

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida -1-

Faculté de science de la nature et de la vie
Département de biologie et de physiologie cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

De Master en sciences biologiques

Option : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Thème

**Etude Histologique et Immunohistologique du
cervelet et de l'hippocampe chez le Lapin Traité par
la Doramectine**

Présenté par :

M^{elle} ROUAZ Nabila

M^{elle} SALMI Wassila

Soutenu le: 02/07/2018

Devant le jury:

M ^{me} BENAZOUZ F.	MAA	UB 1	Présidente
M ^{me} MATAOUI H	MCB	UB 1	Examinatrice
M ^{me} BOKRETA S.	MAA	UB 1	Promotrice
M ^{me} BOUZID N.	MAA	CHU Pernet	Co-promotrice
M ^{me} SAADI L.	MCA	UB1	Chef d'option

Promotion : 2017-2018

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour bien mener ce travail.

*Un grand Merci à notre promotrice **M^{me} BOKRETA**. qui a suivi attentivement la progression de notre travail, pour ses conseils et sa patience.*

*Nous tenons à exprimer tout notre reconnaissance et notre profond respect pour notre co-promotrice **Dr BOUZID** pour nous avoir guidées tout au long de notre expérimentation*

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

***M^{me} BENAZOUZ F.** Maitre assistante A à UBI ,nous faire honneur en acceptant de présider le Jury de ce mémoire, Soyez assuré de notre vive reconnaissance et de notre profond respect.*

*Nous voudrais également remercier **M^{me} MATAOUI H.** Maitre de conférence B à UBI , pour l'examinassion de notre travail, Veuillez accepter nos remerciements ainsi que le témoignage de notre respect et notre gratitude.*

Nous ne pouvons pas terminer sans remercier tous les enseignants ayant participé à notre formation durant les cinq années de nos études.



Dédicace

A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A l'être qui m'est plus cher au monde,

A ma mère, à qui aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve pour elle. Puisse ce travail être la récompense de tes soutiens moraux et de tes sacrifices. Que dieu te garde et t'accorde. Une parfaite santé et bonheur en permanence. Pour que tu restes la splendeur de ma vie.

A mon père, qu'ils trouvent dans ce travail le fruit de ses sacrifices consentis pour mon éducation et l'expression de mon amour et de ma gratitude pour bienveillance dont m'a toujours entourés. Puisse dieu te prêter longue vie, santé et bonheur .

A mes sœurs

Hanane et son mari Samir

Wafa et son mari Ali et son fils Abdealrahman

A mes chères frères

Yasser, Aymen et Akram

Je prie Dieu le tout puissant de vous accorder santé, et beaucoup de bonheur.

A ma binome Wassila Salmi et toute sa famille.

A Ismaïl MESSAFER et toute sa famille.

A tous mes amis : Souad , Nabila, Aïcha, Fatiha et fatima.....

Nabila. R



Dédicace

*A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail
que je dédie:*

*A ma chère mère, En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti
pour moi durant mes années d'études. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait
exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.*

*A mon père, vous étiez toujours là pour me soutenir, me réconforter et
m'encourager. Tous les mots ne suffiraient pas... Sans vous, rien n'aurait été
possible, merci pour votre soutien et votre amour.*

*A mes sœurs : Nadhira , Yasmina et son mari Fethi et leur adorable fille
Salsabil*

*A mes frères : Salim et Abdelmoumen. Et surtout mon grand-père. Qu'ils
trouvent ici tout ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études. En
témoignage de mon profond amour: Je vous
souhaite une belle vie.*

*Je dédie ce travail à mes tantes Khadija avec son mari Aïssa et leurs belles filles
Maria*

*En particulier à ma binôme Nabila ROUAZ qui m'encourage tout au long de
l'année .*

*Je dédie ce travail à mes copines Fatiha et Faïza.
Sans oublier mes chères amies Souad , Aïcha , Nesrine, Fatima et Imene.*

A tous mes collègues de la promotion de master II de BMC 2018.

Wassila. S

Résumé

La présente étude pharmaco-toxicologique a porté sur l'étude de la neurotoxicité d'un médicament vétérinaire « la doramectine » administré par injection sous cutanée hebdomadairement pendant 28 jours à des lapins mâles d'une souche locale *Oryctolagus cuniculus*. Les animaux traités ont été répartis en quatre lots (Témoins, Traité par la double dose thérapeutique, Traité par 5x DT, Traité par 10x DT) afin d'évaluer l'effet du traitement sur l'histopathologie de cerveau et de cervelet.

L'exposition subaiguë à la doramectine a provoqué des changements dégénératifs modérés à sévères dans l'hippocampe et le cervelet chez les lapins de lots 3 et 4. Les coupes histologiques de l'hippocampe après administration d'une forte dose (10 mg/kg), ont présentés une désorganisation des cellules nerveuses, un œdème important avec congestion des vaisseaux sanguins. Certains cellules nerveuses sont rétractées, d'autres sont éclatées. En outre, il y avait un œdème interstitiel, une rétraction et des dégénérescences des cellules de Purkinje. L'analyse immunohistochimique du cervelet chez les lapins traités par la doramectine à forte dose a montré de nombreux neurones avec une forte réaction immunitaire positive à l'anticorps Bcl2 dans leur cytoplasme et leur noyau.

A l'issus de ces résultats, nous pouvons conclure que l'administration répétée de la doramectine entraîne des altérations histologiques au niveau de système nerveux central. Ces altérations sont plus au moins importantes et s'accroissent en fonction de la dose administrée.

Mots clés : Doramectine, Toxicité subaiguë, Hippocampe, Cervelet, Etude histologique, Etude immunohistochimique, Lapin.

Abstract

The present pharmaco-toxicological study aims to evaluate the neurotoxicity of a veterinary drug "doramectin" administered by subcutaneous injection for 28 days to male rabbits of local strain "*Oryctolagus cuniculus*". The treated animals were divided into four groups (Controls, Treated by Double Therapeutic Dose, Treated by 5x TD, Treated by 10x TD) in order to assess the effect of the treatment on the histopathology of brain and cerebellum.

The subacute exposure to doramectin caused moderate to severe degenerative changes in the hippocampus and cerebellum in rabbits of group 3 and 4. Histological sections of the hippocampus after administration of a high dose (10 mg / kg) have shown disorganization of nerve cellular architecture, an important edema with the presence of congested blood vessels. Some nerve cells are retracted, others are disrupted. In addition, an interstitial edema, retraction and degeneration of Purkinje cells were noted. Immunohistochemical analysis of the cerebellum in rabbits treated with high dose of doramectin revealed many neurons with a strong positive response to the Bcl2 antibody in their cytoplasm and nucleus.

In conclusion, these results suggest that repeated administration of doramectin causes histological alterations in the central nervous system. These alterations are less or more important and increase according to the dose administered.

Keywords: Doramectin, Subacute toxicity, Hippocampus, Cerebellum, Histological study, Immunohistochemical study, Rabbit.

لمخص

تتأخر على دراسة سمية الأديرة في دريل لس سمية ال عجيبة من لدواء البيطري "دورالمخين" التي تدار من خلال ال تخنت تحتال لمجداً يسوع ال مدة 28 يوم في كور الأرب من سل ال للمحلية *Oryctolagus cuniculus* .
تتسري ال ميونات ال ملج ال إلى رب عوفعات للشوا هدمت ملج مع ال جرعة ال عجيبة ال مزدوجة م خ ال ال 5x DT . من ال ال 0x DT يطبقم تتأير ال ال ع على ك شريح من لدم اغ وللم مخخ.

