

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA



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

Spécialité :

BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE, IMMUNOLOGIE
THEME

**CONTRIBUTION A LA RECHERCHE DES EFFETS DE DEUX
DOSES D'IMIDACLOPRIDE SUR L'ASPECT
MORPHOFONCTIONNEL DE LA THYROÏDE ET LA
STRUCTURE OVARIENNE CHEZ DES RATS DE SOUCHE
WISTAR**

Présenté par :

M^{lle} MAHBOUBI Yasmine

Soutenu le 26/12/2013

Devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------------|-------------|---------------------|
| Mme DEFFAIRI D. MAA | USDB | Présidente |
| Mme CHAKHMA A. MAA | USDB | Examinatrice |
| Mme ZATRA Y. MAA | USDB | Examinatrice |
| Mme SAADI L. MCB | USDB | Promotrice |

Promotion 2012-2013

REMERCIEMENTS

*Nous tenons à exprimer notre gratitude à notre promotrice **Mme SAADIL.**, Maitre de conférences au département de Biologie, de nous avoir donné l'opportunité de travailler sur un tel sujet, pour sa confiance, ses précieux conseils et son soutien. Madame, veuillez accepter nos remerciements les plus sincères.*

*Notre grande considération et nos vives reconnaissances vont au Professeur **ABDELALI M.** pour son accueil au sein du Service de Cytologie, sa compassion et sa compréhension. Sans oublier Mr Djamel pour sa confiance, son soutien ainsi que la sympathie qu'il nous a témoigné.*

*Nous remercions **Mme. DEFFAIRI D.**, Maitre assistante au département de Biologie, d'avoir accepté de présider le jury examinant ce manuscrit.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à **Mme CHAKHMA A.**, Maitre assistante au département de Biologie et à **Mme ZATRA Y.** Maitre assistante au département de Biologie, d'avoir accepté l'examen de ce travail. Vos remarques pertinentes contribueront sûrement à son perfectionnement.*

*Sans oublier **Mme Matallah R.**, Maitre assistante à l'ENS de Kouba, pour son aide tout au long de l'expérimentation.*

Enfin, nos remerciements vont à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin.

Nous pensons à nos enseignants, à nos proches et à nos amis.

RESUME

La recherche de la toxicité d'un insecticide néonicotinoïde, imidaclopride (IMI), chez les mammifères a fait l'objet de plusieurs études expérimentales. Notre présent travail a comme objectif la recherche de la toxicité par voie orale d'imidaclopride à raison de 1/85 et 1/120 DL50 mg/kg/j pendant 30 jours sur l'aspect morphofonctionnel de la thyroïde et la structure ovarienne chez des rates de souche Wistar.

Notre étude est portée sur 22 rates adultes réparties en trois groupes : un groupe témoins (n=5), un groupe traité à 1/85 DL50 (5,18) mg/kg/j d'IMI (n=10) et un autre groupe traité à 1/120 DL50 (3,67) mg/kg/j d'IMI (n=7). Après décapitation, le sang recueilli est destiné aux dosages des hormones thyroïdiennes et de la thyroïdostimuline par électrochimiluminescence, alors que les ovaires et la glande thyroïde sont fixés dans du Bouin aqueux afin de réaliser une étude histopathologique.

Le groupe traité à 1/85 DL50 d'IMI présente une diminution non significative du taux de FT4. Les taux plasmatiques en FT3 et en TSH restent cependant inchangés. L'étude histopathologique montre que l'organisation structurale du parenchyme ovarien est préservée contrairement au parenchyme thyroïdien qui présente d'importantes altérations chez toutes les rates traitées et plus accentuées chez le groupe traité à 1/85 DL50: Rétrécissement folliculaire, présence de follicules effondrés, disparition de colloïde ainsi que la présence de cellules folliculaires squameuses. En se basant sur les résultats histopathologiques révélés par les traitements à l'IMI, nous suggérons que la toxicité par voie orale de l'IMI est dose-dépendante et diffère selon les tissus et que la dose sans effet observable reste inférieure à 1/120 DL50 IMI (<3,67) mg/kg/j.

Mots clés : Imidaclopride, Rates de souche Wistar, Toxicité par voie orale, Dose sans effet observable, DL50.

ملخص

إن البحث عن مفعول سمية مبيد الحشرات إيميداكلوبريد عند الثدييات موضوع عدة دراسات تجريبية وبحثنا يتجه في نفس السياق لتقييم مفعول سمية الإيميداكلوبريد عن طريق التجريع الفموي ل 85/1 و DL50 120/1 مع/كغ/يوم لمدة 30 يوم على المظهر المورفولوجي الوظيفي للغدة الدرقية و بنية المبيضين عند إناث الجرذان من فصيلة Wistar .

شملت دراستنا 22 أنثى جرذان موزعة على ثلاثة أفواج: فوج شاهد (ن=5)، فوج مطعم بجرعة 85/1 DL50 (5,18) غ/كغ/يوم (ن=10) وفوج مطعم بجرعة DL50 120/1 (3,67) مع/كغ/يوم (ن=7) . بعد قطع رؤوسها يُلتقط الدم بهدف الكشف على التركيز البلازمي لهرمونات الغدة الدرقية و لثيروتروبين, أما المبيض و الغدة الدرقية فتتثبتا في محلول البوان لإنجاز دراسة نسيجية مرضية.

أظهر الفوج المطعم بجرعة 85/1 DL50 مع/كغ/يوم إنخفاض غير معنوي لتركيز FT4 في حين أن تركيزي FT3 و TSH لم يشهدا أي تغيير. بينما أظهرت الدراسة النسيجية محافظة المبيض على نظامه الهيكلي، على عكس النسيج الدرقي الذي بيّن وجود إتلافات مهمة عند كلتا الفوجين المعالجين وأكثر حدة لدى المجموعة المُطعمّة بجرعة 85/1 DL50 مع/كغ/يوم :إنكماش و إنهيارالجريبات، فقدان المادة الغروية و ظهور خلايا متقرنة . إعتادا على النتائج الدراسة النسيجية المرضية الناجمة عن التزقيم بالإيميداكلوبريد نقترح أن سمّيته تعتمد على الجرعة المستعملة وطبيعة النسيج المدروس وأن الجرعة ذات التأثير غير الظاهر أقل من 120/1 (>3,67) DL50 مع/كغ/يوم.

كلمات المفتاح : إيميداكلوبريد ; سمّية عن طريق التجريع الفموي ; إناث الجرذان البالغة ; الجرعة ذات التأثير غير الظاهر.

Abstract

The searching for the toxicity of imidacloprid insecticide at the mammalian was the subject of many experimental studies. The objective of our study is to evaluate the effect of 30 days oral imidacloprid toxicity at 1/85 LD50 and 1/120 LD50 mg/kg/day on morphofunctional aspect of the thyroid and ovarian structure on Wistar female rats.

Our experiment was conducted on 22 female rats distributed on three groups: group control (n=5), a group treated at 1/85 LD50 (5,18) mg/kg/day (n=10) and another group treated at 1/120 LD50 (3,67) mg/kg/day (n=7) of imidacloprid. After decapitation, the blood collected is used to thyroid hormones and thyrotropin dosages by electrochemeluminescence. Ovarian and thyroid gland were fixed in aqueous Bouin's solution to achieve a histopathological investigation.

The group treated with 1/85 LD50 IMI has a non-significant decrease in FT4 level while FT3 and TSH levels remain unchanged. Histopathological study shows that the structural organization of the ovarian parenchyma is preserved unlike the thyroid parenchyma show significant alterations in all treated rats which are more pronounced in the 1/85 LD50 IMI treated group: Shrinkage of follicles, presence of collapsed follicles, loss of colloids and the presence of follicular squamous cells. Based on histopathological findings revealed by treatment with IMI, we suggest that the oral toxicity of IMI is dose-dependent and differs depending on the tissue and the no observable adverse effect level remains below 1/120 LD50 IMI (<3,67) mg/kg/day.

Keywords: Imidacloprid; Adult female Wistar rats; oral toxicity; no observable adverse effect level, LD50.

LISTE DES FIGURES

| | | |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Figure 1</u> : | Effet de 1/85 DL50 et 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours sur le poids corporel des rats femelles. | 18 |
| <u>Figure 2</u> : | Valeurs moyennes de la concentration plasmatique de la triiodothyronine libre (pmol/) chez les rats femelles adultes témoins et traités à 1/85 DL50 l'IMI | 19 |
| <u>Figure 3</u> : | Valeurs moyennes de la concentration plasmatique de la thyroxine libre (pmol/) chez les rats femelles adultes témoins et traités à 1/85 DL50 l'IMI | 20 |
| <u>Figure 4</u> : | Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins. Grossissement : X40 zoomé (a) X400 zoomé (b) ; Coloration : HE (a) et (b) | 24 |
| <u>Figure 5</u> : | Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins. Grossissement : X100 zoomé (a), (b), (c), et (d) X400 zoomé (e) ; Coloration : HE | 25 |
| <u>Figure 6</u> : | Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins. Grossissement : X100 zoomé (a) X400 (b) ; Coloration : Azan de Heidenhain(a), HE (b). | 26 |
| <u>Figure 7</u> : | Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/85 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement : X40 zoomé (a) et (b) X100 (c) ; Coloration : HE (a) et (c) ; Azan de Heidenhain (b). | 27 |
| <u>Figure 8</u> : | Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins (a), (c) et (e) et traitées avec 1/85 DL50 d'imidaclopride (b), (d) et (f). Grossissement : X400 zoomé (a) et (b) X100 zoomé (c), (d), (e) et (f) ; Coloration : HE | 28 |
| <u>Figure 9</u> : | Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/85 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement : X100 zoomé ; Coloration : HE (a) et (b) ; Trichrome de Masson variante Goldner (c) | 29 |
| <u>Figure 10</u> : | Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/120 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement : X40 zoomé (a), (b) et (c) ; Coloration : HE (a) et (b) ; Azan de Heidenhain © | 30 |

- Figure 11 :** Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins (a), (c) et (e) et traitées avec 1/120 DL50 d'imidaclopride (b), (d) et (f). Grossissement : X400 zoomé (a) et (b) X100 zoomé (c), (d), (e) et (f) ; Coloration : HE 31
- Figure 12 :** Structure du parenchyme ovarien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/120 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement : X100 zoomé (a), (b) et (c) ; Coloration : HE (a) et (b), Azan de Heidenhain (c) 32
- Figure 13 :** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates témoins. Grossissement: X100 (a) X400 (b) X1000 (c) ; Coloration: HE 34
- Figure 14 :** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/85 DL50 d'imidaclopride (b). Grossissement: X100 zoomé ; Coloration: HE (a) ; Trichrome de Masson variante Goldner (b) 35
- Figure 15 :** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/85 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement: X100 zoomé (a) et (b) X400 (c) ; Coloration: HE (a) et (c) ; Trichrome de Masson variante Goldner (b) 36
- Figure 16:** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/85 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement: X400 zoomé ; Coloration: HE (a) ; Trichrome de Masson (c) variante Goldner (b) 37
- Figure 17 :** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/85 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement: X400 zoomé ; Coloration: HE 38
- Figure 18 :** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/120 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement: X400 zoomé ; Coloration: HE (a) et (b) ; Trichrome de Masson variante Goldner (c) 39
- Figure 19 :** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates traitées avec 1/120 DL50 d'imidaclopride. Grossissement: X100 (a) X400 (b) X400 zoomé (c) ; Coloration: HE (a) et (b) ; Trichrome de Masson variante Goldner(c) 40
- Figure 20 :** Structure du parenchyme thyroïdien chez les rates témoins (a) et traitées avec 1/120 DL50 d'imidaclopride (b) et (c). Grossissement: X100 zoomé ; Coloration: HE (a) ; Trichrome de Masson variante Goldner (b) 41

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <u>Tableau I</u> : | Propriétés physicochimiques de l'imidaclopride | Annexe 1 |
| <u>Tableau II</u> : | Composition des bouchons alimentaires | Annexe 1 |
| <u>Tableau III</u> : | Concentration plasmatique moyenne de la thyroestimuline ($\mu\text{UI/l}$) chez les rats femelles témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI. | Page 21 |
| <u>Tableau IV</u> : | Valeurs des poids corporels (g) des rats femelles adultes témoins et traités avant et après l'expérimentation. | Annexe 2 |
| <u>Tableau V</u> : | Valeurs moyennes des poids corporels (g) chez les rats femelles adultes témoins et traités et leur signification. | Annexe 2 |
| <u>Tableau VI</u> : | Gain du poids corporel en pourcentage (P%). | Annexe 2 |
| <u>Tableau VII</u> : | Valeurs des taux plasmatiques de la thyroestimuline (TSH), de la triiodothyronine libre (FT3) et de la thyroxine libre (FT4) chez les rats femelles adultes témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI. | Annexe 2 |
| <u>Tableau VIII</u> : | Valeurs moyennes de la thyroestimuline (TSH), de la triiodothyronine libre (FT3) et de la thyroxine libre (FT4) chez les rats femelles adultes témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI et leur signification. | Annexe 2 |
| <u>Tableau IX</u> : | Valeurs moyennes de la thyroestimuline (TSH), de la triiodothyronine libre (FT3) et de la thyroxine libre (FT4) chez les rats femelles adultes témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI et leur signification. | Annexe 2 |
| <u>Tableau IX</u> : | Table de Student. | Annexe 1 |
| <u>Tableau X</u> : | Table des Dilution des alcools (d'après la table de GAY-LUSSAC). | Annexe 1 |

LISTE DES ABBREVIATIONS

| | |
|---------------|---------------------------------|
| AH | Azan de Heidenhain |
| CAS | Chemical Abstracts Service |
| ddl | Degré de liberté |
| DJA | Dose Journalière admissible |
| DL50 | Dose létale médiane |
| FT3 | Triiodothyronine libre |
| FT4 | Thyroxine libre |
| H&E | Hematoxyline-éosine |
| HENRY | Constante de la loi de Henry |
| IL | Interleukine |
| IMI | Imidaclopride |
| nAChR | Récepteurs de l'acétyle choline |
| NOAEL | Dose sans effet toxique |
| NOEL | Dose sans effet |
| p | Pourcentage de risque |
| pmol | pico mol |
| TNF- α | Tumor necrosis factor α |
| tc | t tabulé |
| TSH | thyroestimuline |
| tt | t calculé |

GLOSSAIRE

Ad libitum : une locution latine qui signifie « à volonté »

CAS : Numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données de Chemical Abstracts Service (CAS).

Clastogène : une substance susceptible de provoquer des ruptures dans une molécule d'ADN, c'est-à-dire une aberration chromosomique.

Crossing-over : une recombinaison réciproque entre deux chromosomes homologues au cours de la méiose.

Demi-vie (DT50) : Temps nécessaire à la dégradation ou à l'inactivation dans le sol ou dans l'eau de 50 % de l'herbicide.

Dose létale 50 : La **dose létale** pour que 50% de la population animale testée meure. Elle dépend de l'espèce animale.

Henry "H" : Constante de la loi de Henry (à température constante et à saturation, la quantité de gaz dissous dans un liquide est proportionnelle à la pression exercée par ce gaz sur le liquide).

Rhabdomyolyse : désigne une situation dans laquelle des cellules des muscles squelettiques, se dégradant rapidement, libérant ainsi contenu dans la circulation sanguine

Tétanie: Syndrome caractérisé par un état permanent d'hyperexcitabilité neuromusculaire, se traduisant par des accès de contractures musculaires localisées surtout aux extrémités des membres.

Métaplasie squameuse : Transformation d'un tissu cellulaire différencié en un autre tissu cellulaire différencié. Il s'agit d'un phénomène adaptatif et réversible qui se produit le plus souvent en réponse à une agression tissulaire répétée et prolongée. La structure et la fonction du nouveau tissu sont strictement normales.

SOMMAIRE

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUCTON | 1 |
| CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES | |
| I.1. GENERALITES SUR L'IMIDACLOPRIDE | 3 |
| I.1.1. Mode d'action | 3 |
| I.1.1. Devenir de l'imidaclopride dans l'environnement | 4 |
| I.2. PROFIL TOXICOLOGIQUE | 4 |
| I.2.1. Pharmacocinétique | 4 |
| I.2.2. Toxicité aiguë | 5 |
| I.2.3. Toxicité subchronique | 5 |
| I.2.4. Toxicité chronique | 6 |
| I.2.5. Génotoxicité et oncotoxicité | 6 |
| I.2.6. Toxicité sur la reproduction | 6 |
| I.2.7. Immunotoxicité developpementale | 7 |
| I.2.8. Neurotoxicité | 7 |
| I.2.9. Ecotoxicité | 7 |
| I.3. ETUDES RECENTES SUR LES EFFETS DE L'IMIDACLOPRIDE | |
| CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES | |
| II.1. MATERIEL | 9 |
| II.1.1. Animaux et régime | 9 |
| II.1.2. Insecticide | 9 |
| II.2. METHODES | 11 |
| II.2.1. Expérimentation | 11 |
| II.2.2. Sacrifice des animaux | 11 |
| II.2.3. Prélèvement des échantillons | 12 |
| II.2.4. Dosage des hormones thyroïdiennes | 13 |
| II.2.5. Dosage de la thyroestimuline | 14 |
| II.2.6. Etude histologique | 17 |
| II.2.7. Calculs statistiques | 17 |

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS 18

III.1.1. Evolution pondérale 18

III.1.2. Dosage des hormones 19

III.1.3. Etude histopathologique 22

III.1.3.1. Parenchyme Ovarien 22

III.1.3.2. Parenchyme thyroïdien 33

III.2. DISCUSSION 42

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 45

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les pesticides constituent le groupe de produits chimiques le plus important en agriculture visant à prévenir, détruire, repousser ou réprimer tout ravageur (Mencke et Jeschke, 2002). Cependant, ces substances ont la capacité de pénétrer dans l'organisme par une multiplicité de voies d'entrée (contact cutané, ingestion et inhalation). Les agriculteurs et les personnes manipulant les pesticides représentent la population la plus exposée et courent des risques d'accident et d'empoisonnement, puis vient la population confrontée aux résidus de ces produits à travers l'alimentation et l'environnement (Al-Sayida, 2007).

L'imidaclopride, (IMI) [1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-lideneamine), est un insecticide néonicotinoïde qui était largement utilisé dans le monde (Chao et Casida, 1997 ; Demsia et *al.*, 2007). Depuis sa mise sur le marché au début des années 1990 par la société « Bayer », divers problèmes affectant les colonies d'abeilles lui ont été associés. En Algérie, l'IMI est utilisé sur les cultures maraîchères, les arbres fruitiers et même les plantes d'ornementation (Djouber, 2011).

En Europe, cet insecticide a causé beaucoup de controverses ces dernières années. Plusieurs études ont été réalisées afin de vérifier les dommages induits chez les colonies d'abeilles (Laramée, 2007). De ce fait, l'utilisation de l'imidaclopride en France a été bannie en 1999 pour les cultures de tournesol et en 2004 pour les cultures de maïs. Mais ce n'est qu'en 2008 que l'Allemagne a suspendu l'utilisation de l'IMI dans le traitement de semences. Par la suite, l'Italie a adopté cette restriction en 2009 par mesure de précaution. Alors qu'aux Etats Unies, son utilisation a été simplement limitée aux agrumes en 2011 (Watts, 2011). Par ailleurs, 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 études expérimentales ont confirmé l'implication de l'IMI dans l'apparition des lésions tissulaires, des irritations gastro-intestinales, des symptômes neurologiques et même la mort de l'animal (Bhardwaj et *al.*, 2010 ; Yeh et *al.*, 2010 ; Kapoor et *al.*, 2011). Ainsi, le groupe de Bhardwaj en 2010, a considéré les 10 mg/kg/jour d'IMI comme une dose sans effet observable chez les rates albinos.

Parallèlement, les travaux menés au sein de notre laboratoire ont confirmé la présence d'altérations structurales au niveau de différents parenchymes : pulmonaire (Boukersi, 2012, Arkame, 2013), hépatique (Boukenoui et Mahboubi, 2010 ; Kerkar et Kheldoun, 2010 ; Agoud, 2013), thyroïdien (Boudegzdame, 2013), rénal (Aourag, 2013). Ces altérations sont associées aux perturbations hormonales (Boudegzdame, 2013) et biochimiques (Kerkar et Kheldoun, 2010) chez des rates albinos traitées par plusieurs doses faibles d'imidaclopride, Confidor, à savoir les 1/10, 1/15, 1/20 et 1/40 DL50 pendant différentes périodes.

Poursuivant nos études sur la recherche de la dose la plus faible d'IMI et sans effet néfaste chez les rates, le présent travail a pour but de rechercher les effets des doses 1/85 et 1/120 DL50 administrées par voie orale. Deux organes sont choisis, les ovaires et la glande thyroïde, afin de réaliser ce travail qui comporte trois chapitres. Le premier est consacré à la présentation d'une synthèse bibliographique sur la toxicité de l'imidaclopride. Le deuxième décrit le matériel et les méthodes utilisés. Le troisième chapitre est consacré aux résultats et discussion. Une conclusion générale et des perspectives sont proposées à la fin de ce travail.

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. GENERALITES SUR L'IMIDACLOPRIDE

L'imidaclopride, 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-ylideneamine, est un insecticide néonicotinoïde qui appartient à la famille chimique des chloronicotinylnitroguanidine (Suchail et *al.*, 2009). Les propriétés physicochimiques de la molécule sont illustrées dans le tableau I de l'annexe 1.

Différentes nominations commerciales lui sont associées dont Admire®, Acidor® (Agro Chemical Industries), Gaucho®, Genesis®, Prescribe® (Gustafson LLC), Marathon® (Olympic Horticultural Products), Confidate®, Imadate® (ChemHandbook, 2002).

