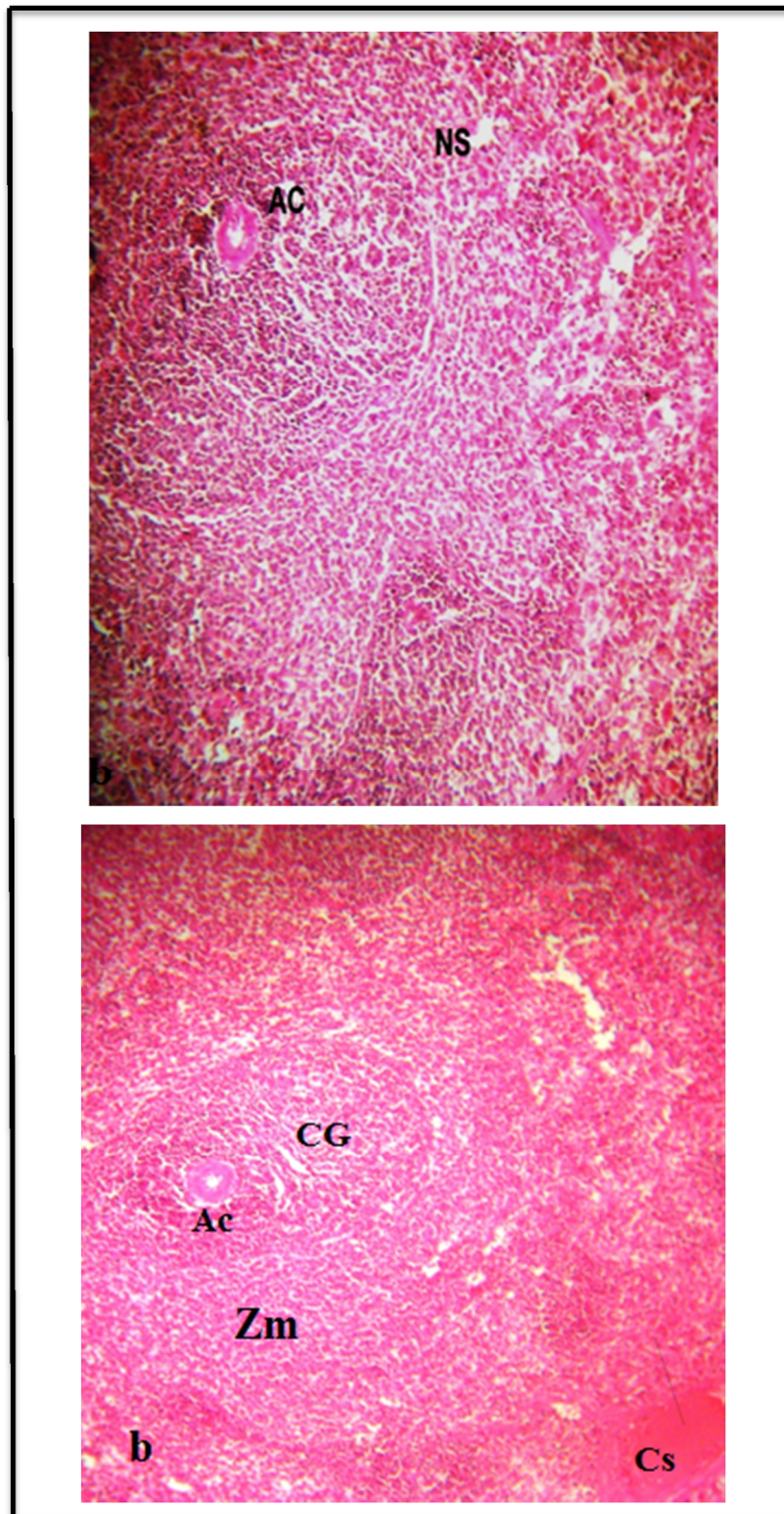
**CAP** : Capsule ; **CG** : Centre Germinatif ; **PB** : Pulpe Blanche ; **PR** : Pulpe Rouge ; **AC** : Artériole Centrale ; **SM** : Sinus Marginale ; **NS** : Nodule splénique ; **ZM** : zone marginale.

**Figure 9** : Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins  
Coloration: HE; Gr: x100 (a); x400 (b); Trichrome de Masson ; x100(c) ; x400 (d).



AC : Artériole Centrale; NS : Nodule splénique.

**Figure 10** : Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 30 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x100 (a et b).



AC : Artériole Centrale; CG : Centre germinatif ; Cs : congestion sanguine ; Zm : Zone marginale ; Ac : Artériole ; NS : Nodule splénique.

**Figure 11** : Effet du traitement à l'imidaclopride à raison de 1/120 DL50 et 1/85 DL50 pendant 60 jours sur la structure du parenchyme splénique chez les rats femelles. Coloration: HE; Gr: x400 (a et b).

### III.2. DISCUSSION

Dans notre travail, nous avons essayé de chercher la présence et les caractéristiques de la toxicité chronique par voie orale d'imidaclopride à raison de 1/120 et 1/85 DL50 d'imidaclopride à deux périodes, 30 et 60 jours au niveau des parenchymes thyroïdien et de la rate.