التعرضت تحت ل ا ح ال دور المخين حفز التغيرات التوكسرية معدلة إلى حاد في ال حرين ولم مخي تخيدفعات من الأرب 3 و 4. المقاطع ال سي مي أقل حري ب عد إعطاء جرعة غليية (10 ملغم / كغم) ، عرض خ ل في ال ال عجيبة ، وذمة هامة مع ال از دح افي الأويجة لدموية تم س ح ب عض ل خ ال عجيبة ، و حزنه لي جر . ب الإضافة إلى ذلك ، كان فاك وذم فراغية ، تراجع ول ح طط خ ال Purkinje . أظهرت لي ال العن اعط لم مخخ عدد الأرب ال ملج ب جرعات غليية من لدور المخين تظهر ال عي د من الأعصاب مع سات مجدة من العجة إي مجية ق ي أقل جسم ال حن اد Bcl2 ال سي و ال زم ولنواة.

م خ ال م ذلك المتطوع هي لمنا أن س نتج أن إ ل درار ال مكررة دور المخين تسببت عد التري في ال ج ه ال عجيبي ال مركزي . هذه ال عدالت هي أكثر أو قل أهية وتلزم ق ل ال جرعة ال مدارة .

للمامات ال محتجية : دور المخين ، سمي فتحت حادة ، ال حرين ، ال مخخ ، دريل ق سي عجة ، دراسة من عجة ، الأرب .

Listes des abbreviations.

A : groupe méthoxy en C5 (–OCH₃)

B : groupe hydroxy en C5 (–OH)

1 : double liaison entre C22 et C23 •

2 : liaison simple entre C22 et C23 avec un groupe (–OH) en C23

a : une chaîne secondaire butyle en C25

b : une chaîne isopropyle en C25

Ac: Anti-corps

CA : Corne d'Ammon

GABA : Acide Gaba Amino Butirique

GD : Gyrus Denté

HE : Hématoxyline Eosine

IHC : L'immunohistochimie

LMc : Lactone Macrocyclique

Pgp : P-glycoprotéine

TBS : Tris Buffered Saline

SNC : Système nerveux central

UV : Ultra Violets

LISTES DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Structure chimique de la doramectine	5
Figure 2	Action de l'ivermectine sur les récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) dans la synapse interneuronique d'un parasite	6
Figure 3	Schéma de l'organisation du système nerveux central	9
Figure 4	Situation anatomique et cyto-architecture de l'hippocampe	11
Figure 5	Coupe sagittale de cerveau montrant les différentes zones de la formation hippocampique chez les mammifères	13
Figure 6	Cervelet	14
Figure 7	Sacrifice et Dissection du lapin (Original)	16
Figure 8	Automate de déshydratation (Originale)	17
Figure 9	Microtome de type Leica (Originale)	18
Figure 10	Coloration HE	19
Figure 11	La batterie de 8 bacs	21
Figure 12	Etape de démasquage thermique	22
Figure 13	Etapes de l'immunohistochimie (A, B, C, D)	25
Figure 14	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin témoin	26
Figure 15	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin traité 1 (0.4 mg/kg)	26
Figure 16	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin traité 2 (1 mg/kg)	28
Figure 17	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin traité 3 (2 mg/kg)	29
Figure 18	Structure histologique du cervelet chez le témoin	30
Figure 19	Structure histologique du cervelet chez le groupe traité 1 (0.4 mg/kg)	30
Figure 20	Structure histologique de cervelet chez le groupe traité 2 (1 mg/kg)	32

Figure 21	Structure histologique de cervelet chez le groupe traité 3 (2 mg/kg)	33
Figure 22	Analyse immunohistochimique de Bcl2 dans le cervelet chez les lapins du groupe Traités 1 (Faible dose) montrant une réaction immunitaire négative pour Bcl2	34
Figure 23	Analyse immunohistochimique de Bcl2 dans l'hippocampe chez les lapins du groupe Traités 1 (Faible dose) montrant une réaction immunitaire négative pour Bcl2	35
Figure 24	Analyse immunohistochimique de Bcl2 dans l'hippocampe chez les lapins du groupe Traités 2 (moyenne dose) montrant une réaction immunitaire positive pour Bcl2	36
Figure 25	Examen immunohistochimique de Bcl2 dans le cervelet chez les lapins Traités par la doramectine à forte dose montrant une forte réaction immunitaire positive pour Bcl2	37

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Pages
Tableau 1	Répartition des lapins par lot	16
Tableau 2	Etape de déparaffinage	20
Tableau 3	Etape de déshydratation	23

Tables de Matières

Introduction	1
Chapitre I : Rappels Bibliographiques	
I 1. Généralités sur les lactones macrocycliques	3
I 1.1. Définition des lactones macrocycliques.....	3
I 1.2. Définition et origine des avermectines.....	3
I 2. Doramectine : un endectocide de la famille des avermectines	4
I 2.1. Origine	4
I 2.2. Structure chimique	4
I 2.3. Propriété physico-chimique	5
I 2.4. Propriétés pharmacologiques : activité biologique	5
I 2.4.1 Spectre d'activité et usage	5
I 2.4.2 Mode d'action	6
I 2.5 Propriétés pharmacocinétiques	7
I 2.5.1 Absorption.....	7
I 2.5.2 Distribution	7
I 2.5.3 Métabolisme.....	7
I 2.5.4 Stockage	7
I 2.5.5 Elimination.....	7
I 2.6 Toxicité des lactones macrocycliques endectocides	8
I 2.7 Impact de la doramectine sur l'environnement.....	8
I 3. Système nerveux central	8
I 3.1. Cerveau	9
I 3.1.1. Hippocampe	10
I A Neuro-anatomie hippocampique	10
I B Organisation cellulaire	12
I B. 1 Gyrus dentelé.....	12
I B. 2 Corne d'Ammon.....	12

I 3.2. Cervelet.....	13
Chapitre II : Matériel et méthode	
II.1. Matériel.....	15
II .1.1. Matériel biologique.....	15
II .1.1.1. Taxonomie du lapin	15
II.1.2. Matériel non biologique.....	15
II.2. Méthodes	16
II.2.1. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes.....	16
II.2.2. Etude histologique	27
II.2.3. Etude Immunohistochimique.....	20
III. Résultats et Discussion	
III.1. Histopathologie de l'hippocampe.....	26
III.2. Histopathologie de cervelet.....	30
III.3. Examen Immunohistochimique.....	34
III.4.Discussion	38
Conclusion.....	
Référence bibliographique	
Annexes	

Introduction

INTRODUCTION

De part de notre environnement, nous amenés à être exposé quotidiennement, directement ou indirectement, à des substances exogènes d'origine diverses, appelés xénobiotiques. Ces composés regroupent des produits naturels, des médicaments et des polluants de l'environnement. Les êtres vivants sont donc obligatoirement exposés à ces composés et doivent être capables de faire face à certaines de leurs propriétés potentiellement délétères (**Allabi et al., 2012**).

La santé humaine est indissociable de la santé et de la production animale. C'est pourquoi le médicament vétérinaire doit, tout en étant efficace et sans effet néfaste pour l'animal, garantir une parfaite innocuité pour le consommateur des denrées alimentaires issues des animaux traités (**OMS, 1999**).

Les médicaments les plus souvent mise en cause en médecine vétérinaires sont les antiparasitaires (**Alabi et al., 2012**). Les Lactones Macrocycliques forment une famille de médicaments largement utilisée pour le contrôle des parasites. Ces molécules ont d'abord été développées en thérapeutique vétérinaire et leur utilisation a été plus tard élargie à la thérapeutique humaine. Ces xénobiotiques sont principalement utilisées comme médicaments vétérinaires destinés aux animaux producteurs de denrées alimentaires et comme agents de protection des végétaux dans le secteur agricole (**Castanha Zanoli et al., 2012**).

Les lactones macrocycliques rassemblent différentes molécules produites par la fermentation d'actinomycètes du genre *Streptomyces*. Elles sont classées en deux groupes : les avermectines avec l'ivermectine, la doramectine, l'éprinomectine, la sélamectine et les milbémycines avec la moxidectine et la milbémycine oxime (**Derlon, 2006**).