En Algérie, l'imidaclopride est commercialisée sous le nom de Confidor® sur les cultures maraîchères, les arbres fruitiers et même les plantes d'ornementation (Djouber, 2011).

I.1.1. Mode d'action

L'imidaclopride (IMI) a été conçu pour être efficace aussi bien par contacte dermique que par ingestion (Tomlin, 2006). Il agit sur plusieurs types de récepteurs nicotiques post-synaptiques de l'acétylcholine dans le système nerveux (Buckingham et *al.*, 1997 ; Matsuda et Sattelle, 2005). La liaison irréversible aux récepteurs conduit à la décharge des impulsions nerveuses et l'absence de propagation de signal par les neurones (Schroeder et Flattum, 1984 ; Larry, 2001). L'activation soutenue des récepteurs résulte de l'incapacité de l'acétylcholinestérase à dégrader le pesticide (Matsuda et Sattelle, 2005).

Chez les mammifères, les récepteurs nicotiques sont divisés en plusieurs sous-types et sont localisés aussi bien au niveau de la jonction neuromusculaire que dans le système nerveux central (Larry, 2001). Cependant, l'affinité de l'IMI est beaucoup plus élevée chez les insectes que chez les mammifères (Tomizawa et Casida, 1999 ; Alok et *al.*, 2013).

I.1.2. Devenir de l'imidaclopride dans l'environnement

Les principales voies de dissipation de l'IMI dans l'environnement sont la photolyse en milieu aqueux, la dégradation microbienne (Fritz et Hellpointer, 1991) et l'absorption par les plantes (Scholz, 1992). L'IMI est rapidement photodégradé dans l'eau (demi-vie de 4 heures) (Anderson, 1991) par rapport au sol (demi-vie de 171 jours). Il est stable à l'hydrolyse à un pH normal, tandis qu'il est lentement hydrolysé dans les solutions alcalines stériles (Yoshida, 1990). La présence de végétation augmente considérablement son taux de dégradation dans le sol (Scholz, 1992). L'IMI est modérément mobile dans le sol et sa forte persistance engendre une contamination des eaux de surface par le ruissellement (MAPAQ et al., 2012).

I.2. PROFIL TOXICOLOGIQUE DE L'IMIDACLOPRIDE**I.2.1. Pharmacocinétique**

L'imidaclopride est rapidement absorbé par voie orale et réparti dans presque tous les organes et les tissus (Larry, 2005). Son absorption par voie orale a été estimée à 92-99% chez le rat (Brunet et al., 2004).

Il existe deux principales voies métaboliques de l'IMI chez les mammifères (Klein et Brauner, 1990). La première consiste en un clivage oxydatif de l'imidazolidine et de l'acide 6-chloronicotinique, avec excrétion urinaire du fragment de l'imidazolidine. Le fragment nicotinique est dégradé par conjugaison du glutathion à un dérivé d'acide mercapturique, puis à l'acide méthylmercaptotonicotinique, qui est conjugué avec de la glycine pour former de l'acide hippurique avant son excrétion dans l'urine. La seconde étape de cette voie de dégradation consiste en une hydroxylation de l'anneau d'imidazolidine, suivie de l'élimination de l'eau et la formation d'un métabolite insaturé (Klein et Brauner, 1991a,b ; Karl et al., 1991 ; Klein, 1992).

La capacité de l'IMI à pénétrer les tissus a été mise en évidence après l'administration orale de 20 mg/kg d'IMI marqué au C¹⁴. La radioactivité a été détectée dans les 13 tissus et organes testés dont le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins, les poumons et le cœur (Klein, 1987 ; Klein et Brauner, 1991a).

L'injection par voie intraveineuse de 20 mg/kg d'IMI marqué au C¹⁴a aussi mis en évidence une augmentation de la radioactivité dans le foie, les reins, les muscles, les glandes (surrénales, thyroïde et salivaire) et le tissu conjonctif de la peau et la moelle épinière (Klein, 1987). La radioactivité a également été dosée dans le système nerveux central, ce qui indique que l'imidaclopride et ses métabolites ont pénétré la barrière hémato-encéphalique (Klein, 1987).

Plus de 90% de la dose est éliminée dans les 24h, avec excrétion totale en 48h; 80% de la dose est excrétée dans l'urine sous forme de glutathion et de glycine conjugués à l'acide mercaptonicotinique et à l'acide hippurique. Les 20% restants sont éliminés dans les fèces (Larry, 2005).

I.2.2. Toxicité aiguë

L'imidaclopride est modérément toxique. La DL50 par voie orale est de 450 mg/kg de poids corporel chez le rat (Meister, 1995) et de 131 mg/kg chez la souris (Kidd et James, 1994). Il est considéré non irritant pour les yeux et la peau (lapins), et sans effet pour les cobayes. Concernant la toxicité par inhalation chez le rat, la CL50 aéroportée de l'imidaclopride est > 69 mg/m³ d'air sous forme d'aérosol, et > 5323 mg/m³ d'air sous forme de poussière. Ces valeurs représentent les concentrations auxquelles les symptômes d'empoisonnement aéroportés possibles sont maximaux (Kidd et James, 1994).

Une exposition aiguë par voie orale de rats et de souris à l'imidaclopride a provoqué des signes cliniques caractéristiques de l'intoxication par la nicotine, tels qu'une coloration de l'urine, des troubles de la coordination, des tremblements, des spasmes et des difficultés respiratoires. D'autres symptômes comprennent une diminution de l'activité et une léthargie (Bomann, 1989a). Les mêmes signes cliniques ont été observés chez des rats après une exposition de 4 heures à l'imidaclopride en aérosol (Pauluhn, 1988a).

Il a été reporté, suite à une inhalation accidentelle de l'IMI, qu'un fermier a manifesté des troubles respiratoires sévères ainsi que des symptômes gastro-intestinaux et neuropsychiatriques (Alok et al., 2013).

I.2.3. Toxicité subchronique

Les lapins traités à l'IMI pendant 3 semaines n'ont manifestés aucun effet local ou général à des niveaux allant jusqu'à 1000 mg/kg. Alors que chez rats, l'inhalation pendant 4 semaines a induit une diminution de la prise de poids corporel et des organes (Arla, 2001).

I.2.4. Toxicité chronique

Selon Eiben (1991), l'intoxication à de faibles doses d'IMI durant 24 mois a entraîné des modifications des dosages sériques et une diminution du poids corporel chez le rat. Différents types de tumeurs ont été signalés chez la souris avec une incidence fréquente du foie et de la glande thyroïde (Bomhard et Rinke, 1994).

Chez le chien, La consommation alimentaire a diminué de 9-14% chez les femelles traitées accompagnée d'une élévation du taux de 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.2.5. Génotoxicité et oncotoxicité

L'imidaclopride semble induire d'éventuelles oncotoxicité et tératogénicité chez le rat (CDPR, 2011). L'étude de l'exposition subchronique de l'IMI à faibles doses sur des lapins a révélé son effet génotoxique 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 sur 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).

Chez *Bacillus subtilis* (Watanabe, 1990) et *Saccharomyces cerevisiae* souche D7, l'IMI n'a provoqué ni conversion génique mitotique ni crossing-over (Herbold, 1988b).

I.2.6. Toxicité sur la reproduction

Chez le rat mâle adulte, des perturbations de l'indice d'accouplement et une réduction de la viabilité des spermatozoïdes ainsi que la fertilité ont été observés (Najafi et al., 2010 ; Ramazan et al., 2012)

I.2.7. Immunotoxicité développementale

Gawade et al. (2013) ont suivi l'index phagocytaire, l'hémagglutination et la production d'immunoglobulines chez les femelles gestantes du rat Wistar et ont clairement conclu que l'immunotoxicité développementale de l'IMI est liée à l'âge et à la dose ingérée.

I.2.8. Neurotoxicité

Les effets aigu et subchronique de l'imidaclopride sur le système nerveux ont été mis en évidence à partir des changements comportementaux du rat dont une diminution de l'activité motrice, des tremblements, une diminution de la réponse aux stimuli, une diminution du réflexe de redressement et une hypothermie (Tomizawa et al., 2001; Shimomura et al., 2002).

I.2.9. Ecotoxicité

Chez les espèces aviaires, l'imidaclopride provoque des troubles gastro-intestinaux transitoires, des nausées et de l'ataxie (Larry, 2005).

Chez les organismes aquatiques, l'imidaclopride est légèrement toxique pour *Daphnia magna*, modérément toxique pour les poissons (truite dorée, câpre et cyprin doré) et fortement toxique pour d'autres invertébrés aquatiques (Larry, 2005).

L'imidaclopride est aussi très toxique pour les abeilles lorsqu'il est utilisé en application foliaire, en particulier pendant la floraison (Larry, 2005).

I.3. ETUDES RECENTES DES EFFETS DE L'IMIDACLOPRIDE

Les études de la toxicité de l'imidaclopride sur les souris à 5 et 10 mg/kg/j ont révélé une réduction de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ainsi que des congestions splénique, hépatique, rénale et pulmonaire. Cette toxicité est associée à une déplétion lymphocytaire et une augmentation du nombre de neutrophiles (Badgujar et *al.*, 2013).

Les effets de l'exposition subchronique et chronique des rats à l'IMI se sont avérés dose-dépendants. En effet, EL-Gendy et *al.* (2010), ont rapporté que l'activité antioxydante est augmentée dans le cas d'une exposition de 90 jours à raison de 1/10 DL50 d'imidaclopride. Par la suite, Harmandeep et *al.* (2013) ont montré que le traitement pendant 30 jours à cette même dose provoquait une dilatation de la veine centrale et des capillaires sinusoides au niveau du foie.

Aussi, Duzguner et Erdogan (2012) ont démontré que des doses répétées de 1mg/kg/j seulement, causent une inflammation dans le foie et le système nerveux central, une altération du système antioxydant et une production de cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumoral (TNF- α), interleukine (1b, 16, IL-12)) ainsi que la transcription accrue des isoformes d'oxide nitrique synthase (**iNOS**).

A une dose plus importante (à raison de 20 mg/kg/j pendant 90 jours), l'imidaclopride a induit une augmentation des poids du foie, des reins, des surrénales, une diminution du poids des ovaires, une nécrose des cellules de Purkinji, 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).

L'éventuelle toxicité chronique de l'imidaclopride sur la fertilité des rats mâles a aussi fait l'objet de l'étude de Ramazan et *al.* (2012), qui ont affirmé que des doses de 0.5, 2 et 8 mg/kg/j provoquent une diminution des concentrations en spermatozoïdes dans l'épendyme, du taux de testostérone et une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux.

Najafi et *al.* (2010) ont également mentionné 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.

Chez l'Homme, malgré le profil d'innocuité qu'ont attribué les études de Tomizawa et Casida en 2003 et 2005 à l'imidaclopride, avec un taux de létalité nulle chez les patients intoxiqués (MOHAMEDI et *al.*, 2009). D'autres publications ont décrit des rhabdomyolyses, des manifestations neuropsychiatriques (Agarwal et Srinivas, 2007), une fibrillation ventriculaire (HUANG et *al.*, 2006), et même des décès suite à son ingestion (Huang et *al.*, 2006 ; Shadnia et Moghaddam, 2008).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

Notre étude touche l'évaluation de la toxicité orale de deux faibles doses d'imidaclopride (1/85 DL50 et 1/120 DL50) pendant 30 jours sur les activités thyroïdienne et ovarienne chez des rats femelles adultes de souche Wistar. Ce travail est réalisé au niveau de la station expérimentale de la Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et aux laboratoires de Projet de Fin d'Etudes du département de Biologie et d'Histologie du service de Cytologie (CHU Hussein Dey).

II.1. MATERIEL

II.1.1. Animaux et régime

L'expérimentation est réalisée sur 22 rats femelles adultes de souche Wistar de poids corporel moyen de 128,16 g. Dès leur arrivée à l'animalerie depuis l'institut Pasteur de Kouba, Alger, les rats ont été soumis à une période d'acclimatation, pendant 7 jours, à température ambiante et à une photopériode alternée de 12 heures d'obscurité suivie de 12 heures de lumière artificielle. L'alimentation (Tableau II de l'annexe 1) et l'eau sont fournies "*ad-libitum*".

II.1.2. Insecticide

L'imidaclopride, insecticide commercialisé sous forme de solution concentrée (200 mg/ml) est usité sous forme diluée selon la dose utilisée le long de l'expérimentation. Le calcul des concentrations utilisées se fait comme suit :

A partir de la DL50 qui est de 440 mg/kg/jour chez le rat Wistar (LARAMEE, 2007), nous avons calculé les deux doses d'intérêts :

II.1.2.1. Première dose

Nous avons calculé la première dose, qui est de 1/85 DL50 d'IMI :

$$\begin{array}{l} \text{DL50} \quad \longrightarrow \quad 440 \text{ mg/kg} \\ \text{1/85 DL50} \quad \longrightarrow \quad x_1 \end{array} \quad x_1 = 440/85 = 5,176 \text{ mg/kg}$$

| |
|------------------------------------------------------|
| $x_1 = 1/85 \text{ DL50 IMI} = 5,176 \text{ mg /kg}$ |
|------------------------------------------------------|

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

$$\begin{array}{lcl}
 200 \text{ mg} & \longrightarrow & 1 \text{ ml} \\
 5,176 \text{ mg} & \longrightarrow & x'_1
 \end{array}
 \qquad
 x'_1 = (5,176 \times 1) / 200 = 0,02585 \text{ ml}$$

$$x'_1 = \text{volume de } 1/85 \text{ DL50 IMI} = 0,02585 \text{ ml}$$

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

Exemple : Si le poids corporel est de 175g la dose administrée sera par conséquent :

$$\begin{array}{lcl}
 0,02585 \text{ ml} & \longrightarrow & 1000 \text{ g} \\
 x''_1 & \longrightarrow & 175 \text{ kg}
 \end{array}
 \qquad
 x''_1 = (175 \times 0,02585) / 1000 = 0,0045 \text{ ml}$$

$$x''_1 = \text{volume de } 1/85 \text{ DL50 IMI administré} = 0,0045 \text{ ml}$$

II.1.2.2. Deuxième dose

La deuxième dose est de 1/120 DL50 IMI :

$$\begin{array}{lcl}
 \text{DL50} & \longrightarrow & 440 \text{ mg/kg} \\
 1/120 \text{ DL50} & \longrightarrow & x_2
 \end{array}
 \qquad
 x_2 = 440 / 120 = 3,666 \text{ mg/kg}$$

$$x_2 = 1/120 \text{ DL50 IMI} = 3,666 \text{ mg /kg}$$

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

$$\begin{array}{lcl}
 200 \text{ mg} & \longrightarrow & 1 \text{ ml} \\
 3,666 \text{ mg} & \longrightarrow & x'_2
 \end{array}
 \qquad
 x'_2 = (3,666 \times 1) / 200 = 0,01833 \text{ ml}$$

$$x'_2 = \text{volume de } 1/120 \text{ DL50 IMI} = 0,01833 \text{ ml}$$

II.1.3. Appareillage et réactifs (annexe 1)**II.2. METHODES****II.2.1. Expérimentation**

Les rats utilisés au cours de l'expérimentation sont répartis en 3 lots :

- Un lot de rats témoins (n=5) gavés uniquement avec de l'eau distillée pendant 30 jours.
- Un deuxième lot de rats (n=10) gavés avec 1/85 DL50 d'IMI pendant 30 jours.
- Un troisième lot de rats (n=7) gavés avec 1/120 DL50 d'IMI pendant 30 jours.

L'administration du produit est réalisée quotidiennement par gavage afin d'assurer une prise maximale, homogène et constante du principe actif. Les animaux de chaque lot sont individuellement pesés chaque semaine et le poids corporel est enregistré le long du traitement afin de suivre l'évolution de la masse corporelle et de réduire l'effet du stress durant le gavage.

II.2.2. Sacrifice des animaux

Après la fin de la période de traitement, les animaux sont pesés, anesthésiés par inhalation de chloroforme, puis sacrifiés par décapitation et cela la matinée de 9h à 11h afin d'éviter les variations hormonales pendant la journée.

II.2.3. Prélèvement des échantillons

Le sang artério-veineux des animaux traités avec 1/85 DL50 d'IMI est recueilli dans des tubes contenant 10% de l'acide Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA) et est destiné pour le dosage des hormones thyroïdiennes (FT3 et FT4) et de la thyroïdostimuline (TSH). Le plasma est obtenu après une centrifugation à 3000 tours pendant 20 minutes.

La thyroïde et les ovaires sont rapidement prélevés, dégraissés, pesés et placés dans un liquide fixateur «le Bouin aqueux» afin de chercher ultérieurement les altérations structurales

II.2.4. Dosage des hormones thyroïdiennes**a-Principe**

La détermination quantitative *in vitro* de la triiodothyronine libre (FT3) et de la thyroxine libre (FT4) dans le plasma humain est réalisée par l'électrochimiluminescence (ECLIA) utilisée sur les automates Elecsys 1010 mettant en jeu le principe de compétition.

La mise en évidence de la FT3 et de FT4 avec le test Elecsys est réalisée à l'aide des anticorps (anti-T3 et anti-T4, respectivement) marqués au Ruthénium. Ainsi, l'échantillon à analyser est mis en présence de ces derniers. D'autre part, la T3 ou la T4 marquée à la biotine ainsi que les microparticules tapissées de streptavidine viennent se fixer sur les sites encore disponibles de l'anticorps marqué au ruthénium. Il se forme un complexe haptène-anticorps. Le complexe est fixé à la phase solide par une liaison biotine-streptavidine. Les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. La fraction libre est éliminée. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

b- Lecture

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code barre du réactif. L'analyseur calcule automatiquement la concentration de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en pmol/L, pg/ml ou ng/dl.

II.2.5. Dosage de la thyroestimuline**a-Principe**

La détermination de la thyroestimuline (TSH) dans le plasma humain est réalisée par l'électrochimiluminescence (ECLIA) utilisée sur les automates Elecsys 1010. Le test Elecsys TSH utilise un anticorps monoclonal spécifique de la TSH. C'est la méthode de sandwich qui est utilisée.

L'échantillon à analyser ml est mis en présence d'un anticorps monoclonal anti-TSH spécifique biotinylé et d'un anticorps monoclonal anti-TSH spécifique marqué au ruthénium. Il se forme un « sandwich ». Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine. Les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. La fraction libre est éliminée. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.

b- Lecture

Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code barre du réactif. L'analyseur calcule automatiquement la concentration de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en pmol/l, pg/ml ou ng/dl.

II.2.6. Etude histologique (GABE, 1968)

II.2.6.1. Fixation et rinçage

Cette étape a pour but d'immobiliser les structures en respectant dans la mesure du possible leur morphologie, de les conserver et de permettre la confection de préparation permanente. La fixation des organes est réalisée dans le « Bouin aqueux » pendant 48 heures. Les pièces sont ensuite lavées pendant 24 heures à l'eau courante renouvelée plusieurs fois avant la déshydratation.

II.2.6.2. Déshydratation et éclaircissement

Les pièces sont imprégnées 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.2.6.3. Imprégnation

Dans une étuve réglée à 58°C, les pièces sont imprégnées dans deux bains successifs d'une heure chacun: le premier bain de 50% de xylène et 50% de paraffine pure dissoute et le deuxième bain comprenait de la paraffine pure.

II.2.6.4. 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 lesquelles est inscrit l'état de l'organe de l'animal et son sexe.

-Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 7 minutes.

II.2.6.5. Confection des coupes

Les blocs obtenus sont coupés au microtome « type Leica » avec une épaisseur de 5µm.

II.2.6.6. Collage des rubans des coupes et leur séchage

Les rubans des coupes sont étalés dans un bain d'eau thermostatée (37°C) puis récupérés et collés sur les lames gélatinées et ensuite séchées dans l'étuve à 37°C pendant de 24 à 48 heures.

II.2.6.7. Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène pendant 2 minutes chacun. L'hydratation a pour objet de retirer le xylène du tissu et le remplacer par l'eau. Les pièces sont passées dans trois bains d'éthanol décroissant : 100° ; 96° ; 70° d'une durée de quelques secondes chacun. Elles sont enfin lavées à l'eau courante.

II.2.6.8. Coloration

La préparation des différents réactifs utilisés lors de cette étape est détaillée dans l'annexe 1.

➤ La coloration à hématoxyline-éosine est réalisée selon les étapes suivantes :

- Coloration à l'hémalum de Hansen pendant 3 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 xylène.

Résultats : les noyaux sont colorés en violet et les cytoplasmes en rose

➤ La coloration au Trichrome de Masson selon Goldner est réalisée comme suit :

- Coloration par l'hématoxyline de Groat pendant 2 minutes ;
- Lavage à l'eau courante 5 minutes ;
- Colorer par le mélange fuschine-ponceau 5 secondes ;
- Rinçage à l'eau acétifiée ;
- Traitement par l'orange G-acide phosphomolybdique pendant 5 minutes ;
- Rinçage à l'eau acétifiée ;
- Coloration par le bleu d'aniline pendant 5 minutes ;
- Déshydratation par l'alcool absolu, éclaircissement et montage.

Résultats : les noyaux sont colorés en brun-noir, la teinte des cytoplasmes va du rouge au verdâtre, les hématies prennent une coloration jaune, les fibres collagènes et sont colorés en bleu.