Dans nos conditions expérimentales, deux rats sont morts suite à une mauvaise manipulation lors de gavage. Alors que les autres rats témoins et traités par 1/120 DL50 d'IMI ont bénéficié d'un gain de poids après 30 jours d'expérimentation. Par contre, deux rats parmi neuf traités par 1/120 DL50 d'IMI ont perdu du poids. Ces résultats confirment ceux retrouvés auparavant avec les doses 29,33 mg/kg/j et 44 mg/kg/j et 5,10 et 20mg/kg/j d'imidaclopride appliquées chez des rats femelles de souche wistar pendant 22 et 30 jours (Khaldoun et Kerkar, 2010 ; Boukenoui et Mahboubi, 2010 ; Chikar et Remili, 2012).

Après 60 jours d'expérimentation, la majorité des rats traités ont montré une prise de poids pendant les premiers 30 jours qui régresse dans les derniers 30 jours. Cette régression est importante chez les rats traités par 1/85 DL50. Des résultats similaires sont rapportés par Bhardwaj et *al.* (2010) qui ont noté une réduction du poids corporel des rats femelles traités par 20 mg/kg/j d'imidaclopride pendant 90 jours. Ces chercheurs ont considéré cette régression, qui est due à la faible consommation de l'alimentation, comme signe de toxicité chronique.

Il est maintenant connu que l'exposition à divers pesticides est associée aux dommages des organes et les tissus avec la présence des changements pathologiques qui les affectent. D'après nos résultats, une régression non significative des poids des rates est notée après le traitement. Les mêmes résultats sont reportés par Boukenoui (2012). Contrairement aux résultats retrouvés par Prerna et *al.* (2014) qui montre la diminution de façon significative du poids relatif de la rate après l'administration des doses fortes d'imidaclopride à savoir 10 et 20mg/kg/j pendant 60 jours chez des rats femelles.

L'analyse des coupes histologiques des organes étudiées chez les rats traités révèle des altérations structurales plus ou moins importantes au niveau du parenchyme qui se manifestent différemment selon la dose et l'organe.

Le parenchyme thyroïdien préserve son organisation structurale générale alors que l'augmentation du nombre de petits follicules devient apparente et le colloïde disparaît dans certains follicules. Au niveau des thyrocytes, le cytoplasme maintient son aspect normal chez les traités par 1/120 DL50, alors que ce dernier devient très clair chez les traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours. Ces altérations sont aussi installées au niveau de parenchyme pendant 60 jours. Des résultats similaires sont décrits par Chikar et Remili (2012). Ces chercheurs ont noté une réaction inflammatoire, au niveau du parenchyme thyroïdien, manifestée par une dégénérescence des follicules, une augmentation du nombre de micro-follicule, une perte de colloïde chez des rats traités par 5, 10 et 20 mg/kg/j d'imidaclopride pendant 30 jours.

Le parenchyme splénique montre une prolifération de la pulpe blanche chez les rats traités par 1/120 DL50 qui devient plus prononcée avec la dose 1/85 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours ainsi que les nodules spléniques apparaissent fusionnés alors que durant la période de 60 jours la pulpe blanche devient importante et la zone marginale apparaît en prolifération avec la présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge chez les rats traités par 1/120 DL50. Ces changements sont plus marqués chez les rats traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par Boukenoui (2012) avec les mêmes doses. Cet auteur a noté une hyperplasie de la pulpe blanche se manifestant par une augmentation du nombre et du volume des nodules spléniques, une fusion de ces follicules ainsi qu'une déplétion lymphocytaire au niveau nodulaire. Ces signes de toxicité sont dose-dépendants. Prarabdh et al. (2012), ont révélé une réduction de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ainsi que la présence des congestions spléniques. Cette toxicité est associée à une déplétion lymphocytaire et une augmentation du nombre de neutrophiles et de cellules réticulo-endothéliales chez des souris traitées à 5 et 10 mg/kg/j. Prarabdh et al. (2012) ont remarqué des altérations histopathologiques au niveau de la rate des souris exposées à dose élevée de 10 mg/kg/j d'imidaclopride pendant 28 jours qui sont des indicateurs de la destruction des tissus.



## CONCLUSION

À travers cette étude, nous nous sommes intéressés à la recherche d'une toxicité chronique par voie orale de deux faibles doses d'imidaclopride, 1/120 et 1/85 DL50 au niveau des parenchymes thyroïdien et splénique chez des rats femelles de souche Wistar.

En effet, nous avons montré que l'imidaclopride à faibles doses exerce un effet toxique

- sur la croissance générale de l'animal qui est temps-dépendant.
- Sur le poids de la rate qui reste statistiquement non significatif.
- et à l'échelle tissulaire et cellulaire.

Les parenchymes thyroïdien et splénique des rats femelles sont des tissus sensibles à ces faibles doses. Néanmoins, les signes de toxicité sont dose-dépendants.

Après 30 jours, la toxicité à l'échelle structurale se manifeste

- ❖ Au niveau du parenchyme thyroïdien par :
  - une augmentation du nombre de petits follicules.
  - Une perte folliculaire et du colloïde.
  - Présence d'un aspect clair du cytoplasme des thyrocytes en cas de la dose 1/85 DL50.
- ❖ Au niveau du parenchyme splénique par :
  - Une prolifération de la pulpe blanche qui est plus marquée avec la dose 1/85 DL50.
  - La fusion des nodules spléniques.