La doramectine est un produit semi-synthétique qui présente une similitude structurale avec l'abamectine et l'ivermectine. Le médicament est utilisé pour le traitement des ectoparasites ainsi que des endoparasites chez divers animaux. Les avermectines agissent par effet GABA-mimétique. L'action des endectocides se manifeste par une inhibition de l'activité électrique des cellules nerveuses des nématodes et celles des cellules musculaires des arthropodes ; d'où la paralysie flasque irréversible. Chez les mammifères, Les récepteurs GABA ne sont retrouvés qu'au niveau du système nerveux central, expliquant la toxicité potentielle de ces molécules lorsqu'elles passent la barrière hémato-encéphalique (**Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1996**).

L'utilisation de lactones macrocycliques chez des mammifères en bonne santé ne semble pas présenter de risques importants. Cependant, de nombreuses études ont montré que certains de ces produits aient des effets néfastes sur le système nerveux, le foie, les reins et le système reproducteur chez plusieurs espèces animales (**Sakin et al., 2012 ; Khaldoun et al., 2013 ; Zhu WJ. et al., 2013 ; Bedan al-Jassim, 2015 .**

De plus, **Trailovic et Varagie, (2007)** a ajouté que les signes cliniques les plus notables d'intoxication d'ivermectine chez les animaux domestiques et sauvages sont apparus sous la forme d'une dépression de système nerveux central (SNC), coma et peuvent être terminés par la mort. **Ming et al., (2013)** ont montré que l'ivermectine induisait des changements pathologiques comme la dégénérescence neuronale et la nécrose sur les tissus du cerveau après une exposition subchronique à différentes doses.

Le présent travail visait donc à évaluer la neurotoxicité subchronique de la doramectine chez le lapin d'une souche locale « *Oryctolagus cuniculus* ». L'étude est basée sur l'analyse histologique et immunohistochimique de l'hippocampe et le cervelet des lapins traités.

Ce travail est subdivisé en trois chapitres essentiels. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, dans laquelle on a rapporté des généralités sur le médicament, le système nerveux central. Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans le dernier chapitre. Enfin, nous concluons cette étude en mettant en lumière les principaux résultats obtenus et quelques perspectives.

Rappels bibliographiques

1. Généralités sur les lactones macrocycliques

1.1. Définition des lactones macrocycliques

Les lactones macrocycliques sont des composés produits naturels de fermentation de bactéries vivant dans le sol appartenant au genre *Streptomyces*. Ils possèdent une large marge d'activité contre des parasites internes (endo parasites) et externes (ecto parasites) tels que les nématodes (y compris le ver du coeur) et les arthropodes, respectivement (**Burg et al., 1979 ; Shoop et al., 1995 ; Sheriff et al., 2002 ; Bassissi et al., 2004**). Les lactones macrocycliques comprennent deux groupes principaux : les avermectines et les milbemycines.

Les avermectines comprennent principalement l'ivermectine, l'abamectine, la doramectine, l'éprinomectine et la sélamectine. Au groupe des milbemycines appartiennent la moxidectine, la némadectine et la milbémycine-oxime.

1.2. Définition et origine des avermectines

Les avermectines sont des lactones macrocycliques isolées à partir d'un groupe de composés produits à partir d'un bouillon de fermentation de la bactérie filamenteuse *Streptomyces avermitilis* (**Bloom et Matheson, 1993 ; Shoop et al., 1995 ; Losson, 1997**).

Le terme avermectines signifie : *a* : anti, *verm* : ver, *ect* : ectoparasites et *in* : produit pharmaceutique. L'innovation découle de la capacité des composés de cette famille à traiter et a éliminé les endoparasites et ectoparasites (**Richard et al., 1979 ; McKellar et Benchaoui, 1996**).

Sa culture produit un complexe d'ivermectines formé de 8 composés (4 majeurs : A1a, A2a, B1a, B2a et 4 mineurs : A1b, A2b, B1b, B2b). L'ivermectine et l'éprinomectine sont des dérivés de ces composés (**Goudie et al., 1993 ; Shoop et al., 2002 ; Yoon et al., 2004**).

Elles ont été introduites en thérapeutique vétérinaire en 1981, et constituent à ce jour la classe thérapeutique la plus largement utilisée dans la lutte contre les parasites des bovins. De nos jours, au-delà de leur utilisation en médecine vétérinaire contre les endoparasites et ectoparasites des animaux d'élevage et animaux domestiques, les avermectines sont également utilisés en médecine humaine, notamment pour le traitement et la prévention de l'onchocercose, et en agriculture comme pesticides (**Omura et Crump, 2004**).

2. Doramectine : un endectocide de la famille des avermectines

2.1. Origine

Les avermectines sont des lactones macrocycliques naturellement produites par fermentation de *Streptomyces avermitilis*, un actinomycète vivant dans le sol. Jusqu'à une époque récente (1993), il n'y avait aucune nouvelle avermectine autre que celles chimiquement dérivées des produits de fermentation initiaux. Cependant, un programme d'amélioration de cultures a permis la production de nouvelles avermectines par biosynthèse mutationnelle. Tous ces composés ont été confrontés in vitro à une grande variété de parasites et les meilleurs ont été testés in vivo sur des animaux de laboratoires. Parmi ces avermectines, les plus prometteuses ont été étudiées par la suite chez les bovins. Sur la base de sa pharmacodynamie et de sa pharmacocinétique, la doramectine a été choisie pour des essais plus poussés (Goudie et al., 1993).

2.2. Structure chimique

Les avermectines appartiennent à la classe des lactones macrocycliques qui comporte 16 membres. Les avermectines sont produites par fermentation de *Streptomyces avermitilis* sous la forme d'un mélange de huit composés : A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a et B2b.

- A : groupe méthoxy en C5 (-OCH₃)
- B : groupe hydroxy en C5 (-OH)
- 1 : double liaison entre C22 et C23 •
- 2 : liaison simple entre C22 et C23 avec un groupe (-OH) en C23
- a : une chaîne secondaire butyle en C25
- b : une chaîne isopropyle en C25

La doramectine est obtenue par synthèse biomutationnelle à partir d'une souche modifiée de *Streptomyces avermitilis* incubée dans un milieu contenant, comme précurseur, l'acide cyclohexane carboxylique. La dénomination chimique de la doramectine est la suivante : 25-cyclohexyl-5-O-demethyl-25- de (1-méthylpropyl) avermectine A1a, mais elle est communément décrite comme la 25-cyclohexyl avermectine B1. Elle possède une double liaison entre C22 et C23, et un constituant cyclohexyl lipophile en C25. La doramectine est une poudre blanche à brunâtre, dont la formule moléculaire est C₅₀ H₇₄ O₁₄ pour un poids moléculaire de 899,14 (Shoop et al., 1995) (Figure 1).