➤ La coloration à l'azan de Heidenhain :

- Coloration par la solution aqueuse saturée d'azocarmin G préalablement portée à 60° pendant 1 heure;

- Rinçage à l'eau distillée ;
- Différenciation, sous le contrôle du microscope, par l'alcool aniliné;
- Faire séjourner dans l'alcool acétique de 30 secondes à 1 minutes;
- Traitement par l'acide phosphotungstique ;
- Rinçage à l'eau distillée ;
- Traitement par la solution diluée de bleu de Heidenhain de 30 à 60 minutes ;
- Déshydratation par l'alcool absolu, éclaircissement et montage.

Résultats : les noyaux prennent une teinte rouge, les cytoplasmes en jaune, les fibres de collagènes en bleu foncé. La teinte des produits de section va du rouge intense au bleu foncé en passant par une gamme des roses, jaune et violet.

II.2.7. Montage et observation

Après le montage à l'Eukitt, les lames sont séchées sur papier absorbant, nettoyées au xylène puis observées au microscope photonique à différents grossissements : X100, X400 et X1000.

II.2.8. Calculs statistiques

Les résultats statistiques sont présentés comme moyennes \pm écart-type. Les comparaisons statistiques des variables quantitatives ont été réalisées au moyen de l'analyse de variance selon le test t de Student et les différences sont considérées comme statistiquement :

- Non significatives lorsque $p > 0,05$.
- Significatives lorsque $0.02 < p < 0.05$.
- Très significatives lorsque $0.01 < p < 0.02$.
- Hautement significatives lorsque $p < 0.01$.

Le gain du poids corporel est déterminé en pourcentage (p%) comme suit :

$$P\% = \frac{\text{Poids final} - \text{Poids initial}}{\text{Poids initial}} \times 100$$

CHAPITRE III

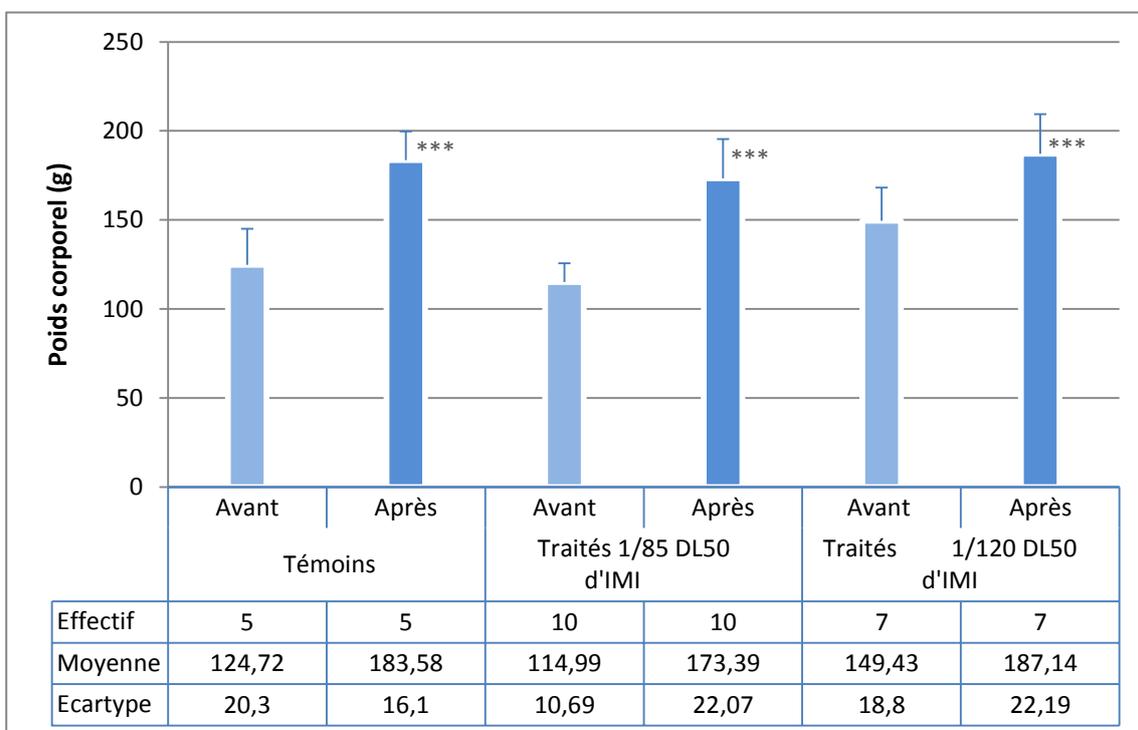
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

La recherche des aspects de la toxicité orale de l'imidaclopride à raison de 1/85 DL50 et 1/120 DL50 chez les rats femelles adultes de souches Wistar pendant 30 jours de traitement est basée sur :

- Evolution du poids corporel.
- Dosage des hormones thyroïdiennes (FT3 et FT4) ainsi que la thyroestimuline (TSH).
- Etude histologique de glande thyroïde et des ovaires.

III.1.1. Evolution pondérale



*** : Différence statistiquement hautement significative ($p < 0.05$) par rapport au début de l'expérimentation
 Avant : Avant l'expérimentation Après : Après l'expérimentation

Figure 1 : Effet de 1/85 DL50 et 1/120 DL50 d'imidaclopride pendant 30 jours sur le poids corporel des rats femelles.

Selon la figure 1 et les tableaux IV, V et VI de l'annexe 2, le traitement à l'imidaclopride n'entraîne aucune perturbation de la croissance générale des rats. Une augmentation statistiquement hautement significative ($p < 0,05$) a été enregistrée chez tous les lots à la fin de l'expérimentation. En effet, les rates présentent un gain de poids de 49,09 % pour les témoins, 51,46 % pour le groupe traité à 1/85 DL50 d'IMI et 25,42 % pour le groupe traité à 1/120 DL50 d'IMI.

III.1.2. Dosage des hormones

III.1.2.1. Dosage de la triiodothyronine libre (FT3)

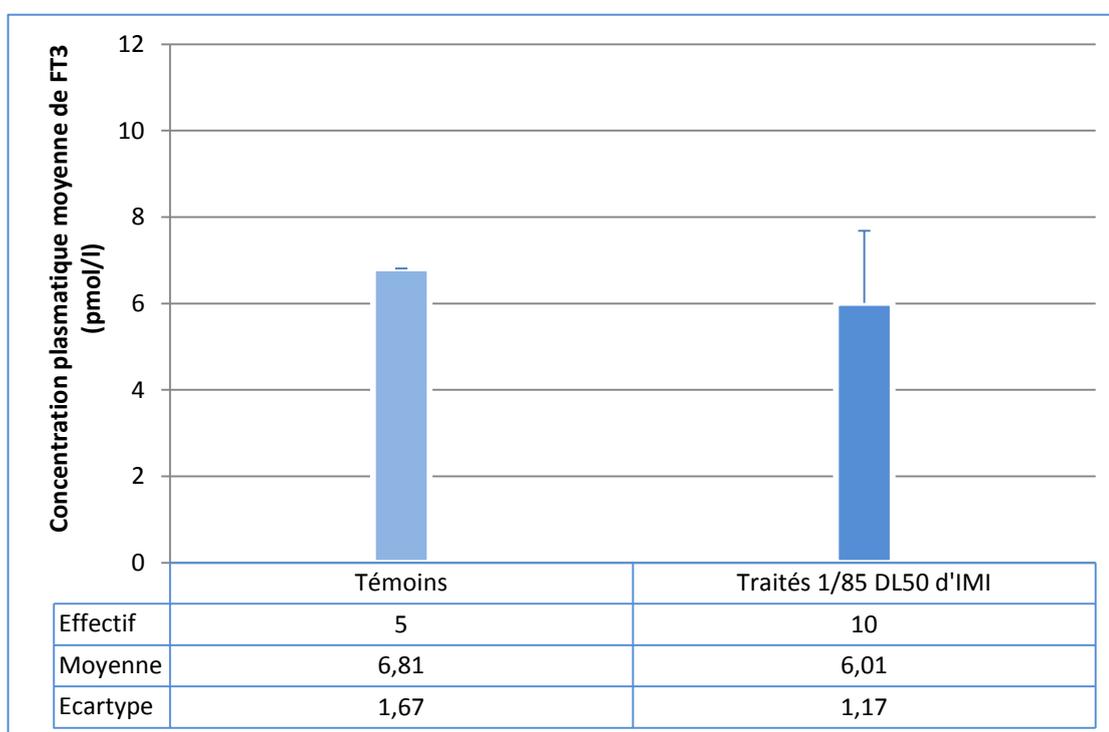


Figure 2 : Valeurs moyennes de la concentration plasmatique de la triiodothyronine libre (pmol/l) chez les rats femelles adultes témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI.

Selon la figure 2 et le tableau VII de l'annexe 2, le traitement à l'IMI ne semble pas perturber l'activité thyroïdienne. Aucune différence statistiquement significative ($p < 0,05$) n'est remarquée entre les rates témoins (6.81 pmol/l \pm 1.67) et les rates traités (6.01 pmol/l \pm 1.17).

III.1.2.2. Dosage de la thyroxine libre (FT4)

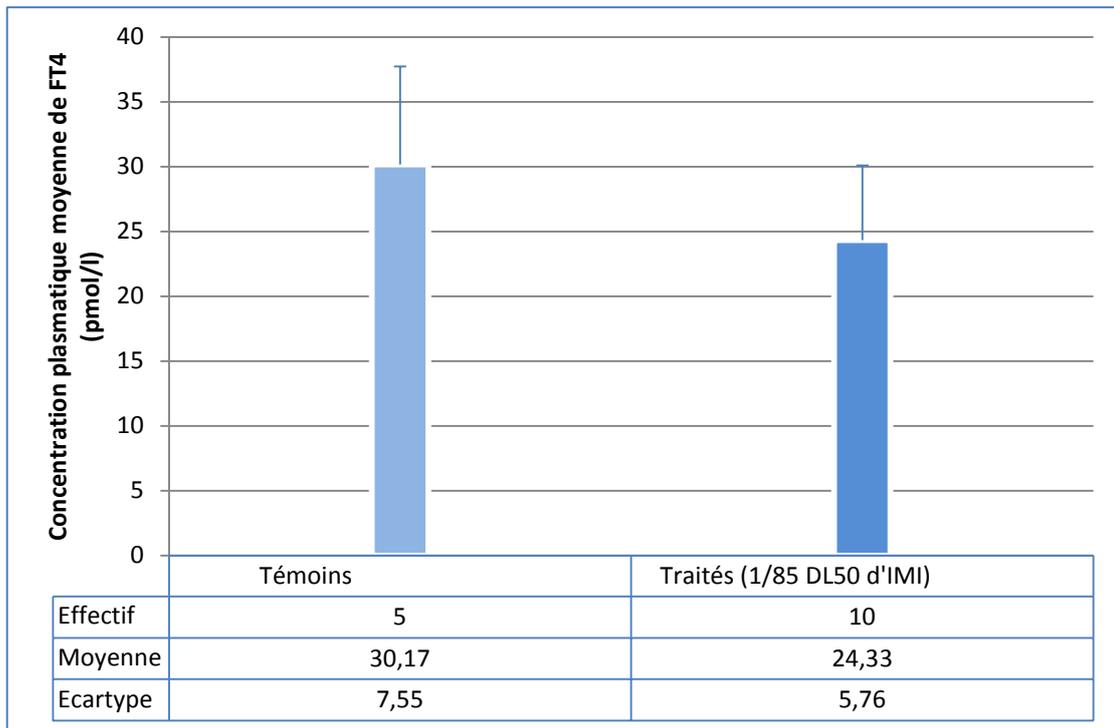


Figure 3: Valeurs moyennes de la concentration plasmatique de la thyroxine libre (pmol/l) chez les rats femelles adultes témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI.

Les résultats illustrés dans la figure 3 et le tableau VII de l'annexe 2 montrent que le traitement avec 1/85 DL50 d'imidaclopride n'affecte pas la sécrétion de la FT4. Une diminution statistiquement non significative ($p < 0.05$) de sa concentration plasmatique chez les rats témoins ($30.17 \text{ pmol/l} \pm 7.55$) et traités ($24.33 \text{ pmol/l} \pm 5.76$) a été observée.

III.1.2.3. Dosage de la thyroestimuline (TSH)

Tableau III : Concentration plasmatique moyenne de la thyroestimuline ($\mu\text{UI/l}$) chez les rats femelles témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI.

| | TSH ($\mu\text{UI/l}$) | |
|-----------------|--------------------------|-------------------|
| | Témoins | 1/85 DL50 d'IMI |
| Effectif | n=5 | n=10 |
| Moyenne | < 0,005 | < 0,005 |

Selon les tableaux III ainsi que VII et VIII de l'annexe 2, le traitement avec 1/85 d'IMI n'affecte pas la sécrétion de la thyroestimuline.

III.1.3. Etude histopathologique**III.1.3.1. Parenchyme ovarien****a- Chez les rats témoins**

En microscopie optique, le parenchyme ovarien est recouvert d'un épithélium constitué d'une assise de cellules pavimenteuses (figure 4b et 5a). Le stroma présente une couche dense mal délimitée appelée albuginée (figure 4b), sous laquelle nous distinguons à la périphérie une région corticale qui renferme les follicules ovariens, à différents stades de leur croissance, répartis au sein d'un stroma conjonctif. La région médullaire est constituée de tissu conjonctif lâche contenant plusieurs vaisseaux. Elle est en continuité avec le stroma cortical (figure 4a).

Nous distinguons dans le cortex ovarien ; des follicules non développés se présentant sous forme de follicules primordiaux constitués d'un ovocyte entouré par certaines cellules folliculeuses aplaties ; des follicules primaires contenant un ovocyte et une assise de cellules folliculeuses cubiques appelées également cellules de la granulosa (figure 4b). Les follicules secondaires montrent une granulosa formée de plusieurs couches cellulaires. L'ovocyte est entouré d'une zone pellucide. La granulosa est entourée de deux thèques interne et externe (figure 5a). Les follicules antraux présentent de plus une cavité folliculaire qui sépare les cellules de la granulosa (figure 5b et c). Les follicules mûr ou de Degraaf sont peu nombreux et d'un diamètre important présentant une grande quantité de liquide folliculaire et un ovocyte refoulé vers la périphérie. Ce dernier est entouré par la corona radiata (figure 5d et e). Plusieurs corps jaunes constitués de cellules lutéales sont présent dans le stroma (figure 6a et b).

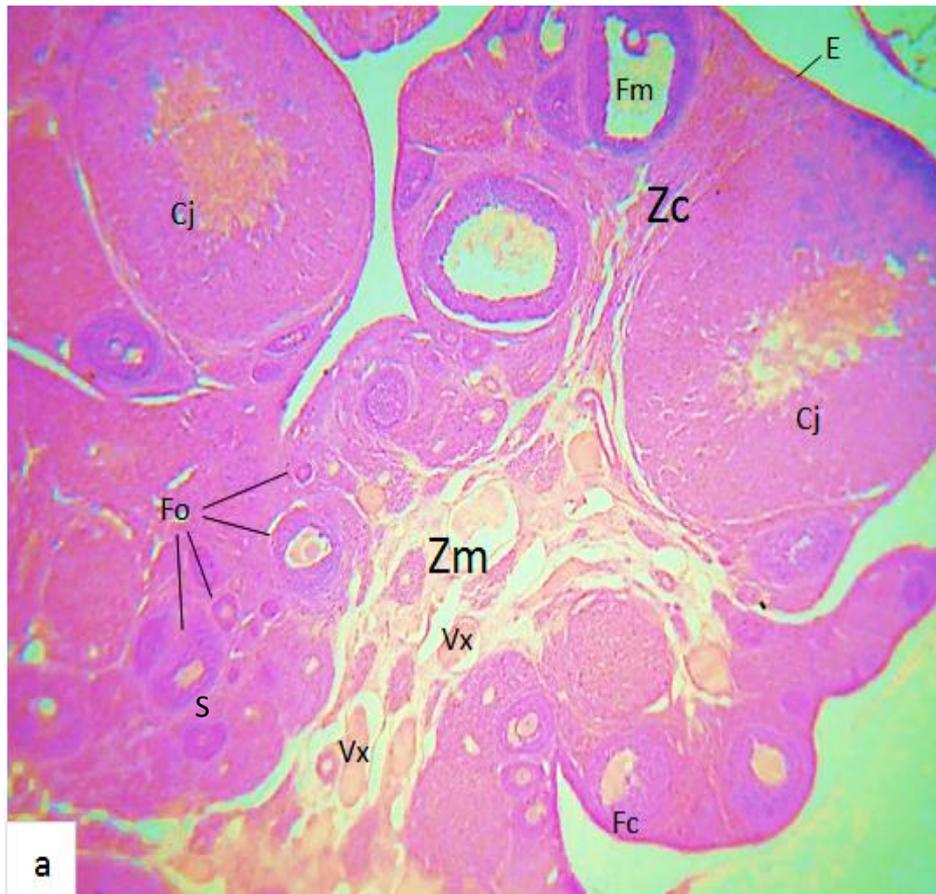
b- Chez les rats traités

L'observation en microscopie photonique ne révèle pas des altérations structurales évidentes au niveau du parenchyme ovarien.

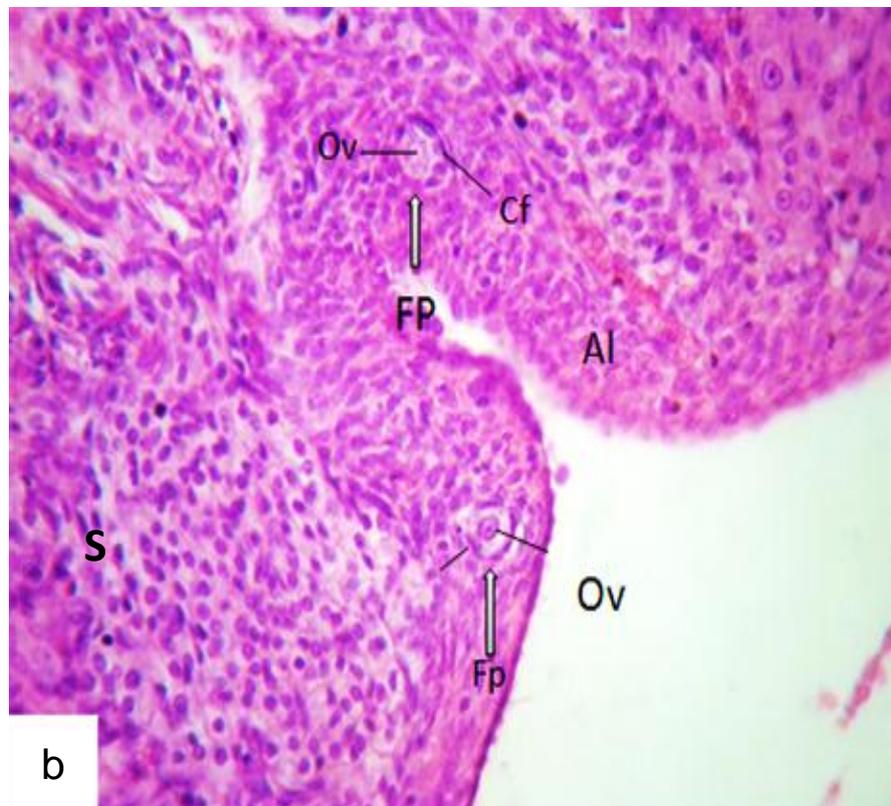
A faible grossissement, l'architecture générale du cortex et de la médulla ovarien est préservée chez tous les groupes traités en comparaison avec les témoins (figures 7b et 10b). Nous notons, néanmoins, la présence de quelques follicules atrétiques (figures 7c et 10c).

Chez les rates traitées avec 1/85 DL50 d'IMI, les cellules lutéales des corps jaunes présentent un aspect clair alors que leur structure reste maintenue chez les rates traitées avec 1/120 DL50 d'IMI (figure 9b et c et figure 12b et c).

Les figures (5, 8 et 11) montrent à fort grossissement, des follicules ovariens à différents stades d'évolution chez les rates témoins et traitées.

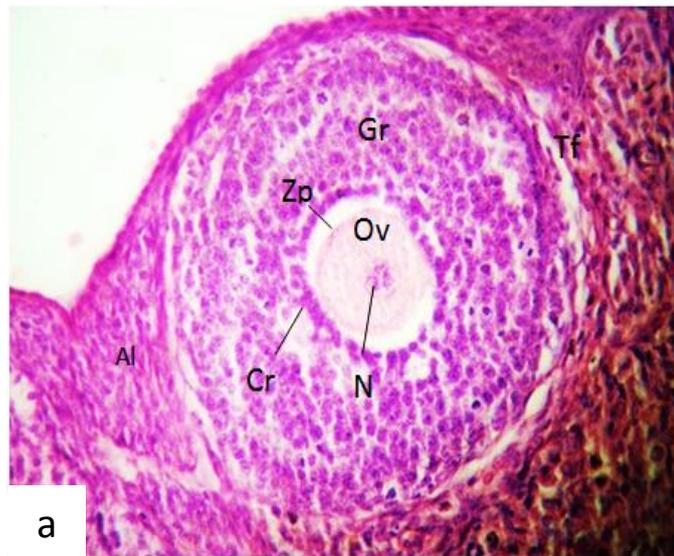


Présence d'un cortex riche en follicules en différents stades de maturation.