Il reste à savoir que ces signes de toxicité dépendent aussi du temps de l'administration de l'insecticide. Ils deviennent plus sévères à long terme. Après 60 jours, les altérations du parenchyme thyroïdien sont plus importantes au niveau du cytoplasme. La prolifération de la



pulpe blanche devient assez importante, en particulier le centre germinatif avec la présence d'une congestion sanguine au niveau de la pulpe rouge en cas de la dose 1/85 DL50.

Afin d'approfondir cette étude, nous proposons la réalisation

- d'une étude morphométrique en calculant le diamètre des follicules thyroïdiens et leur épithélium, des centres germinatifs et la zone marginale.
- D'une étude immunohistochimique en cherchant la prolifération des lymphocytes qui témoignent une réaction immunitaire spécifique.
- D'une étude ultrastructurale qui relève les altérations au niveau des organites.
- Des dosages biochimiques en relation avec les altérations.

Pour l'intérêt socio-économique et de santé humaine et animale, il est recommandé de remplacer ces produits chimiques par les insecticides biologiques.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**AGOUD, D. 2012.** Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique et chronique d'imidaclopride sur le foie chez les rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 80p.*

**AL-SAYEDA, H. 2007.** Transfert d'un insecticide systémique, l'imidaclopride, chez la tomate : implication du transport phloémien. *Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique, Toulouse, 174 p.*

**ALLEN, T.R., FREI, T. , LUETKEMEIER, H. , VOGEL, O. , BIEDERMANN, K. & WILSON, J. 1989.** 52-week oral toxicity (feeding) study with NTN 33893 technical in the dog. *Unpublished report from Research & Consulting Company AG, report N. 4856.*

**ALVINERIE, M. 2005.** Étude des effets individuels indésirable consécutifs à l'utilisation de l'imidaclopride chez l'Homme et les carnivores domestiques. , 3.

**ANDREWS, P C. KRINSKI, N.I. 1982.** Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate, *Anal. Biochem.* **127**: 346–350.

**AOURAG, H. 2013.** Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique d'imidaclopride sur les reins chez les rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 75p.*

**ARFAT, YASIR. NASIR, MAHMOOD. MUHAMMAD, USMANTAHIR. MARYAM, RASHI D. SAMEER, ANJUM. FAN, ZHAO. DI-JIE, LI. YU-LONG, SUN. LIFANG, HU . CHEN ZHIHAO CHONG, YIN . AI-RONG, QIAN. 2014.** Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. *Toxicology Reports*, **1** : 554–561.

**ARKAM, F. 2012.** Recherche d'indices d'inflammation subchronique et chronique chez les rats femelles de souche Wistar traités à l'imidaclopride. *Mémoire de Master. USDB. Pp 60.*

**ASLAN, R. SEKEROGLU, M R. GULTEKIN, F. 1997.** Blood lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals. Relation to age, sex, habits, life style and environment. *J. Environ. Sci. Health A* **32**: 2101–2109.

**BHARDWAJ, SHIPRA. M. K, SRIVASTAVA . UPASANA, KAPOOR , L.P. SRIVASTAVA.2010.** A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food and chemical toxicolog*, **48**: 1185-1190.

**BOUDEGZDEM, N. 2013.** Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique et chronique d'imidaclopride sur la thyroïde des rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 76p.*

**BOUKARZI, H. 2012.** Recherche d'indices d'inflammation subchronique et chronique chez les rats femelles de souche Wistar traités à l'imidaclopride. *Mémoire de Magister, ENS., Kouba, Alger, 80p.*

**BOUKENOUI, K.2013.** Contribution à la recherche des effets de deux doses d'imidaclopride sur les glandes surrénales et la structure de la rate chez les rats de souche *Mémoire de master t, USDB.*

**BOUKENOUI, K. et MAHBOUBI, Y. 2010.** Recherche des aspects de la toxicité orale d'une dose supplémentaire d'imidaclopride et l'effet de *Lavandula stoechas* chez les rats adultes de souche Wistar. *Mémoire d'ingénieur, USDB. Pp 45.*

**CAMPOS,FRANCISCO.MANUEL,RODRIGUEZ–YANEZ.MAR, CASTELLANOS.SUSANA, ARIAS. Maria, PEREZ- MATO. TOMAS, SOBRINO. MIGUEL, BLANCO. JOAQUIN, SERENA. and JOSE , CASTILLO. 2011.** Blood levels of glutamate oxaloacetate transaminase are more strongly associated with good outcome in acute ischaemic stroke than glutamate pyruvate transaminase levels. *Department of Neurology-Stroke Unit, Clinical Neurosciences Research Laboratory, University of Santiago de Compostela..*

**CHIKAR, A. et REMILI, S. 2012.** Contribution à la recherche de la toxicité d'un insecticide, imidaclopride au niveau thyroïde chez les rats femelles de souche Wistar. *Mémoire de fin d'étude*, USDB.

**COSTA, C., SILVARI, V., MELCHINI, A., CATANIA, S., HEFFRON, J.J., TROVATO, A. and DEPASQUALE, R. 2011.** Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.*, **672**: 40–44.

**DEMSIA, G. VLASTOD . GOUMENOU, M. MATTHOPOULOS, DP. 2007.** Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone marrow. *Mutation research*, **634**:32-39.

**DUZGUNER, V. et ERDOGAN ,S. 2012.** Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

**EL-GENDY, K.S. ALY, NM. MAHMOUD, FH. KENAWY, A. and EL- SABE ,EK. 2010.** The role of vitamin as antioxidant in protection of oxidative stress. *Food and chemical toxicology*.**48**: 215-221.