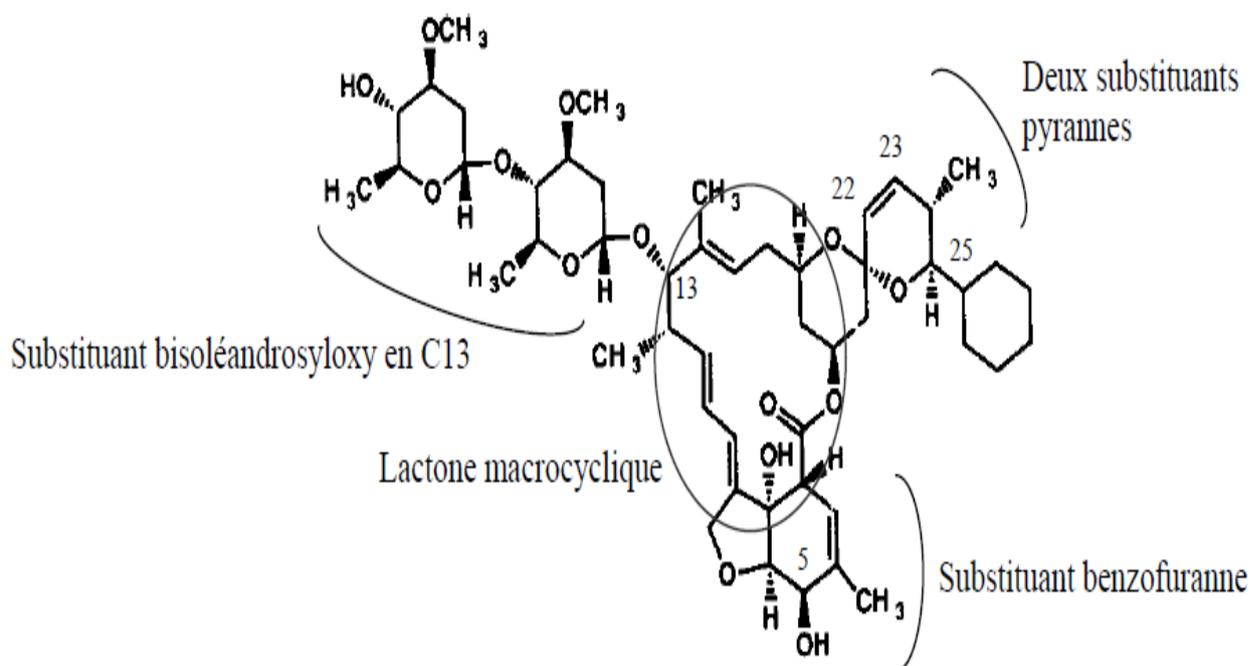


Figure 1 Structure chimique de la doramectine (Goudie et al., 1993)

2.3. Propriétés physico-chimiques

La doramectine est une molécule très lipophile et neutre. Elle est insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques. Sa liposolubilité lui permettra une large distribution dans l'organisme.

Elle se caractérise aussi par une volatilité très faible et une forte capacité de liaison aux particules du sol et des bouses de par sa lipophilie. Elle est dégradée par le Soleil et est biodégradable dans l'environnement (Fisher et al., 1992).

2.4. Propriétés pharmacologiques : activité biologique

2.4.1. Spectre d'activité et usage

Les macrolides antiparasitaires sont des molécules actives vis-à-vis de nombreux endoparasites (les nématodes) et des ectoparasites (les arthropodes), d'où leur dénomination d' « endectocides ». Ainsi la doramectine présente-elle un spectre d'activité étendu, avec une action anthelminthique (strongles gastro-intestinaux et respiratoires, ascarides, trichures, spirures et filaires ...) et une action insecticide-acaricide (certains acariens agents de gale, diptères agents de myiases) (Fisher et al., 1992).

La spécialité vétérinaire à base de doramectine est commercialisée par les laboratoires

Pfizer sous le nom déposé de DECTOMAX®. On trouve deux formes galéniques de cette spécialité : en solution injectable (doramectine : 1g, excipient huileux QSP : 100 mL) et en préparation *pour-on* (doramectine : 5g, octanoate de cétéaryle : 160 mg, Thriéthanolamine : 0,5 mg, isopropanol QSP : 1 mL).

2.4.2. Mode d'action

Le mode d'action de la doramectine est celui de toutes les lactones macrocycliques. Les avermectines agissent par effet GABA-mimétique (**Pemberton et al., 2001; Turner, 1989**). Les effets antiparasitaires connus sont : une paralysie des muscles pharyngiens et des muscles somatiques du parasite ou de l'insecte. En effet, les LMs agissent sur la transmission nerveuse en se fixant sur un récepteur au glutamate qui contrôle les canaux chlores. Elles accroissent alors la perméabilité des muscles de la membrane des cellules nerveuses à proximité du récepteur GABA (Acide Gamma Amino Butyrique) et du récepteur aux benzodiazépines dans le pharynx. Ce qui réduit le potentiel excitateur provoquant une hyperpolarisation de la membrane cellulaire. Cette hyperpolarisation bloque toute activité nerveuse et entraîne une paralysie flasque (**Arena et al., 1995; Hejmadi et al., 2000; Lamb et al., 2003**) (**Figure 2**).

L'action des endectocides se manifeste donc par une inhibition de l'activité électrique des cellules nerveuses des nématodes et celles des cellules musculaires des arthropodes ; d'où la paralysie flasque irréversible. Chez les mammifères, Les récepteurs GABA ne sont retrouvés qu'au niveau du système nerveux central (SNC), expliquant la toxicité potentielle de ces molécules lorsqu'elles passent la barrière hémato-encéphalique (**Li and Zhang, 1996 ; Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1996**).

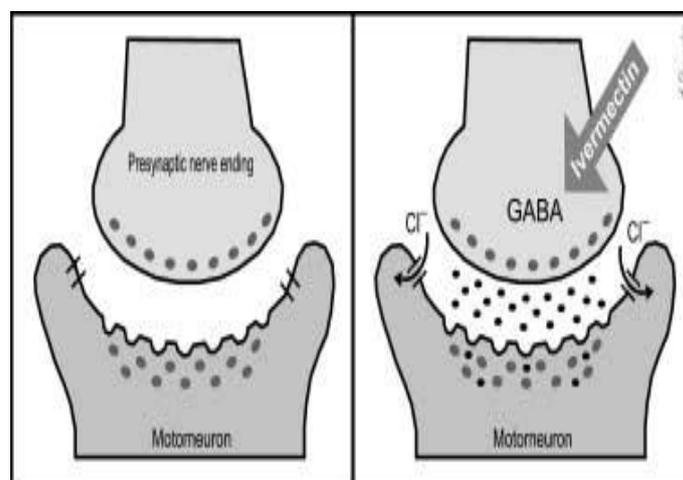


Figure 2 Action de l'ivermectine sur les récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) dans la synapse interneuronique d'un parasite (**Dourmishev et al. 2005**)

2.5. Propriétés pharmacocinétiques

La pharmacocinétique des avermectines dépend de leurs caractères physico-chimiques telles que la polarité et la lipophilie. Ils sont pratiquement insolubles dans l'eau (6-9 µg/L), et cette propriété leur confère une bonne absorption, une forte distribution et une longue rémanence dans l'organisme (Sebbag, 2011).

2.5.1. Absorption

L'absorption de la doramectine est plus lente en solution huileuse qu'en en solution aqueuse micellaire. La doramectine appliquée en Pour-on serait retenue dans certaines couches cutanées et serait absorbée plus lentement que la doramectine administrée par voie sous-cutanée (Toutain *et al.*, 1997).

2.5.2. Distribution

La doramectine est une molécule lipophile, qui se distribue largement à partir du compartiment sanguin, dans différents tissus, notamment dans le foie et le tissu adipeux, ce qui participe à leur rémanence dans l'organisme, et ceci est dû à leurs propriétés lipophiles. (Lifschitz *et al.*, 2000).

2.5.3. Métabolisme

Dans l'organisme, les avermectines sont très peu métabolisées ; la majorité du produit est excrété sous forme inchangée. Cette excrétion est essentiellement fécale (~90%), et très peu urinaire (<2%) (Sarasola *et al.*, 2002).

2.5.4. Stockage

La doramectine, molécule lipophile, est stockée dans le tissu adipeux qui agit comme un réservoir à partir duquel elle est lentement relarguée. Cela expliquerait à la fois la persistance de la doramectine dans l'organisme et les périodes étendues de protection contre les ectoparasites et les strongles gastro-intestinaux et respiratoires (Toutain *et al.*, 1997).

2.5.5. Elimination

Le temps de demi-vie d'élimination est de l'ordre de 3,8 jours. D'après Traeder (1994), 14 jours après une administration sous-cutanée de doramectine à des bovins, 87 % de la dose est éliminée par la bile et les fèces, et seulement 1 % par les urines.

2.6. Toxicité des lactones macrocycliques endectocides

Les LMs présentent une faible toxicité aux doses thérapeutiques qui sont de l'ordre de 200 à 500 µg/kg en dose unique. L'utilisation de lactones macrocycliques chez des mammifères en bonne santé ne semble pas présenter de risques importants. Cependant, de nombreuses études ont montré que certains de ces produits aient des effets néfastes sur le foie, les reins, le système reproducteur, endocrinien, immunitaire et nerveux chez plusieurs espèces animales (Arise and Malomo, 2009 ; Sakin *et al.*, 2012 ; Ismail *et al.*, 20013 ; Ming *et al.*, 2013 ; Khaldoun *et al.*, 2013 ; Zhu WJ. *et al.*, 2013 ; ElZoghby *et al.*, 20015 ; Bedan al-Jassim *et al.*, 2016, Mahmoud *et al.*, 2017).