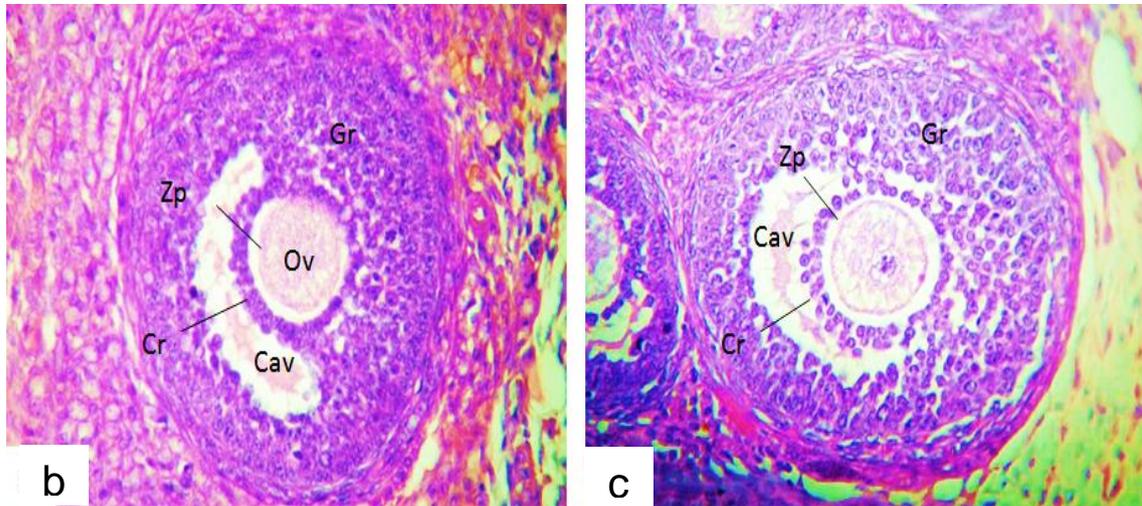


Follicules primordial et primaire.

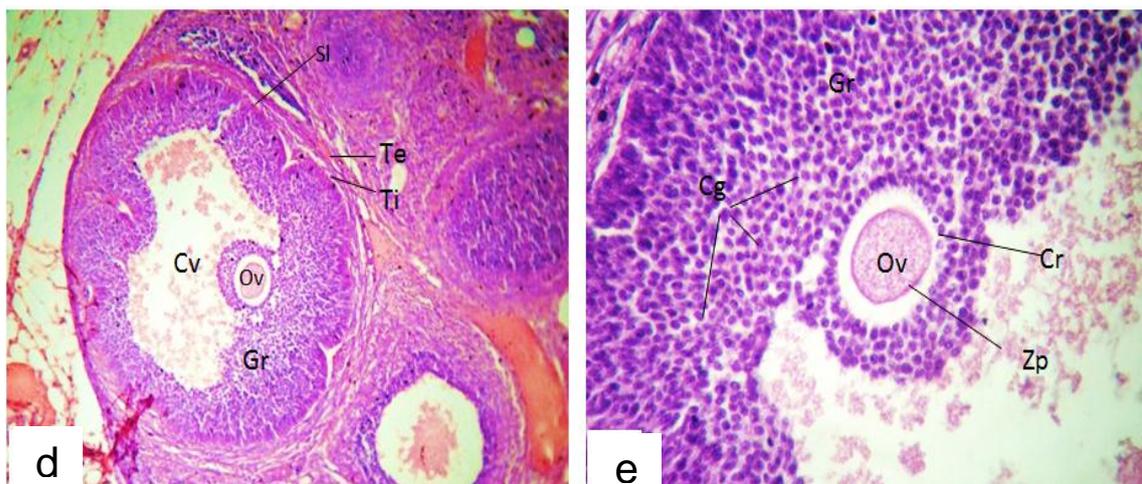
Figure 4



Follicule secondaire.

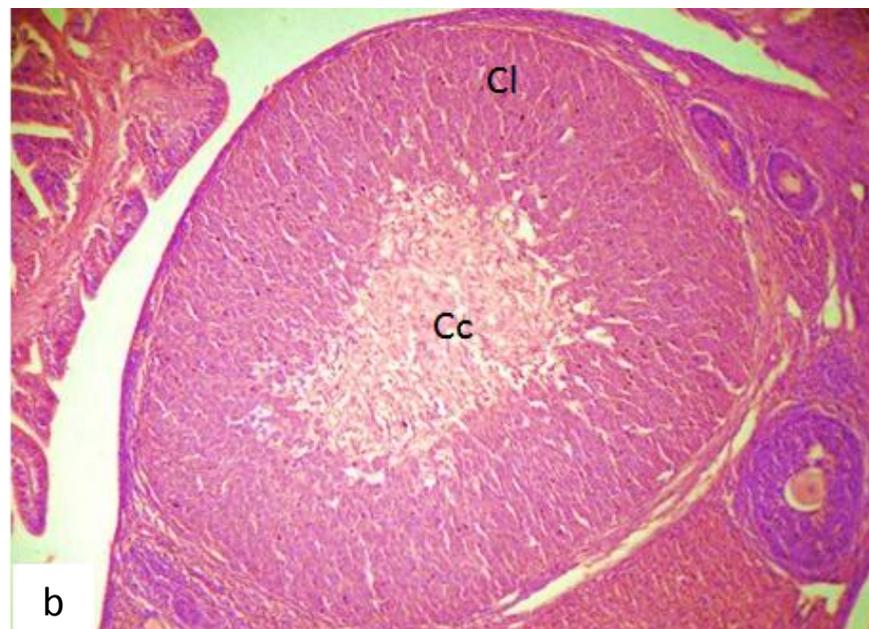
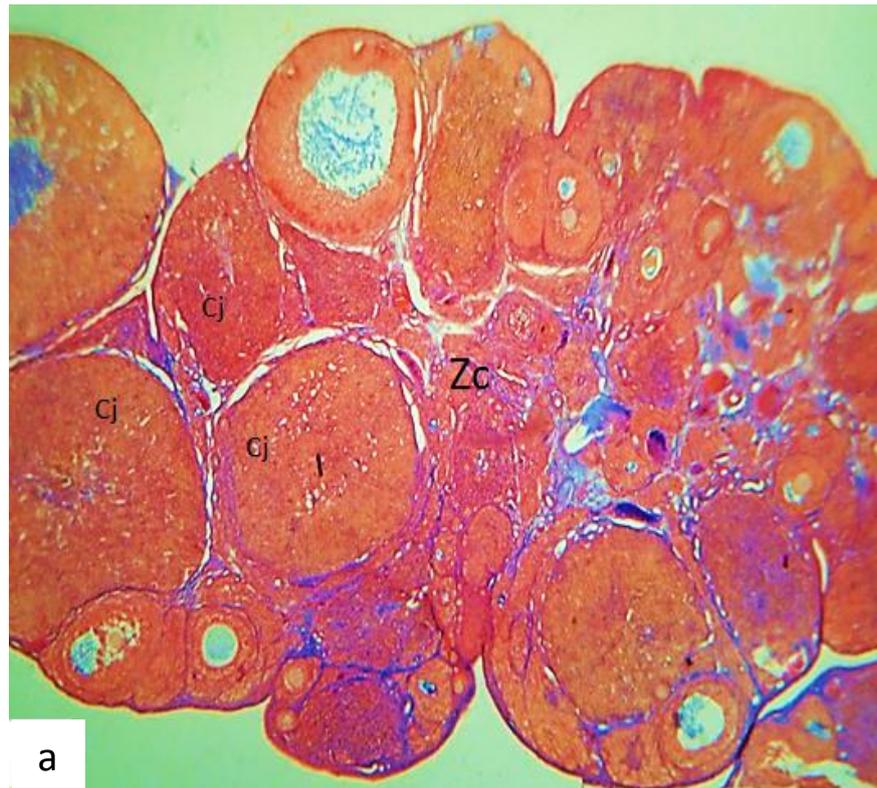


Follicules cavitaires (antraux).



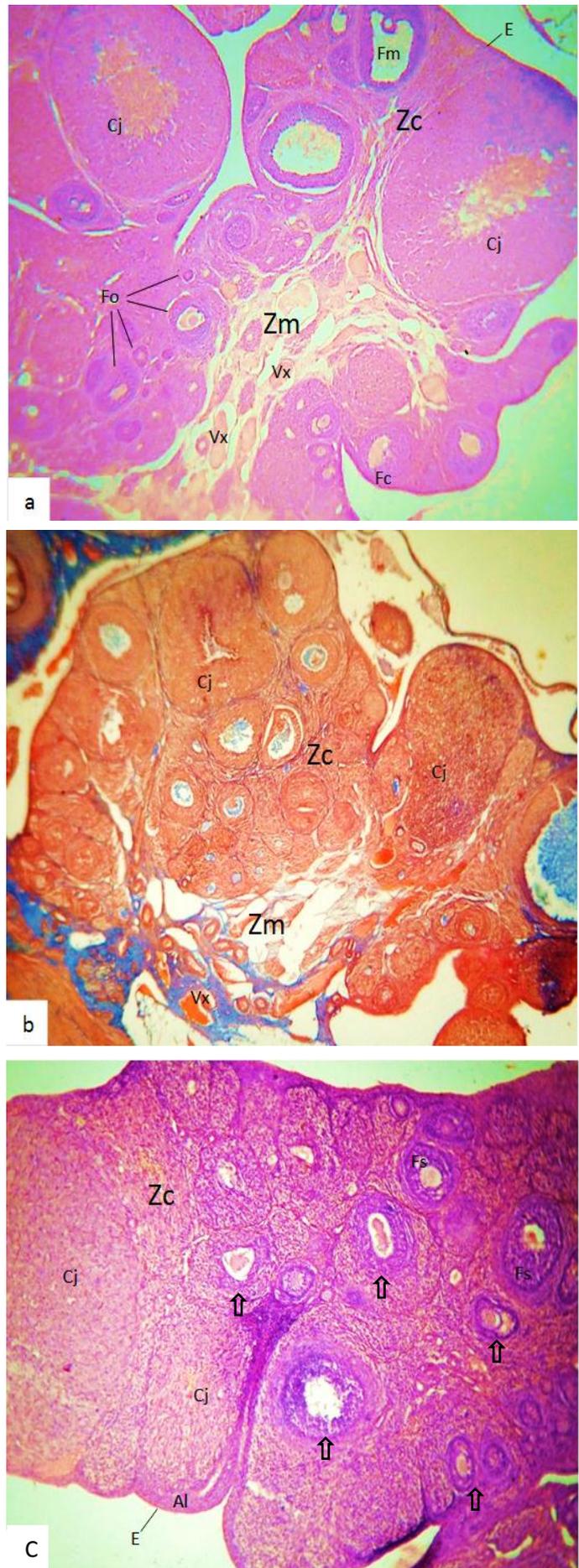
Follicules mûrs.

Figure 5



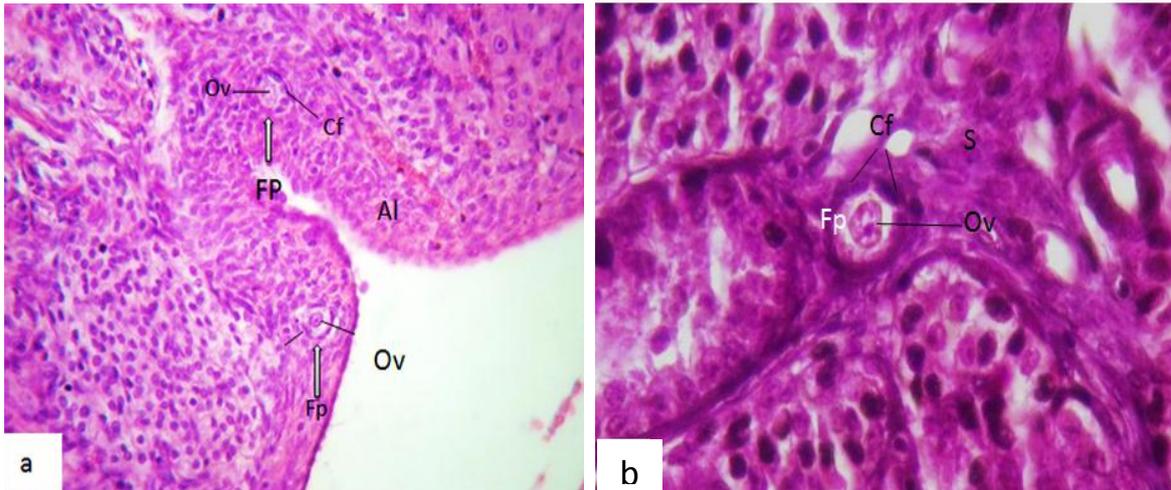
Corps jaunes.

Figure 6

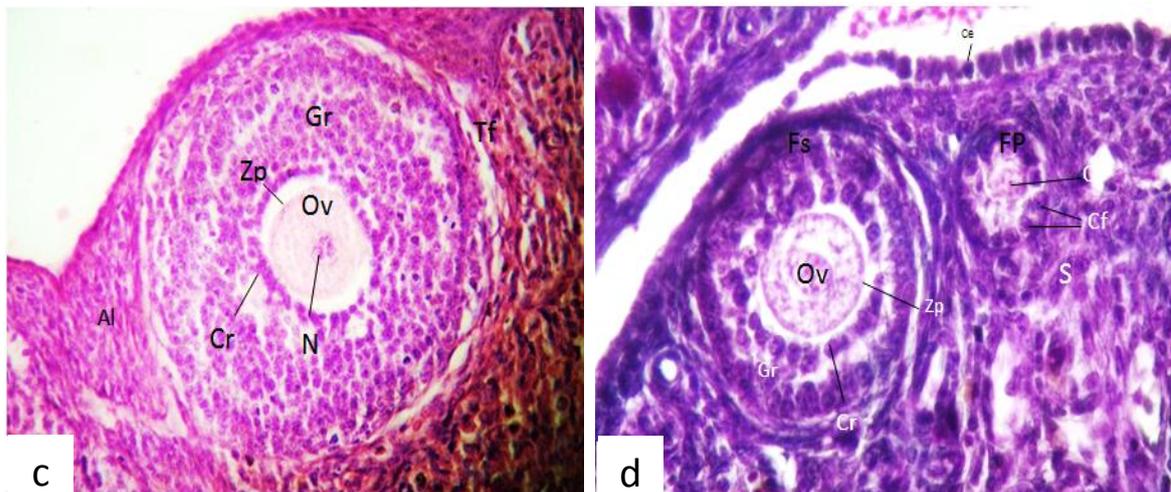


Flèches : Follicules atrétiques.

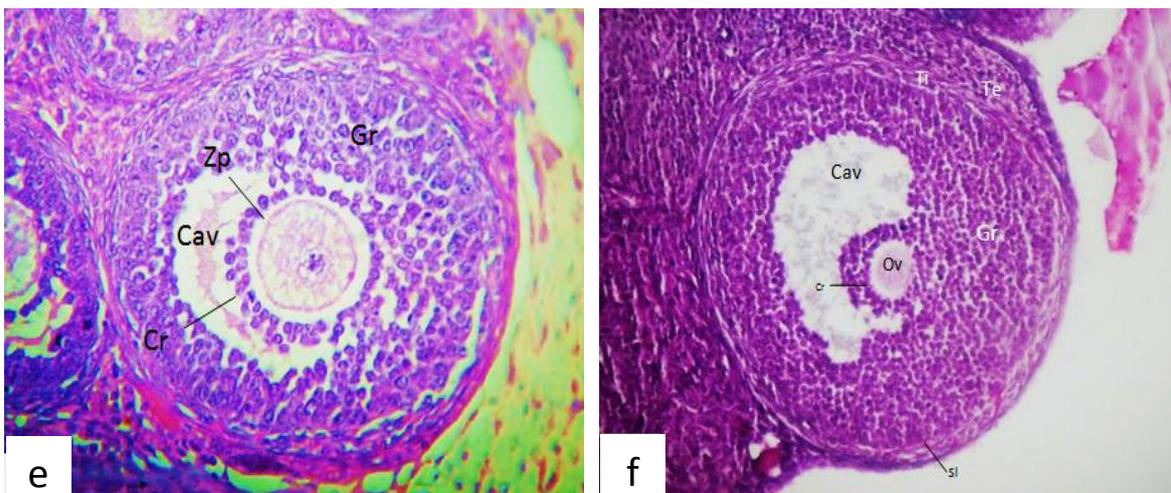
Figure 7



Follicules primordiaux et primaire.

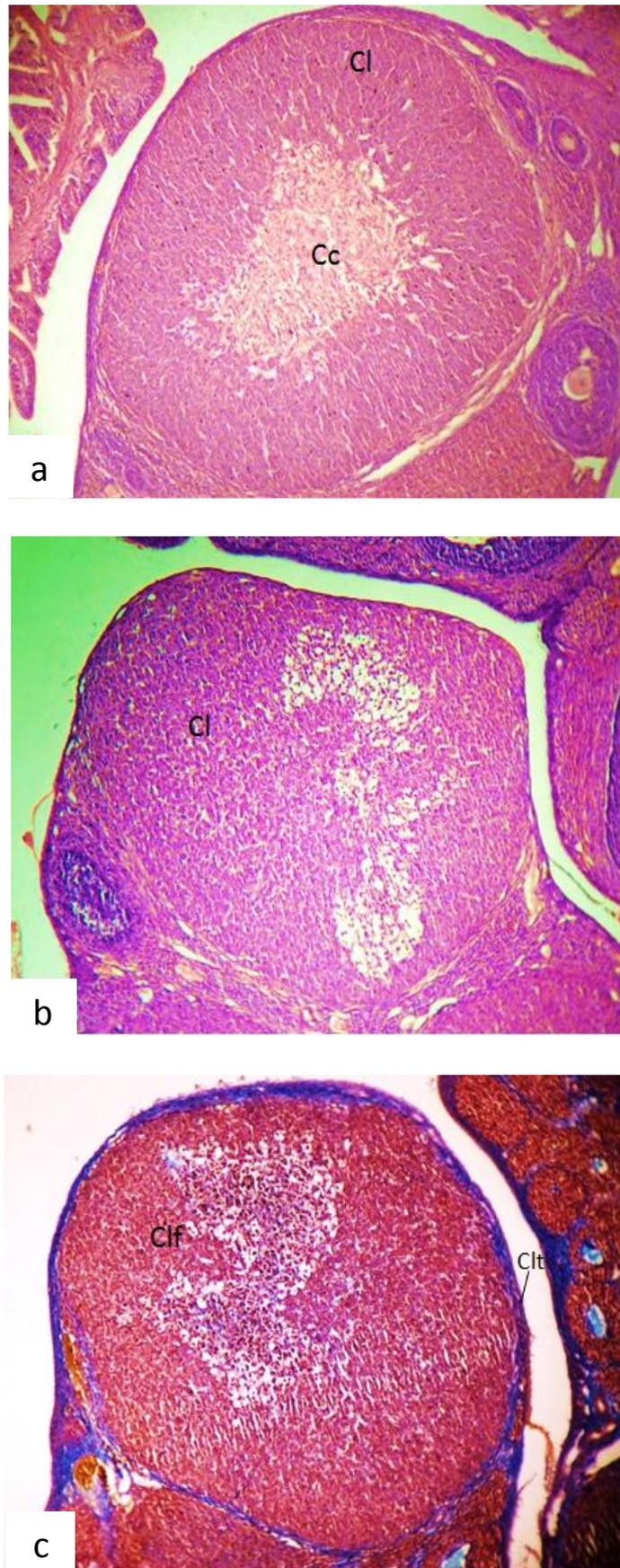


Follicules primaire et secondaires



Follicules cavitaires.

Figure 8



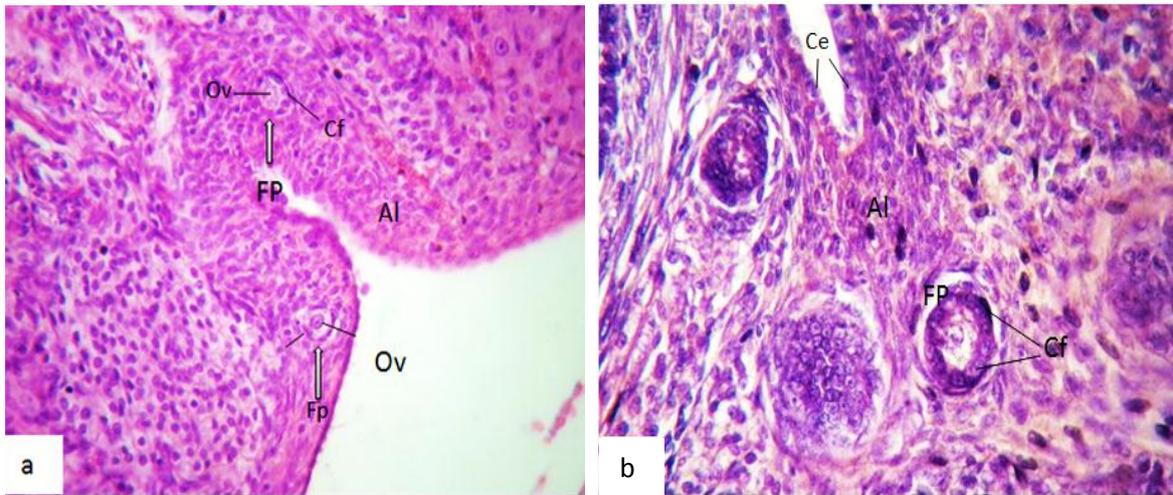
Présence d'aspect clair de certaines cellules lutéales.