**HARMANDEEP, KAUR .TOOR, GURINDER. KAUR .SANGHA, KULDEEP. SINGH .KHERA. 2013.** Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **105**: 1-4.

**HEMA, R. 2011.** Recherche des aspects de la toxicité orale de 1/15 DL50 d'imidaclopride sur la glande thyroïde chez les rats femelles adultes de souche Wistar. *Mémoire de fin d'étude* , USDB.

**INRAA, 2013.** Bulletin de Veille Technologique et Économique. *INRAA., ALGERIE*.

**KAPOOR ,UPASANA. M K ,SRIVASTAVA. L P, SRIVASTAVA .2011.** Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats . *Food and Chemical Toxicology* ;**49** :3086–3089.

**KHALDOUN,N. KERKAR ,N. 2010.** Contribution de la recherché des indices de la toxicité chronique d'un insecticide imidaclopride, avec deux doses différentes chez le rat femelle adultes de souche Wistar. *Mémoire d'ingénieur, USDB.*

**KOSHLUKOVA, E . 2006.** Imidacloprid risk characterisation document . California environmental protection agency , *departement of pesticide regulation.*

**LARAMEE, S. 2007.** L'abeille domestique comme bioindicateur ecotoxicologique de polluants : le cas de l'insecticide imidaclopride .*Thèse du grade de maitre en environnement. Université Sherbrooke, Québec, 74p.*

**MAHBOUBI ,Y.2013.** Contribution à la recherche des effets de deux doses d'imidaclopride sur l'aspect morpho fonctionnel de la thyroïde et la structure ovarienne chez les rats de souche Wistar .*Mémoire de master USDB.*

**MARTOJA,R. MARTOJA-PIERSON, N. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris Masson. 345p.

**MILINDMITRA,LONARE.MANJO,KUMAR.SACHIN,RAUT.PRARABDHA,BADGUJAR SAGAR ,DOLTADE . AVINASH ,TELANG. 2014.** Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin. *Neurochemistry International* **78**:122–129.

**MISRA, H P. FRIDOVICH, I. 1972.** The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Biol. Chem.* **247**:3170–3175.

**NAJAFI, GOLAMREZA. MAZDAK, RAZI .AREF ,HOSHYAR . SIMINEH ,SHAHMOHAMADLOO. SAJAD ,FEYZI. 2010.** The Effect of Chronic Exposure with Imidaclopride Insecticide on Fertility in Mature Male Rats. *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility* Vol 4, No 1., Pages: 9-16.

**PRADJA,N. WEBER,G. 1975.**Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas, *FEBS Lett.* **59**: 245–249.

**PRERNA,VOHRA. KULDEEP, SINGH KHERA. GURINDER, KAUR SANGHA.2014.** Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. *Department of Zoology, College of Basic Sciences and Humanities, Punjab Agricultural University, Ludhiana 141004, Punjab, India.*

**POLYCHRONIS, R. EMPOULAKIS, A. ESTES, M. HEARN, D.H. BURRACK, H.J. and PIERSON, E.A. 2012.** Prevalence of *Candidatus* Erwinia Dacicola in Wild and Laboratory Olive Fruit Fly Populations and Across Developmental Stages. *Environmental Entomology.*, Pages: 265-274.

**PRARABDH , BADGUJAR . S K ,JAIN. AJIT ,SINGH. J S ,PUNIA. R P, GUPTA. GAURI A, CHANDRATRE. 2013.** Immunotoxic effects of imidacloprid following 28 days of oral exposure in BALB/c mice. *Environmental toxicology and pharmacology* ,3 5 :408–418.

**RAMAZAN, BAL. MUSTAFA, NAZIROGL. GAFFARI, TURK. ÖKKES, Yilmaz. TUNCAY, KULOGLU. EBRU, ETEM. GIYASETTIN , BAYDAS. 2012.** Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. Copyright © *John Wiley & Sons, Ltd.*

**SHEETS, LP. 1994.** An acute oral neurotoxicity screening study with technical grade imidacloprid (NTN 33893) in rats. *Miles, Inc. (Mobay). Study No. 10634-1.*

**TOMIZAWA, M. et CASIDA, JE. 2003.** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 48 : 339–364.

**VAN VEEN ,JE. et HAWLEY ,RS. 2003.** Meiosis: when even two is a crowd. *Curr Biol* 13: R831–833.



## **1. Matériel et réactifs**

### **1.1. Petit matériel**

Les cages.

Seringue et aiguilles de gavage.

La trousse pour dissection.

Entonnoir.

Les cassettes en plastique.

Les moules en métal (Port-cassette).

Les lames.

Les portes lames.

Boite de coloration.

Les lamelles.

### **1.2. Réactifs**

L'insecticide Imidaclopride.

Tubes à EDTA, héparinés et secs.

Liquide de fixation « formol commercialisé à 35% ».

Alcool (100°, 95°, 70°).

Xylène.

Gélatine.

Colorants hématoxyline et éosine et bleu d'aniline.

Liquide de montage (Eukitt).



1.3. Alimentation des rats

**Tableau I:** Composition de l'alimentation.

<b>Composition des bouchons</b>	
Protéines (%)	20
Matières grasses brutes (%)	4
Cendre brutes	6,5
Cellulose brute (%)	5,5
Calcium (%)	1,1
Phosphore (%)	0,8
Vitamine A (UL /kg)	22000
Vitamine D3 (UL/kg)	2200
Vitamine E (UL/kg)	100
Sulfate de cuivre pentahydraté/ cuivre (mg/kg)	8

2. Appareillages

Balance de précision.