2.7. Impact de la doramectine sur l'environnement

Les caractéristiques physico-chimiques de la doramectine, en particulier sa volatilité extrêmement faible, sa faible solubilité dans l'eau et sa forte capacité de liaison aux particules du sol et des bouses, limitent très fortement sa diffusion dans l'atmosphère et dans les eaux de ruissellement ou souterraines. De plus, la doramectine est dégradée par les rayons ultraviolets (UV) et les organismes telluriques, ce qui contribue à réduire encore la quantité de résidus qui pourraient diffuser dans l'environnement aquatique (Alvinerie *et al.*, 1999).

3. Système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) se compose de l'encéphale et de la moelle épinière. L'encéphale peut lui-même être divisé en cerveau, qui correspond à la partie antérieure, cervelet (petit cerveau), et tronc cérébral, en continuité avec la moelle épinière (TACHDJIAN *et al.*, 2016). Le SNC reçoit les informations et les intègre pour élaborer une réponse. Il est impliqué dans les fonctions les plus complexes du système nerveux, comme l'apprentissage, mais aussi dans les aspects les plus élémentaires comme les réflexes (BEREZOWSKI *et al.*, 2016) Figure 3.

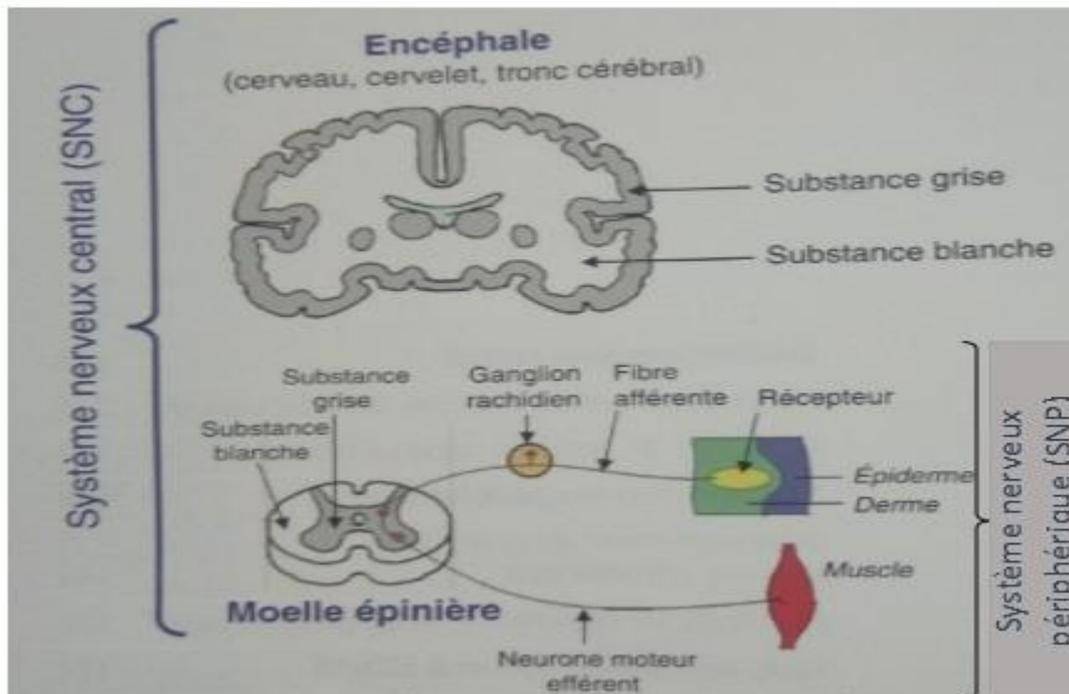


Figure 3 Schéma de l'organisation du système nerveux central (Tachdjian, 2016).

3.1. Cerveau

Le cerveau est logé dans la boîte crânienne qui le protège des chocs (Cambier, 2008). Il appartient à l'encéphale, qui comprend le diencephale, le tronc cérébral et le cervelet en suspension dans le liquide céphalo-rachidien, un liquide amortisseur de chocs qui permet le transport de molécules et la récupération des déchets (Pascal, 2010).

Le cerveau est divisé en deux parties l'hémisphère droit et l'hémisphère gauche. Chaque hémisphère commande une partie opposée du corps, l'hémisphère gauche gère le côté droit du corps et inversement (Cambier, 2008 ; Peterson et al., 2015). L'hémisphère gauche est généralement associé à la logique et au langage, alors que le droit est le siège des intuitions, des émotions et du sens artistique (Bear et al., 2016). La surface des hémisphères est recouverte de cortex cérébral, c'est la substance grise car elle contient les corps cellulaires des neurones. Le cortex est parcouru de circonvolutions, qui sont des replis du tissu cérébral (Peterson et al., 2015).

Depuis la découverte du cerveau des mammifères, il a été montré que la neurogénèse est principalement confinée dans deux structures du cerveau: **le bulbe olfactif**, premier relais central de l'information olfactive, et **l'hippocampe**, structure essentielle dans la mémoire (Gros, 2018).

3.1.1. Hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale qui compose la partie interne du cortex, adjacente au cortex olfactif, chez les mammifères supérieurs. Il est centre d'un réseau neuronal complexe le mettent en contact avec de nombreuses structures cérébrales tel que l'amygdale, le septum et le thalamus pour former le système limbique appelés « le berceau des émotions » de plus, sa capacité de moduler sa morphologie en réponse à des modifications environnementales lui permet de jouer un rôle crucial dans les processus de mémorisation et d'apprentissage (NADAM, 2007).

A- Neuro-anatomie hippocampique

Chez les mammifères supérieurs, l'hippocampe est une petite structure allongée, bilatérale, systémique, sous-corticale du SNC, enroulé sur elle-même et occupant la partie interne de la face médiane du lobe temporal. Il est constitué avec l'amygdale, le septum et le thalamus, l'un des éléments principaux du système limbique. Ce dernier joue un rôle important dans les processus émotionnels, d'apprentissage et de mémorisation (PERNOT, 2009).

L'hippocampe est formé de deux couches neurales interconnectées en forme de U inversé, le gyrus denté (GD) et le corne d'ammon (CA), subdivisé-elle même en trois régions (CA1, CA2, CA3) (PERNOT, 2009) (Figure 4).