Figure 9

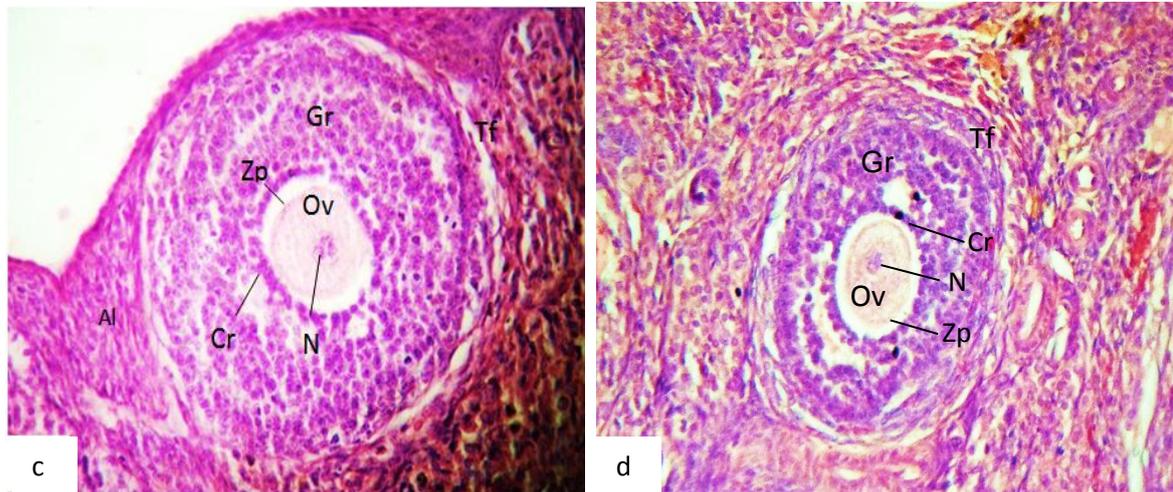


Astéries : Follicules atrétiques.

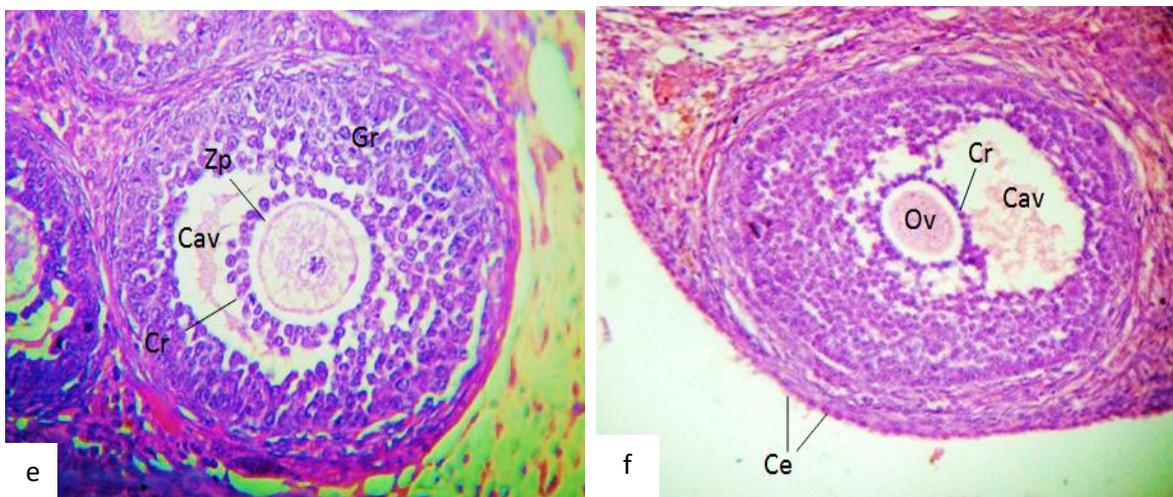
Figure 10



Follicules primordial et primaires.

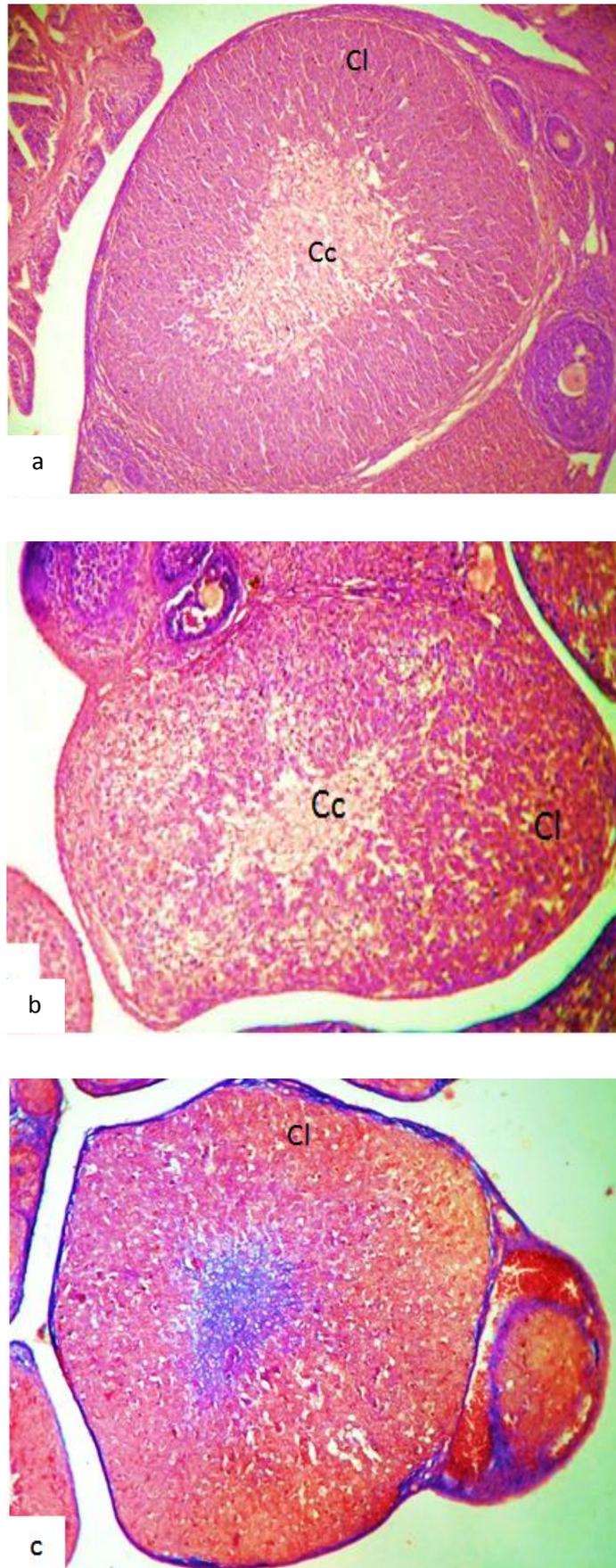


Follicules secondaires.



Follicules cavitaires.

Figure 11



Maintien de la structure des corps jaunes.

Figure 12

III.1.3.1. Parenchyme thyroïdien**a- Chez les rats témoins**

D'après la microscopie photonique, Les coupes de la glande thyroïde des rates témoins présentent un parenchyme constitué de nombreux follicules de diamètres variables, situés dans un stroma conjonctivo-vasculaire (Figure 13b et c). Chaque follicule est délimité d'un épithélium simple formé de thyrocytes possédant des noyaux sombres et ovoïdes. Ces cellules entourent une lumière large remplie de colloïde (Figure 13a, b et c).

a- Chez les rats traités avec 1/85 DL50 d'IMI

Chez les rats traités avec 1/85 DL50 d'imidaclopride en moyenne de 30 jours, le parenchyme thyroïdien présente des altérations structurales importantes. Ce parenchyme perd son organisation structurale par une augmentation du nombre des petits follicules (figure 14b). Ainsi, les follicules thyroïdiens deviennent moins individualisés et parfois apparaissent effondrés (figure 15b et c). Dans certaines régions, nous remarquons aussi une perte de colloïde, un rétrécissement folliculaire (figure 14b) et l'apparition d'une nécrose tissulaire (figure 17b et c). D'autre part, la lumière folliculaire présente des cellules desquamées témoignant de la présence d'une métaplasie squameuse (figure 16b et c).

b- Chez les rats traités avec 1/120 DL50 d'IMI

L'aspect histologique du parenchyme thyroïdien chez des rates traitées avec 1/120 DL50 d'IMI révèle une désorganisation de la structure générale. La majorité des follicules sont effondrés et leur colloïde est disparu (figure 19b et c). Alors que d'autres endroits du parenchyme montrent un aspect de tissu nécrosé (figure 20b). D'autre part, nous remarquons l'augmentation de la hauteur de l'épithélium de certains follicules (Figure 18b). Les cellules squameuses se trouvent dans les colloïdes folliculaires (figure 18b et c).

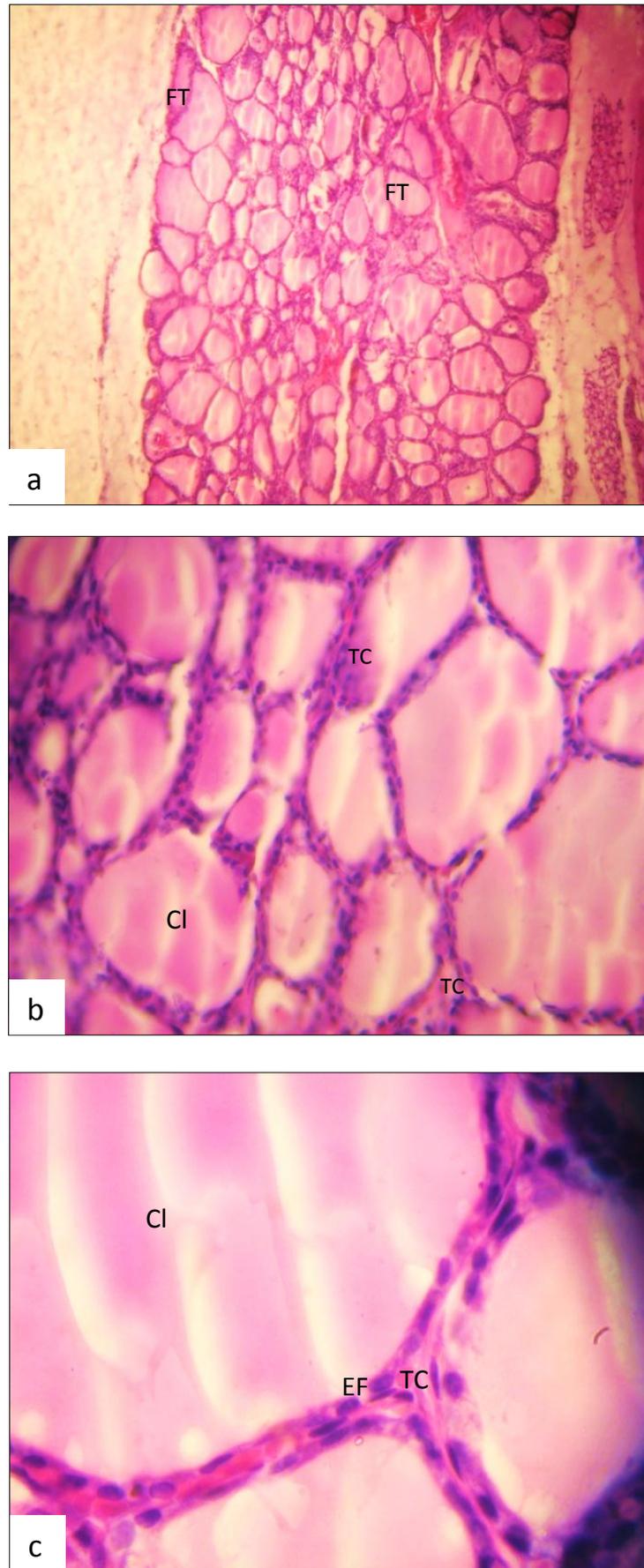
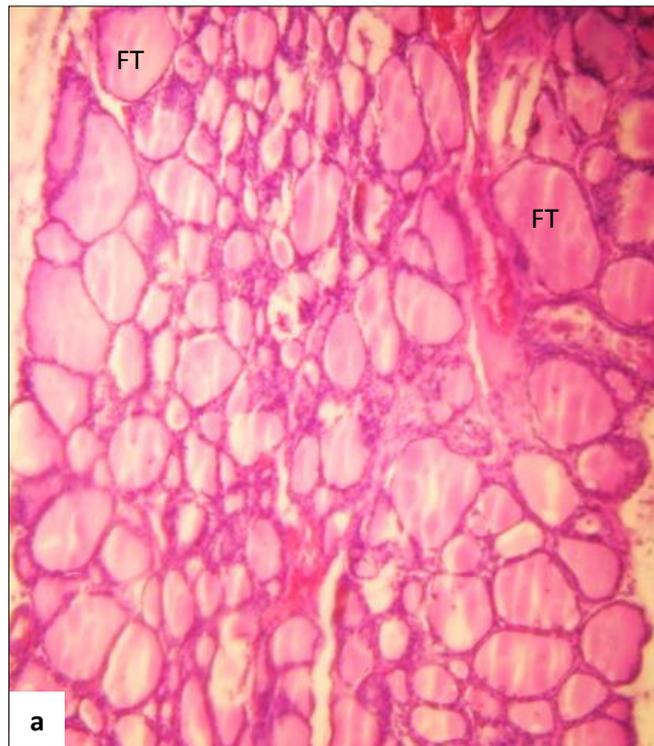
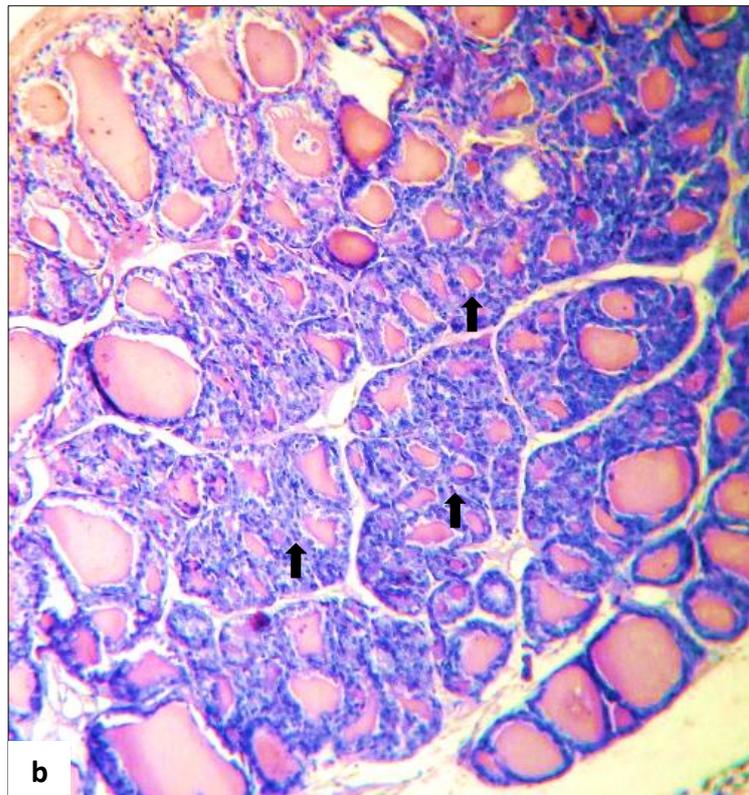


Figure 13

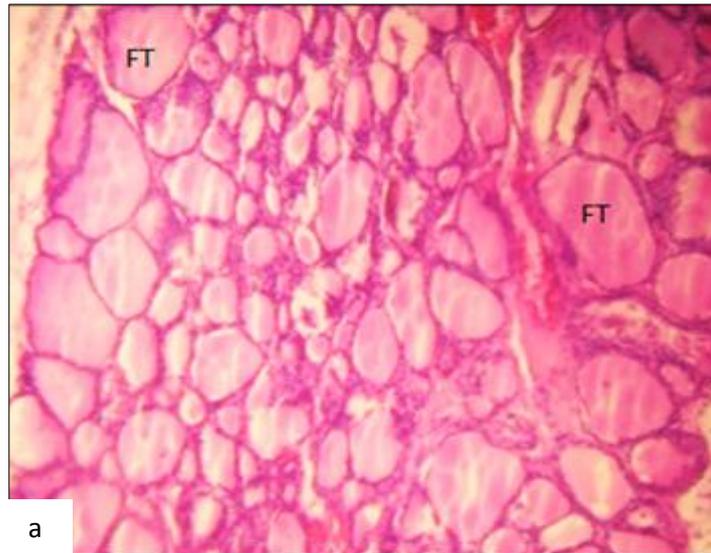


FT : Follicules thyroïdien.



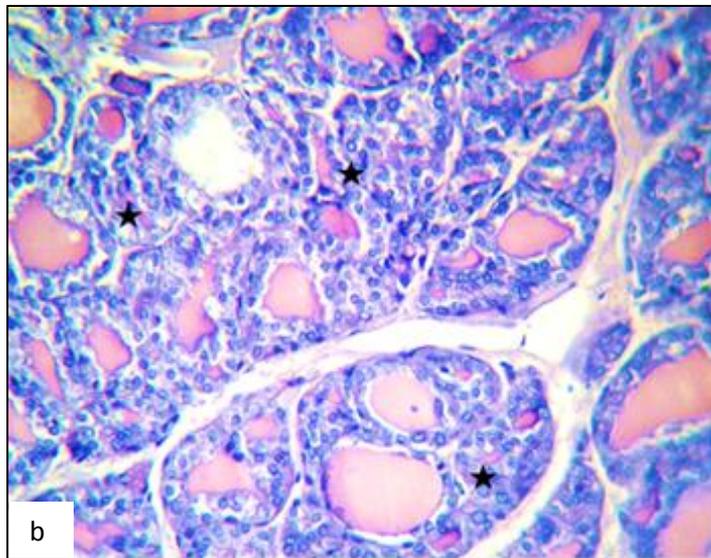
Flèches : Rétrécissement folliculaire et perte de colloïde.

Figure 14



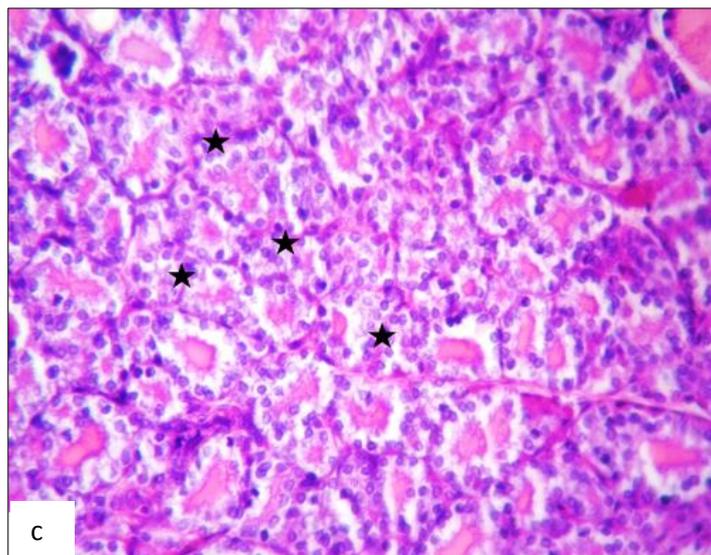
a

FT : Follicules thyroïdiens



b

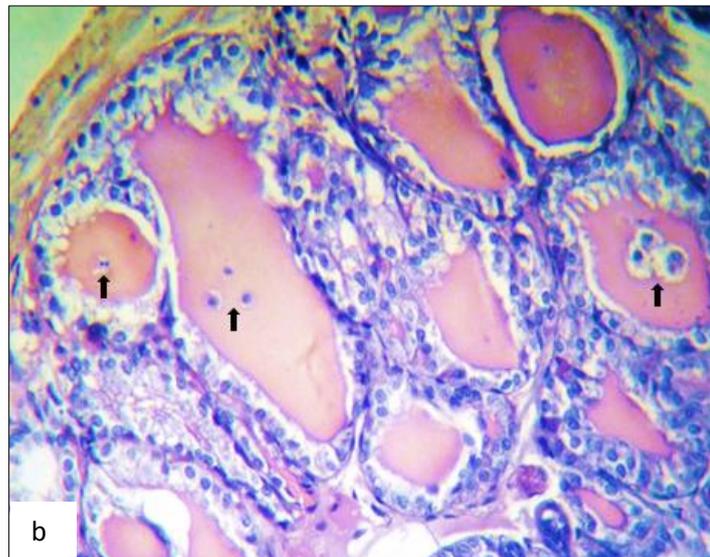
Astéries : Follicules effondrés.



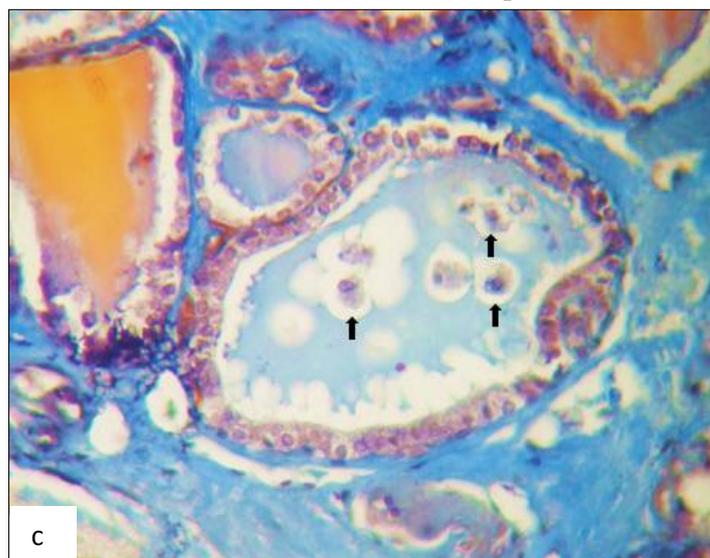
c

Astéries: Follicules effondrés.