Balance ordinaire.

Centrifugeuse.

Etuve à 37° de type « Sakura ».

Distributeur de paraffine de type « Leica ».

Platine refroidissante de type « Leica ».

Microtome de type « Leica ».

Bain Marie de type « Firlabo ».

Microscope optique de type « Leica ».



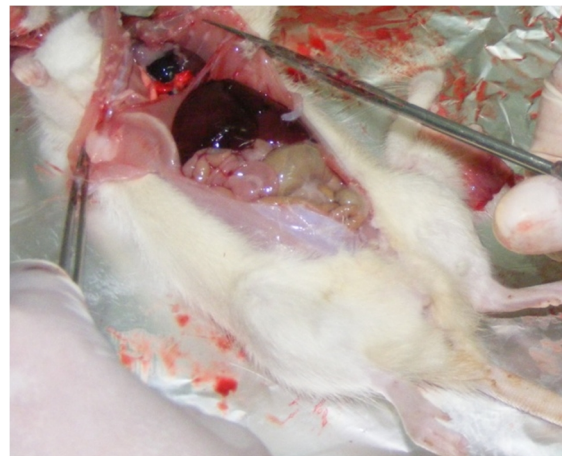
Trousse de dissection



Aiguille de gavage



Gavage



Dissection et prélèvement des organes



Tubes EDTA

Tubes héparinés



Tubes secs



Cassettes en plastique



Moules metaliques



Portes lames



Balance de precision



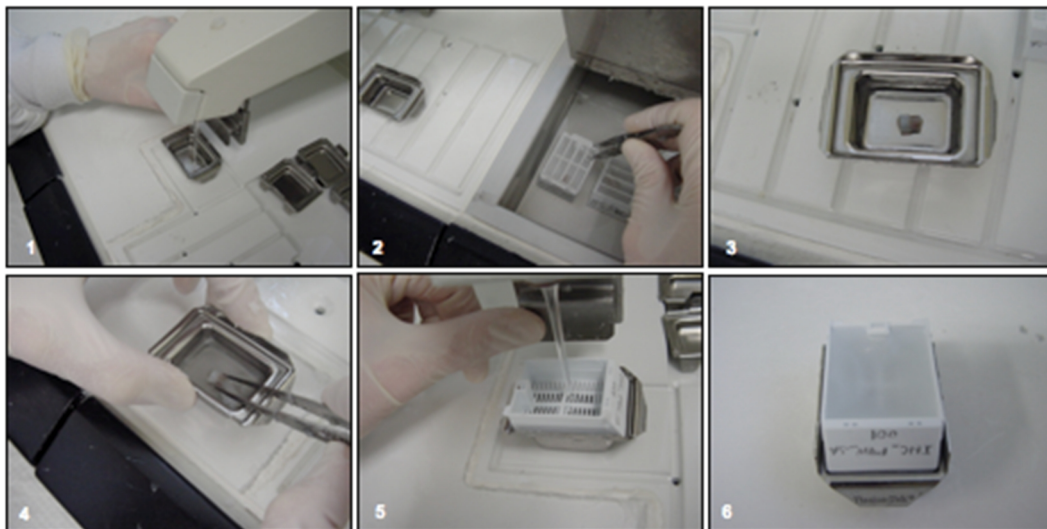
Balance electronique



Centrifugeuse



Distributeur de paraffine «Leica»



Confection des blocs de paraffine



Platine refroidissante «Leica»



Microtome «Leica»  
Confection des rubans



Etuve à 37° C



Batterie de coloration



Montage des coupes colorées  
l'Eukitt



Microscope photonique « Leica »  
Pour Observation

### 3. Fiches techniques

#### 3.1. Fiche technique N°1 : Fixation

Formol 10%.....1000 ml

#### 3.2. Fiche technique N°2 : Collage des rubans

Gélatine (MARTOJA , 1968)

Gélatine en poudre.....4g

Eau distillée.....100 ml

#### 3.3. Fiche technique N°3 : Coloration

❖ **Coloration à l'hématoxyline-eosine** : cette méthode est réalisée selon les étapes suivantes :

- Un bain d'hématoxyline pendant trois minutes.
- Rinçage à l'eau courante.
- Un bain d'éosine pendant 30 secondes.
- Rinçage à l'eau courante.
- Différencier successivement dans les alcools jusqu'à l'alcool absolu.
- Passer dans deux bains de xylènes.

❖ **Trichrome de Masson** : les pièces sont colorées selon les étapes suivantes :

- Un passage des coupes dans un bain d'hématoxyline d'Harris pendant 2 minutes.
- Lavage à l'eau courante.
- Dépôt des lames dans un bain de fushine pendant 30 secondes puis le rinçage par l'eau distillée.
- Un bain de phosphomolybdique phosphotingestique pendant 5 minutes.
- Coloration dans un bain de bleu d'aniline pendant 3 minutes.
- Dépôt dans un bain d'eau courante afin d'éliminer l'excès de colorant.
- Différenciation successive dans des alcools éthyliques jusqu'à l'alcool absolu, 2 minutes chacun.
- Un bain de xylène pendant 3 minutes.

#### **4. Calcul statistique**

##### **4.1. Moyenne**

Soit  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$  une suite finie de nombre.