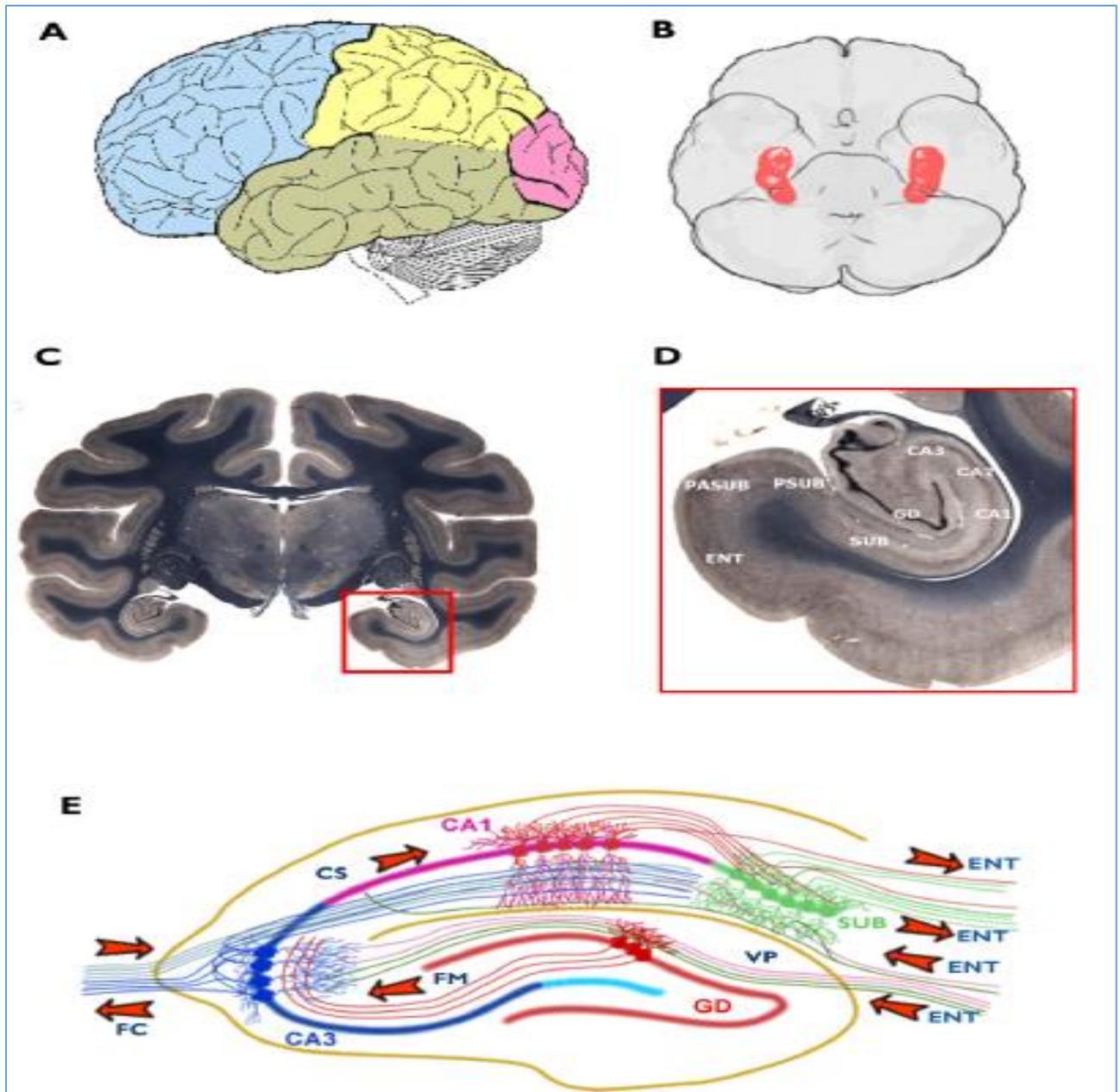


Figure 4 Situation anatomique et cyto-architecture de l'hippocampe (Mikula et coll ; 2006).

(A), vue latérale du cerveau de mammifère et délimitation des lobes principaux : le lobe principale est indiqué en vert. (B), localisation de l'hippocampe, en rouge, au sein du cerveau de mammifère en vue ventrale. (C), coupe frontale d'un cerveau d'un mammifère en coloration de Weil. La structure hippocampique, cadre rouge est grandie (D) et permet la visualisation des différentes couches cellulaires. (E), relais synaptique au sein de l'hippocampe : les afférences du cortex entorhinal (ENT) contactent le GD et CA3 par la voie perforante (VP) ; les axones de cellules granulaires du GD, les fibres moussues (FM), innervent également la région CA3, les collatérales des cellules pyramidales de CA3, les collatérales de Schaffer (sh), innervent également la région pyramidales de CA1 ainsi que l'hippocampe controlatéral par les fibres commissurales (FC), finalement les cellules, finalement les cellules de CA1 et CA3 innervent la région de subiculum (SUB) en sub-direction du cortex entorhinal.

B. Organisation cellulaire

B.1. Gyrus dentelé

Le gyrus dentelé se compose de trois couches cellulaires : la couche moléculaire (ou dendritique), la couche granulaire (ou principale) et la couche polymorphique (ou la région du hile). Les principaux neurones du gyrus dentelé sont les cellules granulaires. **(Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998)** ; ces cellules relativement petites (8-12 μm de diamètre) et possèdent deux dendrites principales se ramifiant en de nombreuses branches fines et couvertes d'épines dans la couche moléculaire sus-jacente, qui est principalement acellulaire (couche moléculaire) **(Amaral et Witter, 1989; Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998)**. La couche polymorphique possède pour sa part, plusieurs types de cellules. Parmi celles-ci ; les cellules moussues, qui reçoivent des contacts des fibres moussues, et les cellules polymorphiques qui sont comme leur nom l'indique **(Amaral et Witter, 1989 ; Johnston et Amaral, 1998)**.

B.2. Corne d'Ammon

La corne d'Ammon peut clairement être subdivisée en deux régions : une région composée de larges cellules, proche du gyrus dentelé, et une région constituée de plus petites cellules et située plus distalement, à la jonction avec le subiculum **(Ramón y Cajal, 1911)**.

Au niveau histologique, la corne d'Ammon peut être divisée en trois parties, en fonction notamment de la taille des cellules, de la densité cellulaire, ainsi que des connections synaptiques : CA1, CA2, CA3. Les cellules composant majoritairement la CA sont les neurones pyramidaux, correspondant à des excitateurs glutaminergiques, nommés ainsi en raison de leur forme. Les régions CA2 et CA3 sont formées de neurones plus larges, mais moins condensés que la région CA1. Le GD est composé majoritairement de neurones granulaires projetant des axones appelés fibres moussues vers la région CA3 **(LAFaix, 2013)**. **(Figure 5)**.

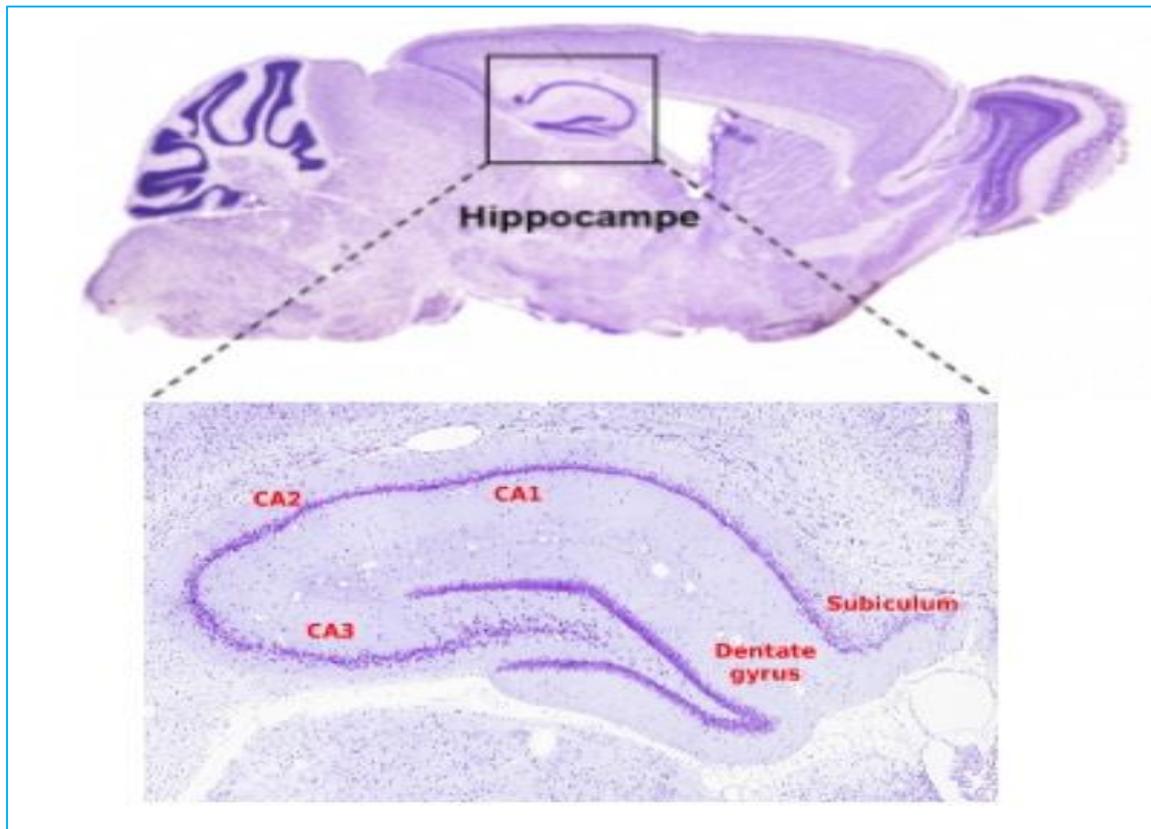


Figure 5 Coupe sagittale de cerveau montrant les différentes zones de la formation hippocampique chez les mammifères (Coloration de Nissl).(Institut des neurosciences Paris-Saclay, 2018).