Figure 15

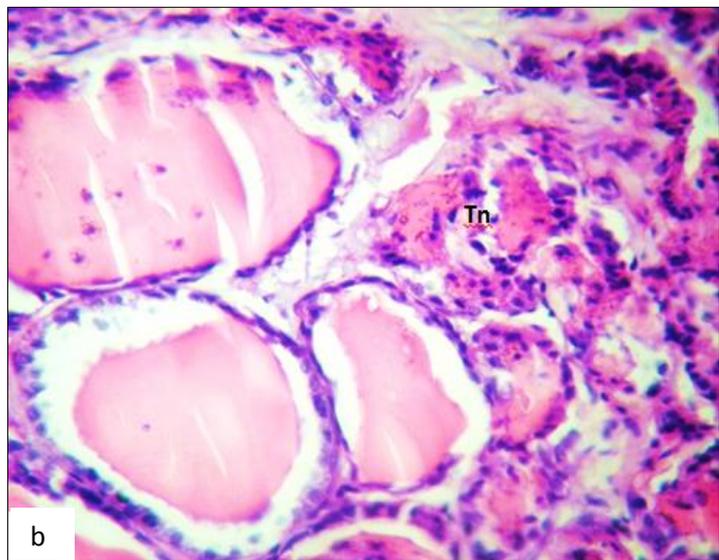


Flèches : Cellules folliculaires squameuses.

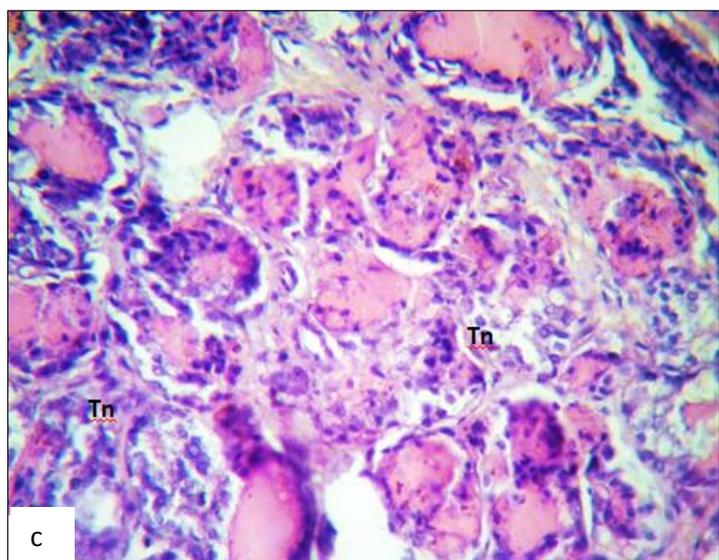


Flèches : Cellules folliculaires squameuses.

Figure 16

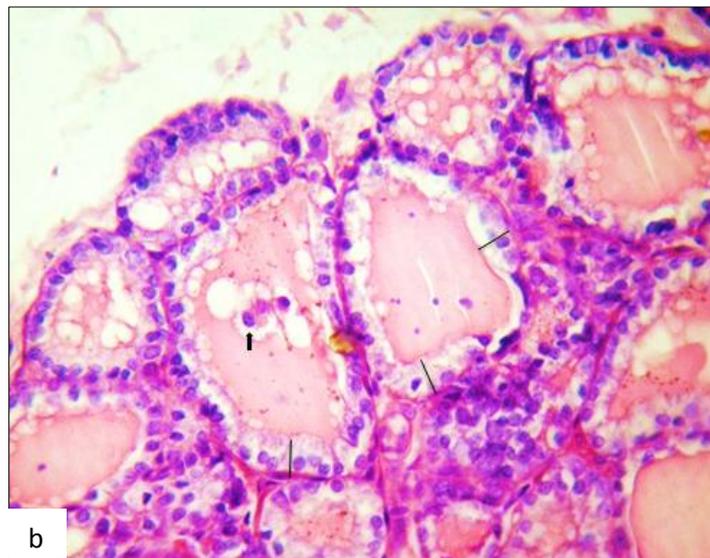


Tn : Tissu nécrosé.

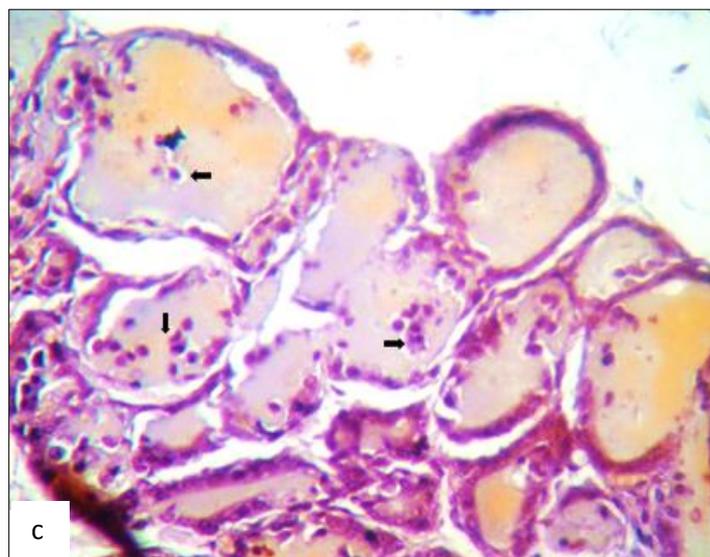


Tn : Tissu nécrosé.

Figure 17

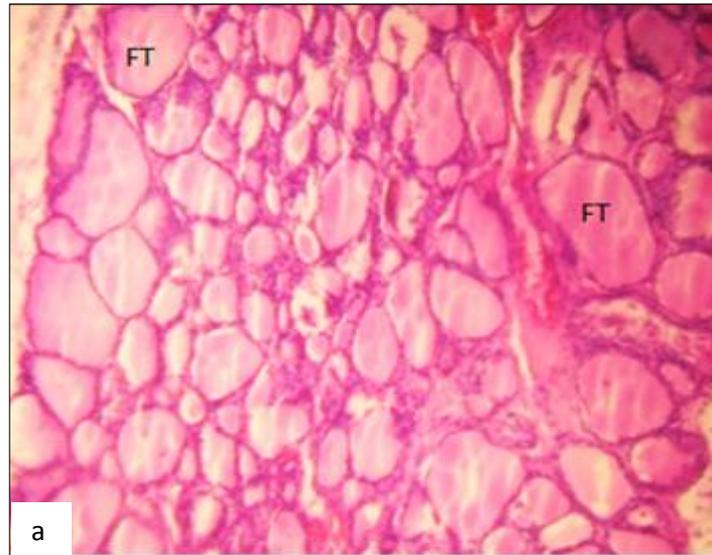


Flèche : Cellules folliculaires squameuses ; bâtonnés : Epithélium folliculaire.

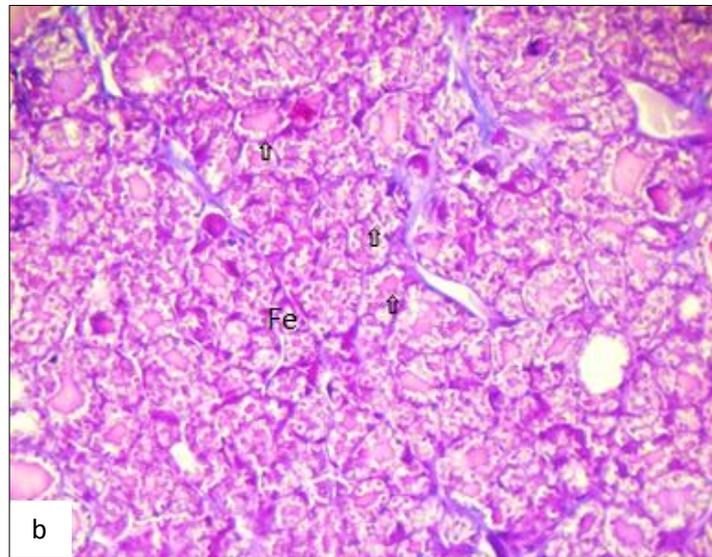


Flèches : Cellules folliculaires squameuses.

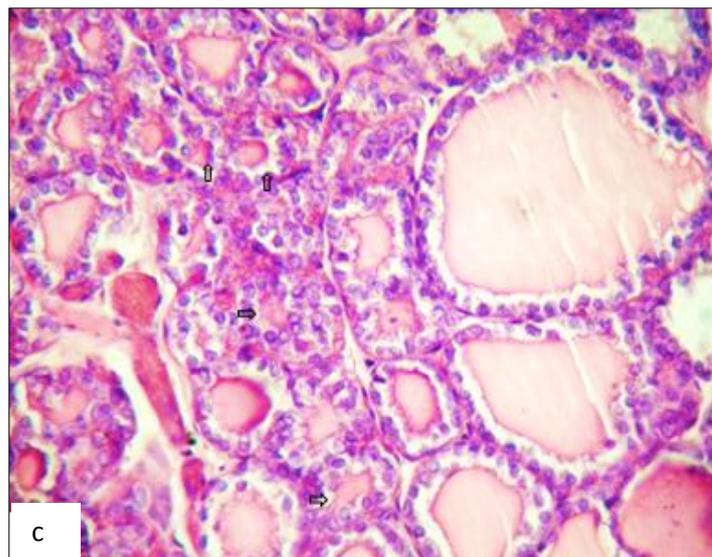
Figure 18



FT : Follicules thyroïdiens.

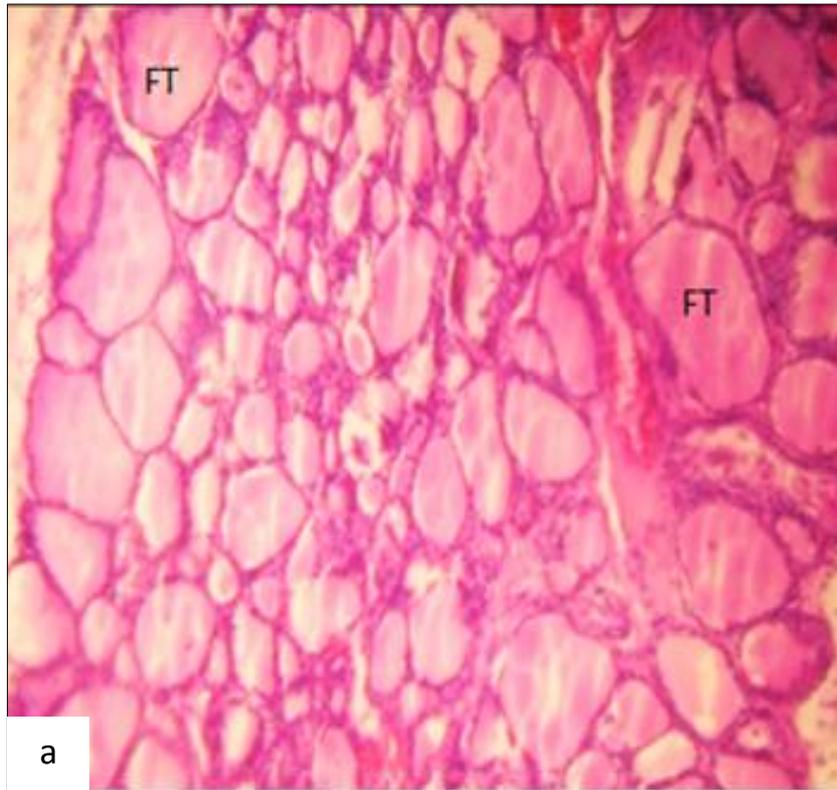


Fe : Follicule effondré ; Flèches: Perte du colloïde.

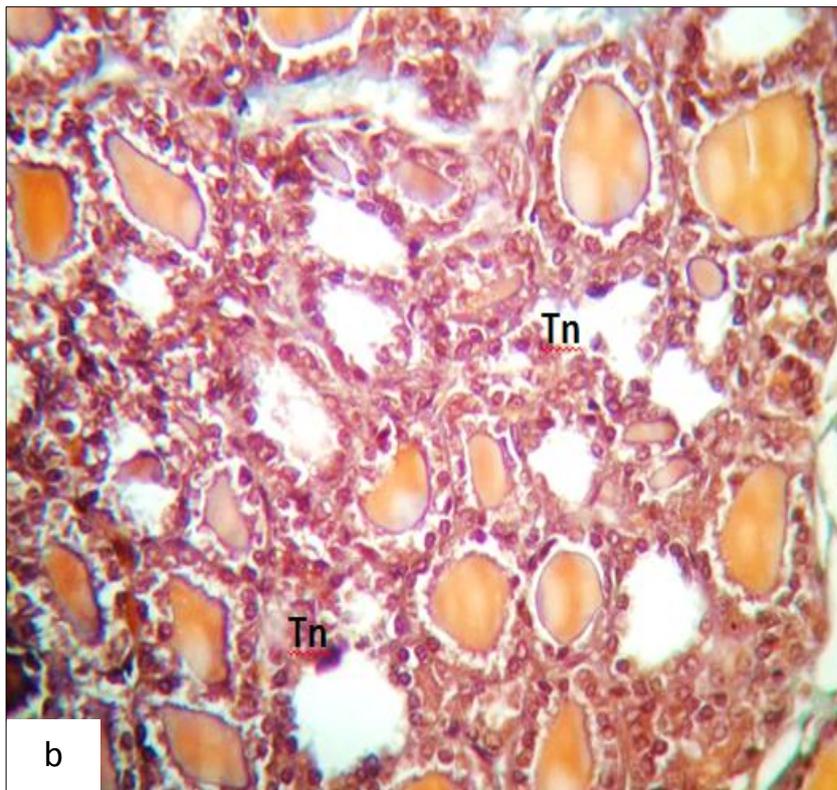


Flèches : Perte du colloïde.

Figure 19



FT : Follicules thyroïdiens.



Tn : Tissu nécrosé.

Figure 20

III.2. DISCUSSION

Cette étude a pour but de rechercher les effets de la toxicité orale subchronique de deux faibles doses d'imidaclopride à raison de 1/85 et 1/120 DL50 sur l'aspect morpho-fonctionnel de la glande thyroïde et sur la structure de l'ovaire.

Dans nos conditions expérimentales, le pourcentage de mortalité chez les rates est nul. Des résultats similaires sont obtenus chez des rates traitées avec 5 mg/kg/jour et 10 mg/kg/jour d'IMI pendant 90 jours (Bhardwaj et *al.*, 2010).

Il est connu que la surveillance du poids corporel fournit des informations sur l'état général de santé des animaux (Aly et *al.*, 2009). Nos résultats montrent que les deux doses utilisées ne semblent pas perturber le poids corporel des rats puisque tous les groupes (témoin et traités) ont présenté un gain corporel remarquable qui témoigne une croissance (Palani et *al.*, 1999). Des résultats contradictoires sont décrits par Bhardwaj et *al.* (2010). Ces derniers ont noté une réduction du poids corporel chez les rates administrées oralement avec 20 mg/kg/jour d'IMI pendant 90 jours. Ces chercheurs considèrent cette régression, qui est due à la faible consommation de l'alimentation, comme signe de toxicité.

Les organes tels que la thyroïde et les ovaires sont variablement sensibles à la plupart des agents cytotoxiques (Tiemann, 2008 ; Sonmezer et *al.*, 2013). De ce fait, différentes méthodes morphologiques et biochimiques ont été décrites pour étudier l'activité des deux fonctions thyroïdienne et ovarienne (Kamrin et *al.*, 1994). La recherche de la toxicité au niveau de l'ovaire est assurée par plusieurs paramètres tels que l'aspect structural et le nombre des follicules, la présence ou l'absence de l'apoptose et par la détermination des taux des hormones sexuelles (Lee et *al.*, 2000 ; Anderson et Cameron, 2011 ; Abali et *al.*, 2013).

Au cours de notre travail, nous avons entamé une étude préliminaire qui consiste à rechercher l'effet de l'IMI sur l'aspect structural général du parenchyme ovarien. Ce dernier ayant préservé une architecture normale indique que les deux faibles doses administrées, 1/85 et 1/120 DL50, pendant 30 jours n'induisent pas des effets délétères apparents.

Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par Kapoor et *al.* (2011), où l'examen histologique des ovaires des rates exposées à 5 et 10 mg/kg/jour d'imidaclopride pendant 90 jours a montré une architecture normale et des taux d'hormones folliculo-stimulante et lutéinisante sans aucune variation significative. Toutefois, les mêmes chercheurs ont signalé que l'exposition répétée des rats à une forte dose d'imidaclopride, 20 mg/kg/jour, pendant 90 jours provoque une condensation cytoplasmique et l'apparition de pigments de lipofuschine abondants au niveau des cellules de la granulosa folliculaire avec une augmentation significative du taux sérique de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et une diminution des taux de l'hormone lutéinisante (LH) et de la progestérone.

Il est bien établi que le cycle ovarien, la fécondation et la mise en place et le maintien de la gestation dépendent principalement de la fonction des cellules de la granulosa sécrétant des œstrogènes. Des études antérieures ont démontré que les substances toxiques favorisent l'installation des conditions défavorables des follicules menant à la dégénérescence des cellules de la granulosa (Hadley, 1995; Tiemann, 2008). Ceci explique probablement la présence des follicules atrétiques dans les parenchymes ovariens et la présence des cellules lutéales avec un aspect clair chez certaines rates. En effet, il a été reporté que les insecticides provoquent un déséquilibre hormonal en inhibant la libération de l'hormone de la libération des gonadotrophines (GnRH) conduisant à un changement des taux de la LH et de la FSH qui influence la granulosa (Goldman et *al.*, 1990; Stoker et *al.*, 1993 ; Tiemann, 2008).

Au niveau de la glande thyroïdienne, les résultats du dosage hormonal montrent une sensibilité des hormones thyroïdiennes à l'imidaclopride témoignée par une diminution des concentrations plasmatiques en triiodothyronine (FT3) et en tétraiodothyronine (FT4). Cette variation reste cependant, statistiquement non significative. Ces résultats sont en contradiction avec ceux retrouvés par Hema (2011) et Boudegzdame (2013) qui ont montré une augmentation toujours statistiquement non significative avec l'IMI à raison de 1/50 DL50 pendant différentes périodes de traitement.

D'autre part, plusieurs études toxicologiques sur la recherche des perturbateurs endocriniens ont confirmé la sensibilité des hormones thyroïdiennes aux différents xénobiotiques y compris les insecticides (Villanger et *al.*, 2011). Parmi ces recherches, les travaux de Baccarelli et *al.* (2000) qui ont noté une baisse de la T3 et de la T4 chez des personnes exposés aux cyanures (utilisés pour la fabrication des pesticides comme Uragan D2).

Le taux de la thyroïdostimuline (TSH) n'a subi aucun changement lors du traitement aux 1/85 et 1/120 DL50 pendant 30 jours. Les mêmes résultats sont obtenus par Hema (2011) et Boudegzgame (2013) avec la dose de 1/50 DL50.

A l'échelle structurale, le parenchyme thyroïdien des rates est altéré suite aux différents traitements d'IMI (1/85 et 1/120 DL50). Nous observons un rétrécissement folliculaire avec disparition de certains parmi eux, une perte ou absence de colloïde, présence de tissu nécrosé et augmentation de la hauteur de l'épithélium folliculaire. Cette augmentation est aussi rapportée par Chu et *al.* (1995) et Pavel (2010) qui l'ont expliqué par l'hypertrophie des cellules épithéliales et la perte du colloïde.

Par ailleurs, plusieurs auteurs expliquent la nécrose du parenchyme thyroïdien par une insuffisance relative de l'apport sanguin nécessaire à la croissance des cellules folliculaires (Smeds et Wollman, 1983 ; Many et *al.*, 1984 ; Folkman, 1995).

La présence des cellules squameuses dans la lumière folliculaire montre bien l'initiation d'une réponse à une agression tissulaire. Des résultats comparables sont décrits par Tang et *al.* (2013) chez des rats mâles de souche Wistar traités avec des doses croissantes de polychlorobiphényle (10, 100, et 1000 g/kg/jour). Ce phénomène a été déjà décrit dans une variété de conditions pathologiques affectant la thyroïde, y compris l'inflammation aiguë (Livolsi et Merino, 1978) et le goitre (Nayak et *al.*, 2002). D'après les résultats de Tebourbi et *al.* (2010), cette métaplasie bénigne est due au remplacement des cellules folliculaires par des cellules squameuses marquant la présence d'une inflammation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude des effets de l'administration orale de l'imidaclopride à raison de 1/85 et 1/120 DL50 durant 30 jours menée sur des rates de souche Wistar montre une préservation de l'organisation structurale générale ovarienne et d'importantes altérations du parenchyme thyroïdien. En effet, nous avons enregistré :

Au niveau de l'ovaire :

Présence de tous les stades d'évolution folliculaire avec augmentation des follicules atrétiques dans certains parenchymes ovariens.

Au niveau de la thyroïde :

- Rétrécissement folliculaire ;
- présence de follicules effondrés et d'autres nécrosés ;
- disparition des colloïdes ;
- Epaissement de l'épithélium folliculaire ;
- présence de cellules folliculaires squameuses ;

Ainsi qu'une diminution non significative des taux de FT3 et FT4.

Ces résultats confirment que l'imidaclopride est un agent perturbateur de la fonction thyroïdienne et peut provoquer un stress cellulaire dépendant du type tissulaire et cellulaire.

Dans le but de compléter cette étude, il serait intéressant de rechercher les effets de ces doses sur le taux des hormones sexuelles ovariennes et hypophysaires. La réalisation de la morphométrie permettant le calcul de nombre et du diamètre des follicules peut donner plus de détails sur la toxicité de l'IMI par voie orale sur l'ovaire.

La recherche des altérations cellulaires au niveau ultra structural fera l'objet d'une étude ultérieure.