La moyenne arithmétique est le rapport :

$$m = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X_i}{n}$$

m : la moyenne arithmétique

n : l'effectif

x : caractère quantitatif

##### **4.2. L'écart type**

L'écart type est la racine de la variance.

$$\delta = v^{1/2}$$

$\delta$  : l'écart type

v : la variance

##### **4.3. La variance**

La variance d'une série des valeurs du caractère est la valeur moyenne arithmétique des carrés des écarts de ces valeurs par rapport à leur moyenne arithmétique.

$$v = \frac{\sum (X_i - m)^2}{n}$$



- v : La variance
- m : La moyenne arithmétique
- n : L'effectif
- x : Caractère quantitatif

#### 4.4. Test d'homogénéité de deux échantillons

##### **n < 30 : loi de Student**

Hypothèse nulle ( $H_0$ ) : Les deux échantillons sont semblables ; le traitement n'a pas d'effet.

On va calculer « **la variance commune estimée** » :

$$\delta = \frac{n_1 \delta_1^2 + n_2 \delta_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad 1/2$$

Ensuite l'écart réduit :

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{\delta \left[ 1/n_1 + 1/n_2 \right]^{1/2}}$$

**t** : l'écart réduit.

**m<sub>1</sub>** : la moyenne arithmétique de l'échantillon 1

**m<sub>2</sub>** : la moyenne arithmétique de l'échantillon 2

**δ** : la variance commune estimée

**n<sub>1</sub>** : nombre de l'échantillon 1

**n<sub>2</sub>** : nombre de l'échantillon 2

On compare ce (t) calculé avec la valeur de t % (ddl =  $n_1 + n_2 - 2$ ) théorique tirée de la table de Student.

Si  $t < t \%$  : l'hypothèse nulle est retenue ; la différence n'est pas significative, le traitement n'a pas d'effet.

Si  $t > t \%$  : l'hypothèse nulle est rejetée ; la différence est significative donc le traitement a un effet.

**Table de Student.**

ddl	$\alpha\%$	20%	10%	5%	2%	1%
1		3,087	6,314	12,706	30,821	63,657
2		1,886	2,920	4,303	6,905	9,925
3		1,628	2,353	3,182	4,541	5,841
4		1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5		1,476	2,015	2,571	3,385	4,032
6		1,440	1,943	2,447	3,148	3,707
7		1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8		1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9		1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10		1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11		1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12		1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13		1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14		1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15		1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16		1,337	1,746	2,120	2,583	2,924
17		1,333	1,740	2,110	2,5672	2,898
18		1,330	1,734	2,101	2,552	2,978
19		1,328	1,729	2,093	2,539	2,964
20		1,325	1,725	2,085	2,528	2,845
21		1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22		1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23		1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24		1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25		1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26		1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27		1,314	1,703	2,052	2,478	2,771
28		1,313	1,701	2,048	2,467	2,765
29		1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30		1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
40		1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
60		1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
120		1,289	1,658	1,980	2,358	2,617
$\infty$		1,282	1,645	1,960	2,326	2,576

**Tableau de dilution des alcools (Table de Gay-Lussac).**

Quantité d'eau en cm<sup>3</sup> à ajouter à 100 cm<sup>3</sup> d'alcool à diluer

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
	20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

**Tableau II : Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 30 jours.**

Lots de rats	N°	Poids corporel initial (j <sub>0</sub> )	Poids Corporel 2 <sup>me</sup> semaine	Poids Corporel 3 <sup>me</sup> semaine	Poids Corporel 4 <sup>me</sup> semaine
<b>Témoins</b>	1	123,15	128,13	134,78	139,46
	2	127,55	132,75	144,14	152,90
	3	123,18	127,99	150,06	185,85
	4	128,21	134,55	142,77	148,29
	5	120,00	129,69	138,15	148,10
	6	94,88	115,87	130,00	134,00
	7	122,08	128,77	164,13	184,69
<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>119,86 ± 11,399</b>	<b>128,25 ± 5,994</b>	<b>143,43 ± 11,228</b>	<b>156,18 ± 20,828</b>
<b>1/120 DL50 d'IMI</b>	1	114,11	127,05	140,23	185.60
	2	113,46	125,42	153,23	172.02
	3	117,97	135,21	147,47	166.00
	4	119,83	132,75	145,98	164.02
	5	114,09	132,63	147,22	161.03
	6	117,88	129,99	146,69	163,00
	7	111,03	125,33	142,54	161,80
	8	117,24	118,47	140,26	156,92
	9	118,12	116,73	132,07	152,55
<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>115,97 ± 2,882</b>	<b>127,06 ± 6,369</b>	<b>143,96 ± 6,035</b>	<b>158,56 ± 4,796</b>

<b>1/85 DL50 d'IMI</b>	1	165,03	159,71	208,41	212,44
	2	161,14	137,36	162,77	162,90
	3	172,33	180,44	189,34	200,21
	4	161,28	162,74	185,32	194,60
	5	164,85	156,11	147,96	143,00
	6	163,78	182,9	178,75	183,40
	7	166,47	161,57	179,41	212,01
	8	164,28	141,63	143,53	156,14
	9	125,75	128,26	189,02	184,40
<b>Moyenne</b>		<b>160,54</b>	<b>156,74</b>	<b>176,05</b>	<b>185,77</b>
<b>±</b>		<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>
<b>ecartype</b>		<b>13,456</b>	<b>18,471</b>	<b>20,974</b>	<b>25,074</b>