L'hippocampe est divisé au niveau morphologique en deux structures en U inversés: la corne d'Ammon (CA) et le Gyrus Denté (*DentateGyrus*, DG).

CA1; CA2; CA3: subdivisions histologiques 1, 2 et 3 de la Corne d'Ammon (CA)

3.2. Cervelet

Le cervelet se trouve dans la fosse postérieure sous les lobes occipitaux du télencéphale. Comme pour le télencéphale, la surface du cervelet possède des sillons et des circonvolutions qui sont cependant de plus petite taille. Sa partie centrale, le vermis cérébelleux, relie les deux hémisphères cérébelleux situés de part et d'autre, dont la surface présente des fines scissures et des circonvolutions. À la surface du cervelet, on trouve un cortex de substance grise de 1mm d'épaisseur (Menche, 2009) et d'un cœur central de substance blanche contenant quatre paires de noyaux (Low, Health, 2010).

En dessous se trouvent, comme dans les hémisphères, les fibres nerveuses de la substance blanche, dans laquelle sont incluses des zones de substance grise que sont les noyaux cérébelleux. Le cervelet est relié par des voies ascendantes et descendantes avec la moelle spinale, le diencephale et par, l'intermédiaire du pont, avec les hémisphères et l'organe

de l'équilibre. Ces liaisons permettent au cervelet de jouer son rôle de centre de coordination et de motricité (Menche, 2009).

Le cervelet, qui coordonne l'activité musculaire et permet le maintien de la posture et de l'équilibre, les fibres afférentes et efférentes partent vers le tronc cérébral ou en arrivent par l'intermédiaire des pédoncules cérébelleux inférieurs, la protubérance et le mésencéphale (Low, Health, 2010). Le cervelet régule, par le biais des fibres du système extrapyramidal et en lien avec le télencéphale, le tonus musculaire de base et synchronise les mouvements entre eux. À l'aide des informations en provenance de l'organe de l'équilibre, il commande les positions du corps afin de maintenir son équilibre (Menche, 2009) (Figure 6).

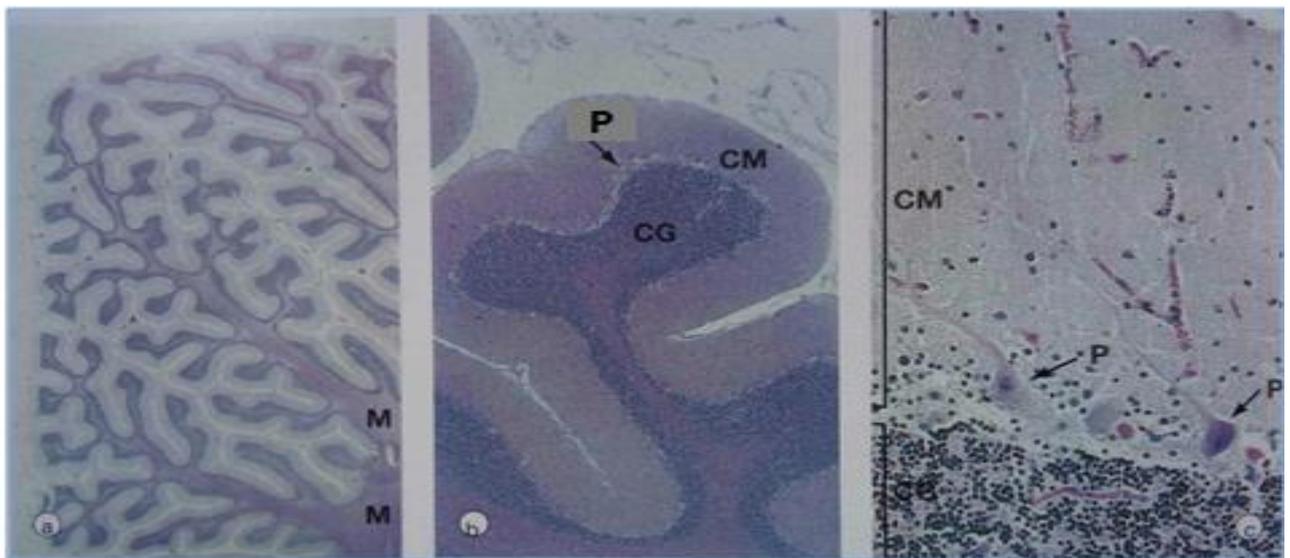


Figure 6 Cervelet (a)HE×4(b)HE×20 (c)HE×320(Weather, 2010).

a) le cortex cérébelleux forme une série de plis profonds folié ou lame soutenues par une médullaire centrale ramifiée M de substance blanche.

b) le cortex est constitué de trois couches. La couche moléculaire CM, externe, contient de relativement peu de neurones mais de nombreuses fibres amyéliniques. La couche granulaire CG (couche des grains), interne, est très cellulaire. Entre les deux, on trouve une assise de volumineux neurones appelées cellule de Purkinje P.

Les cellules de Purkinje P sont observables à plus fort grossissements sur la photographie (c) ; elle possède un corps cellulaire énorme, un axone relativement fin descendant à travers la couche granulaire CG et un système dendritique extrêmement ramifié qui s'arborise dans la couche moléculaire externe CM.

Matériel et méthodes

Notre étude porte sur la recherche d'une toxicité subaiguë de la doramectine à raison de trois doses (0.4mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg) administrées une fois par semaine par voie sous cutanée pendant 28 jours chez des lapins males. Notre expérimentation a été réalisé durant la période allant du mois de Mars jusqu'au mois de Juin 2018, au niveau des laboratoires suivants :

- L'animalerie de l'institut SAIDAL de Médéa
- Laboratoire d'anatomie pathologie CHU Parnet, d'Alger

II.1. Matériel

II .1.1. Matériel biologique

La présente étude est réalisée sur 16 lapins males adultes de souche locale *Oryctolagus cuniculus*, provenant de l'élevage de l'ITELV, Alger, et ayant un poids corporel moyen de 2Kg. Ces animaux ont eu accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum*.

II .1.1.1. Taxonomie du lapin

Selon **Grasse, (1949)** et **Lebas et al., (1984)**, la systématique du lapin est la suivante :

Règne : Animal

Embranchement : Vertébrés

Classe : Mammifères

Ordre : Lagomorphes

Famille : Léporidés

Genre : *Oryctolagus*

Espèce : *Oryctolagus cuniculus*

II.1.2. Matériel non biologique

Au cours de cette expérimentation, le produit testé est un médicament vétérinaire anthelminthique de la famille des avemectines, son nom commercial est le Dectomax® (Doramectine). Le reste du matériel non biologique utilisé à savoir, appareillage, réactifs et verrerie de laboratoire...ect est mentionné dans l'annexe.