Il est indispensable de mettre au courant les autorités, les agriculteurs et les citoyens des effets toxiques de cet insecticide sur l'environnement et sur la santé humaine et animale. Cela afin de mettre en œuvre une stratégie de restriction et de contrôle de son utilisation et d'encourager l'utilisation de bio-insectides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABALI, R., YUKSEL, M.A., AKTAS, C., CELIK, C., GUZEL, S., ERFAN, G. and SAHIN, O. 2013. Decreased ovarian reserve in female Sprague–Dawley rats induced by isotretinoin (retinoic acid) exposure. *Reproductive. Bio. Medicine .Online.*, **27**: 184– 191.

AGARWAL, R. and SRINIVA, S.R. 2010. Severe neuropsychiatric manifestations and rhabdomyolysis in a patient with imidacloprid poisoning. *Am. J. Emerg. Med.*, Pages : 844–845.

AGOUD, D. 2013. 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.

ALLEN, T.R., FREI, TH., LUETKEMEIER, H., VOGEL, O., BIEDERMANN, K. and WILSON, J. 1989. 52-Week Oral Toxicity (Feeding) Study with NTN 33893 Technical in the Dog. *Research and Consulting Company AG. Itingen, Switzerland.*

ALOK, K., ARCHANA, V. and KUMAR, A. 2013. Accidental human poisoning with a neonicotinoid insecticide, imidacloprid: A rare case report from rural India with brief review of literature. *Egypt. J. Forensic. Sci.*

AL-SAYEDA, H. 2007. Transfert d'un insecticide systémique, l'imidaclopride, chez la tomate: implication du transport phloémien.

ALY. H., DOMENECH, O., ASHRAF, B. and ABDEL, N. 2009. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food. Chem. Toxicol.*, **47**: 1733-1738.

ANDERSON, R.A. and CAMERON, D.A. 2011. Pretreatment serum anti-mullerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**: 1336–1343.

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.*

ARKAM, F. 2013. Recherche d'indices d'inflammation subchronique et chronique chez les rats femelles de souche Wistar traités à l'imidaclopride. *Mémoire de Master. USDB.*

ARLA, 2001. Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Rapport d'évaluation. Page : 22.

AZEVEDO-PEREIRA, H.M.V.S., LEMOS, M.F.L. and SOARES, A.M.V.M. 2011. Behaviour and growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) under imidacloprid pulse and constant exposure scenarios. *Water Air Soil Pollut., 219:* 215–224.

AZEVEDO-PEREIRA, H.M.V.S., LEMOS, M.F.L. and SOARES, A.M.V.M. 2011. Effects of imidacloprid exposure on *chironomus riparius* meigen larvae. Linking acetylcholinesterase activity to behavior. *Ecotoxicology and Environmental Safety., 74:* 1210-1215.

BACCARELLI, A., PESATORI, A.C. and BERTAZZI, P.A. 2000. Occupational and environmental agents as endocrine disruptors: experimental and human evidence. *Journal of Endocrinological Investigation.,* Pages: 771-781.

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

BALANI, T. and AGGARWAL, A.M.M. 2011. Thaker, Hematological and biochemical changes due to short term oral administration of imidacloprid. *Toxicol. Int., 18:* 2–4.

BHARDWA. J, S., SRIVASTAVA, S.K, KAPOOR, U. and SRIVASTAVA, L.P. 2010. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological,

biochemical and histopathological evaluations. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1185–1190.

BOMANN, R. 1989a. Study for Acute Oral Toxicity to Mice. *Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany.*

BOMANN, R. 1989b. Study for Acute Oral Toxicity to Rats. *Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany.*

BOMHARD, E. and RINKE, M. 1994. Frequency of spontaneous tumors in Wistar rats in 2-year studies. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **46**: 17-29.

BOUDEGZDEM, N. 2012. 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.*

BOUKENOU, 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.*

BOUKERSI, 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.*

BRUNET, J-L., MARESA, M., FANTINI, J. and BELZUNCES, L. 2004. Human Intestinal Absorption of Imidacloprid with Caco-2 cells as Enterocyte Model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **194**: 1-9.

BUCKINGHAM, SD, LAPIED, B., CORRONC, H.L., GROLLEAU, F. and SATTELLE, D.B. 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Exp. Biol.*, **200**: 2685–92.

CHAO, S.L. and CASIDA, J.E. 1997: Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pest. Biochem. Physiol.*, **58**: 77-88.

CHEMHANDBOOK, 2002. *Chemical handbook. Case reports.*, Page: 12.

CHU, I., VILLENEUVE, DC., YAGMINAS, A., LECAVALIER, P., HAKANSSON, H. and AHLBORG, UG. 1995. Toxicity of PCB (tetrachlorobiphenyl) and PCB (pentachlorobiphenyl) in the rat following subchronic dietary exposure. *Fundamental and Applied Toxicology.*, **26**: 282–92.

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

COSTA, C., SILVARI, V., MELCHINI, A., CATANIA, S., HEFFRON, J.J., TROVATO, A. and DE PASQUALE, R. 2009. Genotoxicity of imidacloprid + in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.*, Pages: 40-44.

DEMSIA, G. D., VIASTOS, M. and GOUMENOU, D.P. 2007: Mathopoulos, Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxy in cultured human lymphocytes and rat bone marrow. *Mutat. Res.*, **634**: 32–39.

DJOUBER, F. 2011. Contribution à l'étude des effets sublétaux de l'imidaclopride sur la physiologie des ouvrières et des reines de l'abeille domestique (*apis mellifera intermissa*). *Mémoire de magister*. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

DUZGUNE, V. and ERDOGAN, S. 2012. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver and central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, Pages : 58–64.

EIBEN, R. 1991. Chronic and Carcinogenicity Studies on Wistar Rats (Administration in Food Over 24 Months). Supplementary MTD Study for Two-Year Study. *Department of Toxicology. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany.*

EL-GENDY. K.S., ALY, N.M., MAHMOUD, F.H., KENAWY, A. and EL-SEBAE, A.K., 2010. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food. Chem. Toxicol.*, **48**: 215-221.

FOLKMAN, M.J, LONG, D.M. and BECKER, F.F. 1963. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer.*, **16**: 453–467.

FRITZ, R. and HELLPOINTER, E. 1991. Degradation of pesticides under anaerobic conditions in the system water/sediment: Imidacloprid.

GABE, M. 1961. Techniques histologiques. *Masson et Cie (Eds), Paris.*, Pages: 1-1113.

GAWADE, L., SHRUTA, S., DADARKAR, B., HUSAIN, R. and GATNE. M. 2013. A detailed study of developmental immunotoxicity of imidacloprid in Wistar rats. *Environmental toxicology and pharmacology.* Pages: 408–418.

GOLDMAN, J.M., COOPER, R.L. and LAWS, S.C. 1990. Chlordimeform-induced alterations endocrine regulation within the male rat reproductive system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **22**: 467–472.

HADLEY, N.L, BANERJEE, M. and HAYDEN, J. 1995. Predictors of Recovery of Ovarian Function during Aromatase Inhibitor (AI) Therapy. *Cancer Research.*, Pages: 365-369.

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

HARMANDEEP, K.T, GURINDER, K.S. and KULDEEP, S.K. 2013. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, Pages: 1–4.

HERBOLD, B.A.1988b. Test on *S. Cerevisiae* D7 to Evaluate for Induction of Mitotic Recombination. *Institute of Toxicology. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany.*

HUANG, N.C, LIN, S.L., CHOU,C.H, HUNG,Y.M., CHUNG,H.M. and HUANG, S.T. 2006. Fatal ventricular fibrillation in a patient with acute imidacloprid poisoning. *Am. J. Emerg. Med.*, Pages: 883–885.

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

KAMRIN, M.A., CARNEY, E.W., CHON, K., CUMMINGS, A., DOSTAL, L.A. and HARRIS, C. 1994. Female reproductive and developmental toxicology: overview and current approaches. *Toxicol. Lett.*, **299**: 513–24.

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

KARL, W., KLEIN, O. and WEBER, H. 1991. [Pyridinyl-¹⁴C-methylene] Imidacloprid: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism in a Lactating Goat. *Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany.*

KHALDOUN, N. et KERKAR, N. 2010 : Contribution à la recherche 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.

KIDD, H. and JAMES, D.R. 1991. The agrochemicals handbook. *3rd edn. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK (as updated).*

KLEIN, O. 1987. [¹⁴C]-NTN 33893: Biokinetic Part of the "General Metabolism Study" In the Rat. *Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany.*

KLEIN, O. 1992. [Methylene-¹⁴C] Imidacloprid: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism in the Liver and Kidney of a Lactating Goat. *Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany.*

KLEIN, O. and BRAUNER, A. 1990. [Methylene-¹⁴C]-Imidacloprid: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism in Laying Hens. *Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany.*

KLEIN, O. and BRAUNER, A. 1991A. [Imidazolidine Methylene-¹⁴C]-Imidacloprid: Investigation on the Biokinetic Behavior and Metabolism in the Rat. *Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany.*

LARAMEE, S. 2007. L'abeille domestique comme bio-indicateur écotoxicologique de polluant, le cas de l'insecticide imidaclopride. *centre apicole de recherche et d'information, université catholique de louvain, louvain-la-neuve., Belgique.*

LARRY. P. 2001. Imidacloprid: a neonicotinid insecticide. In: Krieger RI, editor. *Handbook of pesticide toxicology. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press: 1123–30.*

LARRY. P. 2005. Imidacloprid: a neonicotinid insecticide. In: Krieger RI, editor. *Handbook of pesticide toxicology. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press. Pages: 1123–30.*

LEE, C.J., PARK, H.H., DO, B.R., YOON, Y. and KIM, J.K. 2000. Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary. *Anim. Reprod. Sci., 59: 109–117.*

LEKSIRI, N. et CHERIFI, N. 2010. Impact toxicologique d'un insecticide «Emamectine Benzoate» sur l'histologie du rein, des surrénales et des testicules chez le rat Wistar mâle.

LIVOLSI, V.A. and MERINO, M.J. 1978. Squamous cells in the human thyroid gland. *Am. J. Surg. Pathol., 2: 133–140.*

MANY, M.C., BACHRACH, L.K., FAYET, G., ERRICK, J., KUDLOW, J.E., COHEN, M.F. and BURROW, G.N. 1984. The effects of growth factors and serum on DNA synthesis and differentiation in thyroid cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol., 38: 141–150.*

MAPAQ, 2012. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. Impact des traitements de semences sur les insectes ravageurs.

MATSUDA. K. and SATTELLE. D.B. 2005. Mechanism of selective actions of neonicotinoids on insect acetylcholine receptors. In: Clark JM, Ohkawa H, editors. *New discoveries in agrochemicals: American chemical society symposium series. 3rd ed. Oxford, UK: Oxford University., Page: 172–83.*

MEISTER, R.T. 1995. Farm chemicals handbook 95. *Meister Publishing Company, Willoughby, OH, USA.*

MENCKE, N. and JESCHKE, P. 2002. Therapy and prevention of parasitic insects in veterinary medicine using imidacloprid. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**: 701–715.

MOHAMED, F., GAWARAMMANA, I., ROBERTSON, T.A., ROBERTS, MS., PALANGASINGHE, C. and ZAWAHIR, S. 2009. Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *Journal pone*. **6** (1): 77–78.

MOHANY, M., BADR, G., REFAAT, I. and EL-FEKI, M. 2011. Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, Page: 2106-2114.

NAJAFI, G., RAZI, M., HOSHYAR, A., SHAHMOHAMADLOO, S. et FEYZI, S. 2010. The Effect of Chronic Exposure with Imidacloprid Insecticide on Fertility in Mature Male Rats. *International Journal of Fertility and Sterility.*, Pages: 9-16.

NAYAK, S.K., PAI, P.K., NAIK, R. et RAO, V.S. 2002. Extensive squamous metaplasia in nodular goiter – a diagnostic dilemma in the fine needle aspiration (FNA) cytology a case report. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, **45** : 111–113.

PALANI, V., SENTHIKUMARAN, R.K. et GOVINDAWAMY, S. 1999. Biochemical evaluation of antitumor effect of Muthu marunthu (a herbal formulation) on experimental fibrosarcoma in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **65**: 257-265.

PAULUHN, J. 1988a. Study for Acute Inhalation Toxicity in the Rat. *Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany.* Pages: 51950-0002.

PAULUHN, J. 1988b. NTN 33893 Study for Irritant/Corrosive Potential on the Skin (Rabbit). *Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany.*

PAVEL, et al. 2011. Greffes trachéales : options actuelles. *Revue médicale Suisse.*, Pages: 1924-8.

PELLETIER, N. 2010. Le déclin des populations d'abeilles au Québec : causes probables, impacts et recommandations. *Centre universitaire de formation en environnement Université de Sherbrooke.*

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.

RAMAZAN, B., NAZIROĞLU, M., TÜRK3, G., YILMAZ, O., KULOĞLU,T., ETEM, E. and BAYDAS, G. 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell. Biochem. Funct.*, **30** (6): 492-9.

SCHOLZ, K. 1992. Degradation of NTN 33893 in soil with ground cover. *Bayer AG, Leverkusen, Germany.*

SCHROEDER, M.E. and FLATTUM, R.F. 1984. The mode of action and neurotoxic properties of the nitroethylene heterocycle insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **22**: 148–60.

SHADNIA. S. and MOGHADDAM. H.H. 2008. Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *America Journal of Emergency Mededine.*, **26** (5): 634.

SHIMOMURA. M., IHARA. M., MATSUDA, K., OTAKE, M., KUWAMURA, M., KOMAI, K., AKAMATSU, M., RAYMOND, V. and SATTELLE, DB. 2002. Diverse actions of neonicotinoids on chicken and *Drosophila*-chicken and hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed. *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology.*, **45**: 133–144.

SMEDS, S. and WOLLMAN, S. 1983. H-Thymidine labeling of endothelialcells in thyroid arteries, veins and lymphatics during thyroid stimulation. *Laboratory Investigation.* **48**: 285–291.

STOKER, C.R. et al., 1993. The Physical and Chemical Properties and Resource Potential of Martian Surface Soils, in *Lewis, J., Matthews, M.S., and Guerrieri, M.L., Editors, Resources of Near-Earth Space, University of Arizona Press.*

SONMEZER, M. and OKTAY, K. 2006. Fertility preservation in young women under-going breast cancer therapy. *Oncologist.*, **11**: 422–34.

SUCHAIL, S., GUEZ, D. and BELZUNEEES, L. P. 2009. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.*, **20**: 2482-2486.

- TANG, J.M., LI, W., XIE, Y.C., GUO, H.W., CHENG, P., CHEN, H.H., ZHENG, X.Q., JIANG, L., CUI, D., LIU, Y., DING, G.X. and DUAN, Y. 2013.** Morphological and functional deterioration of the rat thyroid following chronic exposure to low-dose PCB118. *Experimental and Toxicologic Pathology.*, **65**: 989– 994.
- TIEMANN, U. 2008.** In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammal. *Reprod. Toxicol.*, **25** (3):316–326.
- TEBOURBI, O., HALLÈGUE, D., YACOUBI, M.T., SAKLY, M and RHOUMA, K.B. 2010.** Subacute toxicity of p,p'-DDT on rat thyroid: Hormonal and histopathological changes. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **29**: 271-279.
- TOMIZAWA, M. and CASIDA, J.E. 1999.** Minor structural changes in nicotinic insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **127**(1): 115–22.
- TOMIZAWA, M. and CASIDA, J.E. 2005.** Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**: 247–268
- TOMIZAWA, M. 2001:** Toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, **48**: 339-364.
- TOMIZAWA, M. and CASIDA, J.E. 2003.** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, **48**: 339-364.
- TOMLIN CDS. 2006.** The pesticide manual, a world compendium. *14th ed. Surry, England: British Crop Protection Council.*, Pages: 598–9
- VANVEEN, J. E. and HAWLEY, R.S. 2003.** Meiosis: when even two is a crowd. *Curr Biol.*, **13** (21): 831-3.
- VILLANGER, G.D, LYDERSEN, C., KOVACS, K.M., LIE E, SKAARE, J.U. and JENSSEN, B.M. 2011.** Disruptive effects of organohalogen contaminants on thyroid function in white whales (*Delphinapterus leucas*) from Svalbard. *Science of the Total Environment.*, **409**: 2511–2524.

WATANABE, M. 1990. NTN 33893. Rec Assays with Spores in the Bacterial System. *Basic Research Division, Hino Institute., Toxicological Research Laboratory, Japan.*

WATTS, M. 2011: Highly hazardous pesticides: Neonicotinoids. Pesticide Action Network Asia and the Pacific.

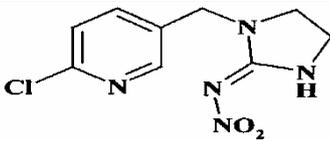
YAMAMOTO.I. and CASIDA, J.E. 1999. Nicotinoide insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. *Springer-Verlag. Tokyo.* Page: 300.

YEH, I.J., LIN, T.J. and HWANG, D.Y. 2010. Acute multiple organ failure with imidacloprid and alcohol ingestion. *Am. J. Emerg. Med., 28:* 255-253.

YOSHIDA, H. 1990. Photodegradation of NTN 33893 on soil. *Miles Inc. (Mobay) Premise Termiticide., 56:* 548-559.

ANNEXES

Tableau I : Propriétés physicochimiques de l'imidaclopride

| Paramètres | Valeur |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aspect | cristaux sans couleur avec une odeur caractéristique faible |
| Formule Brute | C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂ |
| Structure |  |
| Poids moléculaire | 255,7 g/mol |
| Densité | 1,543 g/cm ³ |
| Solubilité dans l'eau | 0,61 g/l (20 °C) |
| Solubilité dans d'autres solvants | dichlorométhane 50,0-100,0 g/l ; isopropanol 1,0 g/l ; toluène 0,5-1,0 g/l ; n-hexane < 0,1 g/l |
| Point de fusion | 143,8 °C (forme en cristal 1) 136,4 °C (forme en cristal 2) |
| Pression de vapeur | 4,10-7mPa (20 °C) |
| Henry | 2,10-10Pa m ³ /mol |
| Coefficient de partage carbone organique /eau | 247 cm ³ /g |
| Coefficient de partage octanol/eau | 0,57 |
| Durée de demi-vie (DT50) | 180 jours |
| DL50 rat (♀) | 440 mg/kg |
| DJA | 0,06 mg/kg/j |
| CAS N° | 138261-41-3 |

(LARAMEE, 2007 ; AL-SAYEDA, 2008)

Tableau II : Composition des bouchons alimentaires

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

1. Matériel et réactifs

Les cages à rats

Seringue et aiguille de gavage

L'insecticide : Imidaclopride

La Trousse à dissection

Tube EDTA

Liquide de fixation « Bouin aqueux »

Les cassettes en plastique

Les moules en métal (port-cassette).

Les lames porte-objet et lamelles

Les porte-lames

Graveur.

Boîtes de coloration

Alcool (100 °,96°, 70° et 50°)

Xylène

La Gélatine à 4%

Liquide de montage (Eukitt)

Colorants topographiques

Autres produits : acide acétique, acide sulfurique, acide phosphomolybdique, acide phosphotungstique.