**Tableau VI : Valeurs individuelles et moyennes des poids corporels (g) des rats femelles témoins et traités par l'imidaclopride pendant 60 jours.**

<b>Lots des Rats</b>	<b>N</b>	<b>Poids corporel initial j<sub>0</sub></b>	<b>Poids Corporel 2me semaine</b>	<b>Poids Corporel 3me semaine</b>	<b>Poids Corporel 4me semaine</b>	<b>Poids Corporel 5me semaine</b>	<b>Poids Corporel 6me semaine</b>	<b>Poids Corporel 7me semaine</b>	<b>Poids Corporel 8me semaine</b>
<b>Témoins</b>	1	157	160,04	167,99	170,44	170,88	173,15	175,04	179,99
	2	159	164,01	168,77	160,10	163,02	165,77	169,41	172,02
	3	154	157,00	153,89	156,28	159,93	163,24	161,99	159,00
	4	154	159,04	161,88	167,44	175,00	183,75	189,77	202,46
	5	142	145,09	149,13	153,78	158,22	164,21	168,45	173,27
	6	141	139,88	137,52	134,88	138,05	140,22	141,55	143,90
	7	133	125,21	99,05	Mort	Mort	Mort	Mort	Mort

**ANNEXES 2**

**RESULTATS**

<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>148,57 ± 9,846</b>	<b>150,03 ± 9,483</b>	<b>148,31 ± 24,3749</b>	<b>157,15 ± 12,643</b>	<b>160,85 ± 12,908</b>	<b>165,05 ± 14,396</b>	<b>167,70 ± 15,880</b>	<b>171,77 ± 19,756</b>
<b>1/120 DL50 d'IMI</b>	1	145,04	147,44	151,00	150,41	148,52	144,22	141,21	140,00
	2	145,19	163,88	170,13	168,24	164,13	161,33	159,98	157,20
	3	145,01	116,45	Mort	Mort	Mort	Mort	Mort	Mort
	4	149,87	152,00	156,48	158,23	156,13	153,98	151,87	150,00
	5	151,74	144,69	163,07	173,43	171,75	168,45	167,00	165,47
	6	149,43	141,11	142,85	142,24	141,00	141,46	138,13	136,73
	7	144,95	144,87	155,47	153,53	150,55	146,54	140,14	136,25
	8	119,78	134,44	145,23	146,21	146,48	147,24	147,86	148,00
	9	144,69	151,50	150,02	154,63	156,02	156,11	157,45	159,23
<b>Moyenne ± ecartype</b>		<b>147,37 ± 3,205</b>	<b>144,89 ± 17,511</b>	<b>160,17 ± 8,272</b>	<b>162,57 ± 10,276</b>	<b>160,13 ± 10,030</b>	<b>156,99 ± 10,365</b>	<b>155,01 ± 11,086</b>	<b>153,16 ± 10,817</b>
<b>1/85 DL50 d'IMI</b>	1	104,29	111,05	122,23	123,33	125,21	127,59	126,23	128,00
	2	100,02	97,99	144,29	142,52	145,36	140,55	135,45	138,26
	3	101,44	124,12	95,09	93,03	90,14	88,89	73,21	71,90
	4	101,00	104,63	129,45	135,26	141,52	152,41	159,25	164,00
	5	107,65	113,52	132,21	138,77	145,58	150,45	160,11	166,50
	6	108,89	117,00	132,36	136,52	143,88	145,41	148,72	150,20
	7	101,26	113,40	137,25	139,66	145,52	146,00	148,75	150,80
	8	131,74	120,78	140,45	143,52	141,41	136,26	128,26	120,37
	9	114,00	104,55	112,23	114,54	110,22	97,52	95,41	92,87
<b>Moyenne ± Ecartype</b>		<b>107,81 ± 10,093</b>	<b>111,89 ± 8,367</b>	<b>129,16 ± 14,367</b>	<b>129,68 ± 14,362</b>	<b>132,09 ± 19,807</b>	<b>131,67 ± 23,156</b>	<b>130,59 ± 29,430</b>	<b>131,43 ± 32,073</b>

**Tableau X: Valeurs individuelles et moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%)de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.**

N° rat	Périodes de 30 jours						Périodes de 60 jours					
	Témoins (n=7)		Traites par 1/120 DL50 d'IMI (n=9)		Traités par 1/85 DL50d'IMI (n=9)		Témoins (n=7)		Traites par 1/120 DL50 d'IMI (n=9)		Traités par 1/85 DL50d'IMI (n=9)	
	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)
1	0,640	0,458	0,699	0,376	0,588	0,276	0,672	0,373	0,510	0,364	0,480	0,375
2	0,622	0,406	0,704	0,409	0,692	0,424	0,674	0,391	0,611	0,388	0,721	0,521
3	0,715	0,384	0,695	0,418	0,961	0,479	0,760	0,477	Mort	Mort	0,480	0,667
4	0,620	0,418	0,711	0,432	0,822	0,422	0,666	0,328	0,780	0,520	0,581	0,354
5	0,923	0,623	0,877	0,544	0,785	0,548	0,840	0,484	0,650	0,392	0,712	0,427
6	0,808	0,602	0,700	0,429	0,934	0,509	0,505	0,350	0,570	0,416	0,542	0,359
7	0,847	0,458	0,644	0,398	0,786	0,370	Mort	Mort	0,460	0,337	0,700	0,464
8	-	-	0,838	0,534	0,836	0,535	-	-	0,662	0,447	0,305	0,253
9	-	-	0,627	0,411	0,877	0,475	-	-	0,485	0,304	0,275	0,296
<b>M</b>	<b>0,76</b>	<b>0,478</b>	<b>0,72</b>	<b>0,439</b>	<b>0,80</b>	<b>0,448</b>	<b>0,68</b>	<b>0,40</b>	<b>0,59</b>	<b>0,401</b>	<b>0,53</b>	<b>0,412</b>
<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>	<b>±</b>
<b>E</b>	<b>0,130</b>	<b>0,095</b>	<b>0,082</b>	<b>0,059</b>	<b>0,116</b>	<b>0,086</b>	<b>0,111</b>	<b>0,065</b>	<b>0,106</b>	<b>0,063</b>	<b>0,166</b>	<b>0,125</b>

**Tableau XI:** Valeurs moyennes des poids absolu(g) et relatif (g%) de la rate chez les rats femelles adultes témoins et traités par l'imidaclopride.

		Période de 30 jours					Période de 60 jours					
N° rat	Témoins (n=7)		Traités par 1/120 DL50 d'IMI (n=9)		Traités par 1/85DL50d'IMI (n=9)		Témoins (n=7)		Traités par 1/120 DL50 d'IMI (n=8)		Traités par 1/85DL50d'IMI (n=9)	
	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)	Poids absolu (g)	Poids relatif (g%)
M ± E	0,76 ± 0,13	0,47 ± 0,09	0,72 ± 0,08	0,43 ± 0,05	0,80 ± 0,11	0,44 ± 0,08	0,68 ± 0,11	0,40 ± 0,06	0,59 ± 0,10	0,40 ± 0,06	0,53 ± 0,16	0,41 ± 0,12

**Tableau XII:** Signification statistique des différences des poids absolus et relatifs chez les rats traités par l'imidaclopride par rapport aux témoins.

		1/85 DL50		1/120 DL50	
Poids absolu (g)	Lots des rats	Traités 1/85 / Témoins (30 jours)	Traités 1/85/ Témoins (60 jours)	Traités 1/120 / Témoins (30jours)	Traités 1/120 / Témoins (60 jours)
	M ± E	0,80 ± 0,11 / 0,76 ± 0,13	0,53 ± 0,16 / 0,68 ± 0,11	0,72 ± 0,08 / 0,76 ± 0,13	0,59 ± 0,10 / 0,68 ± 0,11
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 14 tc= 0,130 tt= 2,145	ddl = 13 tc= 0,446 tt= 2,160	ddl = 14 tc= 0,135 tt= 2,145	ddl = 12 tc= 0,471 tt= 2,179
	%de risque (p)	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>
Poids relatif (g%)	Moyenne et Ecartype	0,44 ±0,08 / 0,47 ±0,09	0,41 ± 0,12 / 0,40 ±0,06	0,43 ± 0,05 / 0,47 ± 0,09	0,40 ± 0,06 / 0,40 ±0,06
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 14 tc= 0,333 tt= 2,145	ddl = 13 tc= 0,039 tt= 2,160	ddl = 14 tc= 0,156 tt= 2,145	ddl = 12 tc= 0,003 tt= 2,179
	% de risque (p)	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>



**Tableau XIII** : Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la période du traitement par l'imidaclopride.

Lots des rats	Traités 1/85(30 jours) / traités 1/85 (60 jours)	Traités 1/120 (30 jours) / traités 1/120 (60 jours)	
<b>Poids absolu (g)</b>	Moyenne Et Ecartype	0,80 ± 0,11 / 0,53 ± 0,16	0,72 ± 0,08 / 0,59 ± 0,10
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 16 tc=0,90 tt= 2,120	ddl = 15 tc= 0,48 tt= 2,131
	% de risque (P)	P<0,05	P<0,05
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>
	<b>Poids relatif (g%)</b>	Moyenne Et Ecartype	0,44 ± 0,08 / 0,41 ± 0,12
L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau		ddl = 16 tc= 0,121 tt= 2,120	ddl = 15 tc=0,153 tt= 2,131
% de risque (p)		P<0,05	P<0,05
La différence		<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>

**Tableau XIV:** Signification statistique des différences des poids moyens des rates chez les rats traités par rapport à la dose et la période du traitement par l'imidaclopride.

		1/120 DL50 D'IMI / 1/85 DL50 D'IMI	
Poids absolu (g)	Lots des rats	30 jours /30 jours	60 jours / 60 jours
	M ± E	0,72 ± 0,08 / 0,80 ± 0,11	0,59 ± 0,10 / 0,53 ± 0,16
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 16 tc=0,29 tt= 2,12	ddl = 15 tc= 0,19 tt= 2,13
	% de risque (p)	<b>P&lt;0,05</b>	<b>P&lt;0,05</b>
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>
Poids relatif (g%)	M ± E	0,439 ± 0,059 / 0,448 ± 0,086	0,401 ± 0,063 / 0,412 ± 0,125
	L'écart réduit (t) Tc : T calculé Tt : T tableau	ddl = 16 tc= 0,03 tt=2,12	ddl = 15 tc=0,03 tt=2,13
	% de risque (p)	<b>P&lt;0,05</b>	<b>P&lt;0,05</b>
	La différence	<b>Non significative</b>	<b>Non significative</b>