2. KITS DE DOSAGE

- Dosage de FT3

| |
|----------------------------------------------------------------------------|
| M |
| Microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/mL |
| Conservateur |
| R1 |
| anticorps (monoclonaux de mouton) anti-T3 marqués au ruthénium 10 ng/mL |
| tampon phosphate 100 mmol/L |
| pH 7,0 |
| Conservateur |
| R2 |
| T3 marquée à la biotine 2 ng/mL |
| tampon phosphate 100 mmol/L |
| pH 7,0 |
| Conservateur |

- Dosage de FT4

| |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| M |
| Microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/mL Conservateur |
| R1 |
| anticorps (polyclonaux de mouton) anti-T4 marqués au ruthénium 50 ng/mL |
| tampon phosphate 100 mmol/L pH 7,0 Conservateur |
| R2 |
| biotinylée 2,5 ng/mL tampon phosphate 100 mmol/L pH 7,0 Conservateur |

- Dosage de TSH

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M |
| Microparticules tapissées de streptavidine 0,72 mg/mL Conservateur |
| R1 |
| Anticorps (monoclonaux de souris) anti-TSHbiotinylé 2.0ng/mL |
| tampon phosphate 100 mmol/L pH 7,2 Conservateur |
| R2 |
| Anticorps monoclonal (souris/humain) marqué au ruthénium 1,2ng/mL tampon phosphate 100 mmol/L pH 7,2 Conservateur |

3. Appareillage

Balance électronique

Balance de précision

Centrifugeuse

Micro pipette de 1000 µl, 100 µl et 10 µl

Etuve à 37°

Spectrophotomètre

Distributeur de paraffine de type « Leica »

Platine refroidissante de type « Leica »

Microtome de type « Leica »

Bain Marie de type « Firlabo »

Microscope photonique de type « Leica »

Batteries de coloration



Balance électronique



Cage d'expérimentation



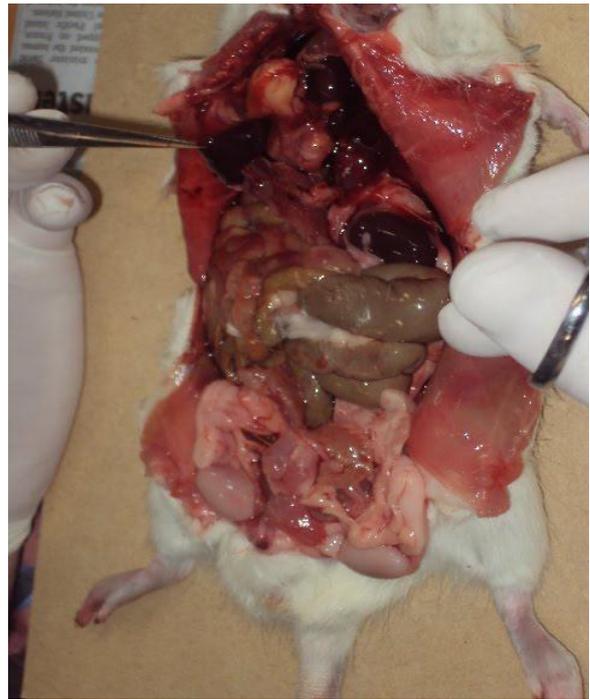
Aiguille de gavage



Gavage



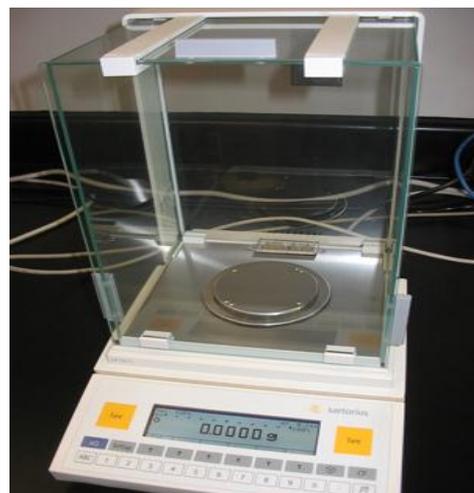
Trousse à dissection



Dissection et prélèvement des organes



Tubes EDTA



Balance de précision



Centrifugeuse



Micropipettes



Cassettes en plastique



Moules



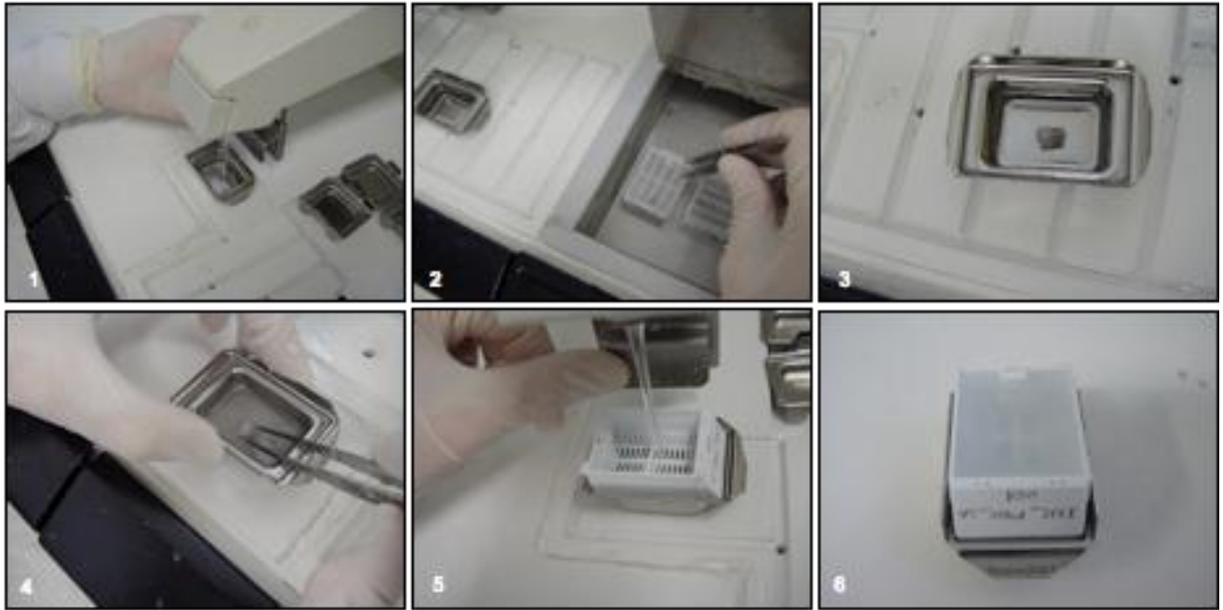
Boite de coloration et portoir



Bains d'alcools et de xylène
Déshydratation



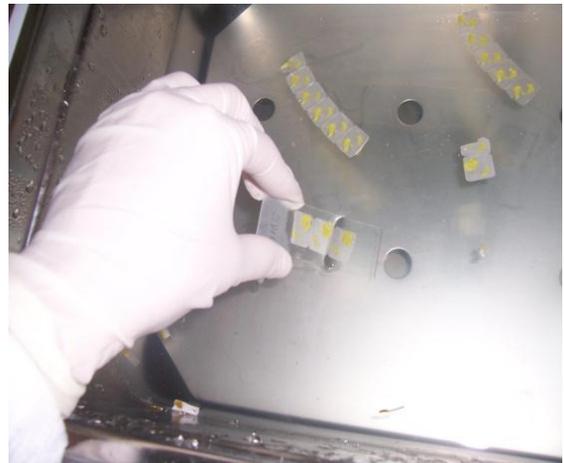
Distributeur de paraffine avec platine refroidissante « Leica »



Confection des blocs de paraffine



Microtome « Leica »
Confection des rubans



Bain Marie
Mise en lames



Rubans collés sur des lames gélatinées



Séchage dans l'étuve à 37°C



Bains (xylène – Alcool – colorants)
Déparaffinage, réhydratation et coloration



Montage des lames colorées à
l'Eukitt



Microscope photonique « Leica »

Observation



Analyseur Elecsys 1010

4. Fiches techniques:**4.1. Fiche technique N°1 : Fixation**

Solution de Bouin (MARTOJA,1968)

Solution aqueuse saturée d'acide picrique 75 ml

Formol 20 ml

Acide acétique 5 ml

4.2. Fiche technique N°2 : Collage des rubans

Gélatine (MARTOJA,1968)

Gélatine en poudre 4 g

Eau distillée100 ml

4.3. Fiche technique N°3 : Préparation des colorants (Gabe, 1968)**4.3.1. Hemalun de Hansen**

- Dissoudre à chaud 1 g d'hématoxyline dans 10 ml d'eau distillée ;
- Dissoudre à chaud 20 g d'alun de potassium dans 200 ml d'eau distillée ;
- Laisser reposer une nuit ;
- Mélanger les deux solutions, y additionner 0,177 g de permanganate de potassium ;
- Porter le mélange à ébullition, celle-ci étant maintenue pendant une minute ;
- Laisser refroidir et filtrer.

4.3.2. Hématoxyline de Groat

- Dissoudre 1 g d'alun de fer dans 50 ml d'eau distillée ;
- Y ajouter 0,8 ml d'acide sulfurique ;
- Dissoudre 0,5 g d'hématoxyline dans 50 ml d'alcool à 96°
- Mélanger les deux préparations et filtrer.

4.3.3. Fuchsine-ponceau

- Dissoudre 0,2 g de ponceau et 0,1 g de fuchsine acide dans 300 ml d'eau distillée
- Y ajouter 0,6 ml d'acide acétique.

4.3.4. Orange G- acide phosphomolybdique

- Dissoudre 3 à 5 g d'acide phosphomolybdique dans 100 ml d'eau distillée
- Y ajouter 2 g d'orange G

4.3.5. Bleu d'aniline

- Dissoudre 2 à 3 g de bleu d'aniline dans 100 ml d'eau bouillante ;
- Ajouter 2,5 ml d'acide acétique ;
- Laisser refroidir et filtrer.

4.3.6. Solution aqueuse saturée d'azocarmin G

- Dissoudre entre 0,05 et 0,1 g d'azocarmin G dans 100 ml d'eau distillée ;
- Acétifier la solution à raison de 1 à 2 ml d'acide acétique.

4.3.7. Alcool aniliné

- Ajouter à 1 ml d'aniline, 100 ml d'alcool à 70°.

4.3.8. Alcool acétique

- Ajouter à 1 ml d'acide acétique, 100 ml d'alcool à 96°.

4.3.9. Solution aqueuse d'acide phosphotungstique

- Dissoudre 5 mg d'acide phosphotungstique dans 100 ml d'eau distillée.

4.3.10. Bleu de Heidenhain

- Dissoudre à chaud 0,5 g de bleu d'aniline et 2 g d'orange G dans 100 ml d'eau distillée ;
- Laisser refroidir et y ajouter 8 ml d'acide acétique ;
- Pour l'usage, diluer avec 2 ou 3 volumes d'eau distillée.

5. Calcul statistique

5.1. La moyenne

Soit $x_1, x_2, x_3, \dots, \dots, \dots, x_n$ une suite fini 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

5.2. L'écart type

L'écart type est la racine carrée de la variance.

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

δ : L'écart type

ν : La variance

5.3. La variance

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

$$\nu = \frac{\sum (x_i - m)^2}{n}$$

ν : La variance

n : L'effectif

m : La moyenne arithmétique

x : Caractère quantitatif

5.4. 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" :

$$S = \left[\frac{n_1 \delta_1^2 + n_2 \delta_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]^{1/2}$$

En suite "écart réduit" :

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

t : L'écart réduit.

m_1 : La moyenne arithmétique de l'échantillon 1

m_2 : La moyenne arithmétique de l'échantillon 2

S : La variance commune estimée

n_1 : Nombre d'échantillon 1

n_2 : Nombre d'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.

Tableau IX: Table de Student.

| $\alpha\%$ ddl | 20% | 10% | 5% | 2% | 1% | 0,10% |
|-------------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| 1 | 3,078 | 6,314 | 12,706 | 31,821 | 63,657 | 636,619 |
| 2 | 1,886 | 2,92 | 4,303 | 6,965 | 9,925 | 31,598 |
| 3 | 1,638 | 2,353 | 3,182 | 4,541 | 5,841 | 12,924 |
| 4 | 1,533 | 2,132 | 2,776 | 3,747 | 4,604 | 8,61 |
| 5 | 1,476 | 2,015 | 2,571 | 3,365 | 4,032 | 6,869 |
| 6 | 1,44 | 1,943 | 2,447 | 3,143 | 3,707 | 5,959 |
| 7 | 1,415 | 1,895 | 2,365 | 2,998 | 3,499 | 5,408 |
| 8 | 1,397 | 1,86 | 2,306 | 2,896 | 3,355 | 5,041 |
| 9 | 1,383 | 1,833 | 2,262 | 2,821 | 3,25 | 4,781 |
| 10 | 1,372 | 1,812 | 2,228 | 2,764 | 3,169 | 4,587 |
| 11 | 1,363 | 1,796 | 2,201 | 2,718 | 3,106 | 4,437 |
| 12 | 1,356 | 1,782 | 2,179 | 2,681 | 3,055 | 4,318 |
| 13 | 1,35 | 1,771 | 2,16 | 2,65 | 3,012 | 4,221 |
| 14 | 1,345 | 1,761 | 2,145 | 2,624 | 2,977 | 4,14 |
| 15 | 1,341 | 1,753 | 2,131 | 2,602 | 2,947 | 4,073 |
| 16 | 1,337 | 1,746 | 2,12 | 2,583 | 2,921 | 4,015 |
| 17 | 1,333 | 1,74 | 2,11 | 2,567 | 2,898 | 3,965 |
| 18 | 1,33 | 1,734 | 2,101 | 2,552 | 2,878 | 3,922 |
| 19 | 1,328 | 1,729 | 2,093 | 2,539 | 2,861 | 3,883 |
| 20 | 1,325 | 1,725 | 2,086 | 2,528 | 2,845 | 3,85 |
| 21 | 1,323 | 1,721 | 2,08 | 2,518 | 2,831 | 3,819 |
| 22 | 1,321 | 1,717 | 2,074 | 2,508 | 2,819 | 3,792 |
| 23 | 1,319 | 1,714 | 2,069 | 2,5 | 2,807 | 3,767 |
| 24 | 1,318 | 1,711 | 2,064 | 2,492 | 2,797 | 3,745 |
| 25 | 1,316 | 1,708 | 2,06 | 2,485 | 2,787 | 3,725 |
| 26 | 1,315 | 1,706 | 2,056 | 2,479 | 2,779 | 3,707 |
| 27 | 1,314 | 1,703 | 2,052 | 2,473 | 2,771 | 3,69 |
| 28 | 1,313 | 1,701 | 2,048 | 2,467 | 2,763 | 3,674 |
| 29 | 1,311 | 1,699 | 2,045 | 2,462 | 2,756 | 3,659 |
| 30 | 1,31 | 1,697 | 2,042 | 2,457 | 2,75 | 3,646 |
| | | | | | | |
| ∞ | 1,282 | 1,645 | 1,96 | 2,326 | 2,576 | 3,291 |

Tableau X: Dilution des alcools (d'après la table de GAY-LUSSAC).Quantité d'eau en cm³ à ajouter à 100 cm³ d'alcool à diluer

| Concentration finale | Concentration initiale | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 100 | 99 | 98 | 97 | 96 | 95 | 90 | 85 | 80 | 75 | 70 | 65 | 60 |
| 95 | 6,5 | 5,15 | 3,83 | 2,53 | 1,25 | | | | | | | | |
| 90 | 13,3 | 11,8 | 10,4 | 9,07 | 7,73 | 6,41 | | | | | | | |
| 85 | 20,5 | 19,1 | 17,6 | 16,2 | 14,7 | 13,3 | 6,56 | | | | | | |
| 80 | 28,6 | 27 | 25,5 | 24 | 22,5 | 21 | 13,8 | 6,83 | | | | | |
| 75 | 37,6 | 35,9 | 34,3 | 32,7 | 31,1 | 29,5 | 21,9 | 14,5 | 7,2 | | | | |
| 70 | 47,8 | 46 | 44,3 | 42,5 | 40,9 | 39,2 | 31,1 | 23,1 | 15,4 | 7,64 | | | |
| 65 | 59,4 | 57,5 | 55,6 | 53,8 | 52 | 50,2 | 41,5 | 33 | 24,7 | 16,4 | 8,15 | | |
| 60 | 72,8 | 70,8 | 68,8 | 65,9 | 64,9 | 63 | 53,7 | 44,5 | 35,4 | 26,5 | 17,6 | 8,76 | |
| 55 | 88,6 | 86,4 | 84,3 | 82,2 | 80,1 | 78 | 67,9 | 57,9 | 48,1 | 38,3 | 28,6 | 19 | 9,47 |
| 50 | 107 | 105 | 103 | 100 | 98,2 | 95,9 | 84,7 | 73,9 | 63 | 52,4 | 41,7 | 31,3 | 20,5 |
| 45 | 130 | 128 | 125 | 123 | 120 | 118 | 105 | 93,3 | 81,4 | 69,5 | 57,8 | 46,1 | 34,5 |
| 40 | 159 | 156 | 153 | 150 | 147 | 144 | 131 | 117 | 104 | 90,8 | 77,6 | 64,5 | 51,4 |
| 35 | 195 | 191 | 188 | 185 | 182 | 179 | 163 | 148 | 133 | 118 | 103 | 87,9 | 73,1 |
| 30 | 242 | 239 | 235 | 231 | 228 | 224 | 206 | 189 | 171 | 154 | 136 | 119 | 102 |
| 25 | 309 | 305 | 300 | 296 | 292 | 287 | 266 | 245 | 224 | 204 | 183 | 162 | 142 |
| 20 | 409 | 403 | 398 | 392 | 387 | 382 | 356 | 330 | 304 | 278 | 253 | 227 | 201 |
| 15 | 575 | 567 | 561 | 554 | 547 | 540 | 505 | 471 | 437 | 403 | 369 | 335 | 301 |
| 10 | 907 | 897 | 886 | 876 | 865 | 855 | 805 | 754 | 703 | 652 | 602 | 551 | 501 |

Tableau IV : Valeurs des poids corporels (g) des rats femelles adultes témoins et traités avant et après l'expérimentation.

| Rats | Poids corporel (g) | | | | | |
|-----------------|--------------------|---------------|-------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | Témoins | | Traités 1/85 DL50 d'IMI | | Traités 1/120 DL50 d'IMI | |
| | Début | Fin | Avant | Après | Avant | Après |
| 1 | 143,00 | 186,00 | 137,80 | 209,07 | 157,00 | 200,00 |
| 2 | 142,40 | 206,18 | 124,50 | 180,26 | 145,00 | 169,00 |
| 3 | 124,60 | 187,15 | 108,20 | 144,97 | 173,00 | 216,00 |
| 4 | 120,20 | 176,32 | 115,40 | 173,82 | 136,00 | 179,00 |
| 5 | 93,40 | 162,25 | 121,20 | 131,61 | 125,00 | 162,00 |
| 6 | / | / | 104,70 | 180,33 | 173,00 | 213,00 |
| 7 | / | / | 110,00 | 193,09 | 137,00 | 171,00 |
| 8 | / | / | 107,00 | 178,40 | / | / |
| 9 | / | / | 117,60 | 175,62 | / | / |
| 10 | / | / | 103,50 | 166,70 | / | / |
| Moyenne | 124,72 | 183,58 | 114,99 | 173,39 | 149,43 | 187,14 |
| ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| écartype | 20,30 | 16,10 | 10,69 | 22,07 | 18,80 | 22,19 |

Tableau V : Valeurs moyennes des poids corporels (g) chez les rats femelles adultes témoins et traités et leur signification.

| Lots des rats | Témoins (n=5) | | Traités 1/85 DL50 d'IMI (n=10) | | Traités 1/120 DL50 d'IMI (n=7) | |
|-------------------------|-----------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------|---------------|
| | Début | Fin | Avant | Après | Avant | Après |
| Moyenne | 124,72 | 183,58 | 114,99 | 173,39 | 149,43 | 187,14 |
| ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± |
| écartype | 20,30 | 16,10 | 10,69 | 22,07 | 18,80 | 22,19 |
| Ecart réduit (t) | ddl = 4 T = 13,22 Tlim = 2,776 | | ddl = 9 T = 8,714 Tlim = 2,262 | | ddl = 6 T = 14,32 Tlim = 2,447 | |
| % de risque (p) | p < 0,05 | | p < 0,05 | | p < 0,05 | |
| Différence | Hautement significative | | Hautement significative | | Hautement significative | |

Tableau VI : Gain du poids corporel en pourcentage (P%).

| Gain en Poids Corporels (%) | | | |
|-----------------------------|--------------|-------------------------------|--------------------------------|
| N° | Témoins | Traités avec 1/85 DL50 IMI | Traités avec 1/120 DL50 IMI |
| 1 | 30,07 | 51,72 | 27,39 |
| 2 | 44,79 | 44,79 | 16,55 |
| 3 | 50,20 | 33,98 | 24,86 |
| 4 | 46,69 | 50,62 | 31,62 |
| 5 | 73,72 | 8,59 | 29,60 |
| 6 | | 72,23 | 23,12 |
| 7 | | 75,54 | 24,82 |
| 8 | | 66,73 | |
| 9 | | 49,34 | |
| 10 | | 61,06 | |
| Pourcentage (P%) | 49,09 | 51,46 | 25,42 |

Tableau VII : Valeurs des taux plasmatiques de la thyroestimuline (TSH), de la triiodothyronine libre (FT3) et de la thyroxine libre (FT4) chez les rats femelles adultes témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI.

| Rats | FT3 (pmol/l) | | FT4 (pmol/l) | | TSH (μ UI/ml) | |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| | Témoins | Traités à 1/85 DL50 d'IMI | Témoins | Traités à 1/85 DL50 d'IMI | Témoins | Traités à 1/85 DL50 d'IMI |
| 1 | 7,96 | 6,24 | 36,05 | 29,44 | < 0,005 | < 0,005 |
| 2 | 8,9 | 7,33 | 39,86 | 25,66 | < 0,005 | < 0,005 |
| 3 | 5,36 | 6,99 | 27,65 | 28,81 | < 0,005 | < 0,005 |
| 4 | 6,32 | 5,05 | 32,48 | 24,56 | < 0,005 | < 0,005 |
| 5 | 4,99 | 4,77 | 21,61 | 23,71 | < 0,005 | < 0,005 |
| 6 | / | 7,06 | / | 25,96 | / | < 0,005 |
| 7 | / | 6,85 | / | 26,51 | / | < 0,005 |
| 8 | / | 4,87 | / | 21,68 | / | < 0,005 |
| 9 | / | 7,62 | / | 23,45 | / | < 0,005 |
| 10 | / | 4,61 | / | 25,36 | / | < 0,005 |
| Moyenne ± écartype | 6,81 ± 1,67 | 6,01 ± 1,17 | 30,17 ± 7,55 | 24,33 ± 5,76 | < 0,005 | < 0,005 |

Tableau VIII : Valeurs moyennes de la thyrostimuline (TSH), de la triiodothyronine libre (FT3) et de la thyroxine libre (FT4) chez les rats femelles adultes témoins et traités avec 1/85 DL50 d'IMI et leur signification.

| Lots des rats | FT3 (pmol/l) | | FT4 (pmol/l) | | TSH (μ UI/l) | |
|------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------|
| | Témoins | 1/85 DL50 d'IMI | Témoins | 1/85 DL50 d'IMI | Témoins | 1/85 DL50 d'IMI |
| Effectif | n=5 | n=10 | n=5 | n=10 | n=5 | n=10 |
| Moyenne \pm écartype | 6,81 \pm 1,67 | 6,01 \pm 1,17 | 30,17 \pm 7,55 | 24,33 \pm 5,76 | < 0,005 | < 0,005 |
| Ecart réduit (t) | ddl = 13 T = 0,985 Tlim = 2,228 | | ddl = 13 T = 1,526 Tlim = 2,228 | | ddl = 13 T \approx 0 Tlim = 2,228 | |
| % de risque (p) | p > 0,05 | | p > 0,05 | | p > 0,05 | |
| Différence | Non significative | | Non significative | | Non significative | |