II.2. Méthodes

Les lapins mâles codifiés de façon spécifique ont été répartis en 4 1 groupes contenant un nombre de lapin de 4 par groupe et répartis comme indiqué dans le tableau ci-après :

Tableau I Répartition des lapins par lot

N° de lot	Nombre de lapins	Traitement
Groupe I : Témoin	4	0.9% NaCl
Groupe II : Traité 1	4	0.4 mg/kg de la doramectine
Groupe III : Traité 2	4	1 mg/kg de la doramectine
Groupe VI : Traité 3	4	2 mg/kg de la doramectine

II.2.1. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

A la fin de la période du traitement, les lapins des 4 lots sont mis à jeun pendant une nuit. Les organes cibles (cerveau et cervelet) sont prélevés soigneusement, ils sont ensuite mis dans des piluliers contenant un liquide de fixation le formol à 10% pour leur fixation dans un état aussi proche que possible de l'état vivant (**Figure 7**).



Figure 7 Sacrifice et Dissection du lapin (Original)

II.2.2. Etude histologique

❖ Fixation et rinçage

Le but de cette étape est de fixer le tissu dans l'état le plus proche de son état initial et de garder sa structure morphologique et son intégrité chimique. Après les prélèvements, les organes sont fixés dans le formol à 10% pendant 48 heures. A la fin de la fixation, les organes sont déposés dans des cassettes en plastique qui sont marquées par un crayon qui permet ainsi de les identifier.

❖ Déshydratation des échantillons et éclaircissement

La déshydratation se fait grâce à un automate de déshydratation (**Figure 8**) qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70°, 95° et 100°), puis dans des bains de xylène. Au fur et à mesure de leur infiltration par ce solvant (xylène), les tissus ont tendance à s'éclaircir : cette étape est donc parfois appelée éclaircissement ou clarification.



Figure 8 Automate de déshydratation (Originale)

❖ Imprégnation

A la fin de l'étape de déshydratation, les organes sont plongés dans deux bains successifs de paraffine durant 1h30 chacun à 58°C.

❖ Inclusion des échantillons (enrobage)

L'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine fondue dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine.
- Placement des cassettes
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 10 minutes

❖ Confection des coupes

Des coupes transversales de 3 μm d'épaisseur sont réalisées à partir des blocs à l'aide d'un microtome de type Leica (**Figure 9**). Les rubans sont étalés dans un bain marie (40°C), récupérés et collés sur des lames propres, puis séchés dans une étuve réglée à 37°C pendant 24 heures.



Figure 9 Microtome de type Leica (Originale)

❖ Déparaffinage et réhydratation

Les colorants les plus utilisés en histologie sont aqueux et ne peuvent donc pas agir sur un tissu saturé en paraffine, il faut donc les déparaffiner et les réhydrater. Le déparaffinage est effectué par un passage des coupes dans un bain de xylène pendant 30 min. L'hydratation est ensuite effectuée par un passage dans un bain d'alcool 100° pendant 10 minutes.

❖ Coloration des lames à l'hématoxyline éosine (HE)

Principe et protocole :

La coloration HE est une coloration histologique topographique, associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris à une coloration des cytoplasmes et du collagène par l'éosine. Cette coloration a été effectuée selon le protocole suivant :

- Un bain d'hématoxyline de Harris (un colorant basique nucléaire) pour la coloration des noyaux en bleu pendant 5 minutes.
- Rinçage à l'eau courant pour le lavage des lames.
- La coloration avec l'éosine (un colorant acide cytoplasmique) pendant 2 à 3 minutes.
- Rinçage à l'eau courant pour le lavage des lames (**Figure 10**)



Figure 10 Coloration HE

❖ Montage

Les lames sont montées pour préserver les colorations. Elles sont déshydratées grâce à des bains de xylène, puis on colle des lamelles de verre par-dessus grâce à des résines synthétiques comme l'Eukitt afin de préserver les préparations. Les lames ainsi montées sont prêtes pour l'observation microscopique, et pourront être conservées pendant plusieurs années.

❖ Observation microscopique

L'observation microscopique des lames a été faite à l'aide d'un microscope photonique de «Leica», à différents grossissements Gx4, Gx10, Gx40 .

II.2.3. Etude Immunohistochimique

❖ Principe

L'immunohistochimie (IHC), désigne la méthode de localisation des protéines situées dans les cellules d'un tissu, elle consiste à détecter le site de la liaison d'un anticorps spécifique avec la protéine contre laquelle il est dirigé. IHC peut être réalisé sur des coupes de tissu congelés ou fixé et inclus en paraffine.

❖ Mode opératoire

1. Préparation du tissu

La préparation du tissu se fait de la même façon que la technique HE allant de la fixation des prélèvements à la confection des coupes avec microtome. Après rabotage des blocs et obtention de ruban entre 4 à 5µm d'épaisseur. Les coupes ont été ramollies à la surface d'un bain marie régulé à 40°C puis recueillies sur des lames silanisées préalablement numérotées.

2. Déparaffinage

Cette étape consiste à l'incubation des lames dans une étuve entre 37° et 40°C pendant toute la nuit ou pendant 1 à 2 heures à 60°. Après, les lames sont plongées dans une batterie de 08 bacs de réhydratation (**Figure 11**) (**Tableau II**)

Tableau II Etape de déparaffinage

	Solution	Durée
1	Xylène	10 min
2	Xylène	10 min
3	Alcool	10 min
4	Alcool	10 min
5	Alcool	5 min
6	Alcool	5 min
7	Alcool	1 min
8	Eau distillée (blanchissement)	5min



Figure 11 La batterie de 8 bacs

3. Démasquage thermique

- Les lames sont placées dans une solution pH 6 (citrate), puis mis dans un bain marie à 80-90° C pendant 50 min au maximum.
- Refroidissement des lames pendant 20 min.
- Rinçage au TBS (Tris Buffered Saline) pendant 1 min.
- Encercler les coupes histologiques par Dako pen (pour diminuer la quantité des solutions utilisées et de traiter aisément plus d'une coupe sur une lame) et les remettre dans l'eau distillé pour qu'elles restent humides (**Figure 12**).



Figure 12 Etape de démasquage thermique

4. Blocage de peroxydase endogène

Elle consiste à verser quelques gouttes de peroxydase sur toutes les coupes et laisser réagir pendant 10 min. Les lames sont ensuite rincées dans deux bacs de TBS pendant 5 min chacun pour éliminer la peroxydase endogène. Egoutter les lames verticalement.

5. Marquage à Ac primaire

Quelques gouttes d'Ac primaire (Bcl2) sont versées sur les coupes séparément, on laisse incuber jusqu'à 1 heure et les lames doivent être recouvertes. Suivi par rinçage dans 2 bains de TBS (5 min chacun).

6. Révélation par le système HRP

Quelques gouttes d'Ac secondaire sont ajoutées, les lames doivent être recouvertes et laisser incuber pendant 30 min. Ensuite, les lames sont plongées dans un bain de TBS pendant (5 min × 2).

7. Application de polymère

Quelques gouttes de polymère sont ajoutées pendant 30 min puis un rinçage au TBS a été réalisé (5min× 2)

8. Application du chromogène DAB

Appliquer suffisamment en solution de la préparation suivante (50 ul de diluant dans 1 ml de DAB) puis recouvrir les éléments histologiques, laisser incubé 10 min et puis rinçage au TBS (5min× 3).

9. Contre coloration

Les lames sont immergées dans un bain d'Hématoxyline de Mayer qui colore intensément les noyaux en bleu violacé mais aussi les cytoplasmes et le tissu de soutien pendant 2 min suivis d'un rinçage à l'eau de robinet (3 min×2) puis à l'eau distillée pendant 1 min . Ensuite les immergées dans un bain contenant la préparation suivante (150 ul d'ammoniac + 200 ml d'eau distillée) pendant 1 min.

10. Déshydratation et montage

Les lames sont plongées dans une batterie de 06 bacs (**Tableau III**), Puis on procède au montage lame-lamelle (**Figure 13**).

Tableau III : Etape de déshydratation

	Solution	Durée
1	Alcool	3 min
2	Alcool	3 min
3	Alcool	3 min
4	Alcool	1 min
5	Xylène	3 min
6	Xylène	3 min

A



Mettre les lames dans une chambre humide

Disposition d'une goutte de protéine block sur la zone encerclée

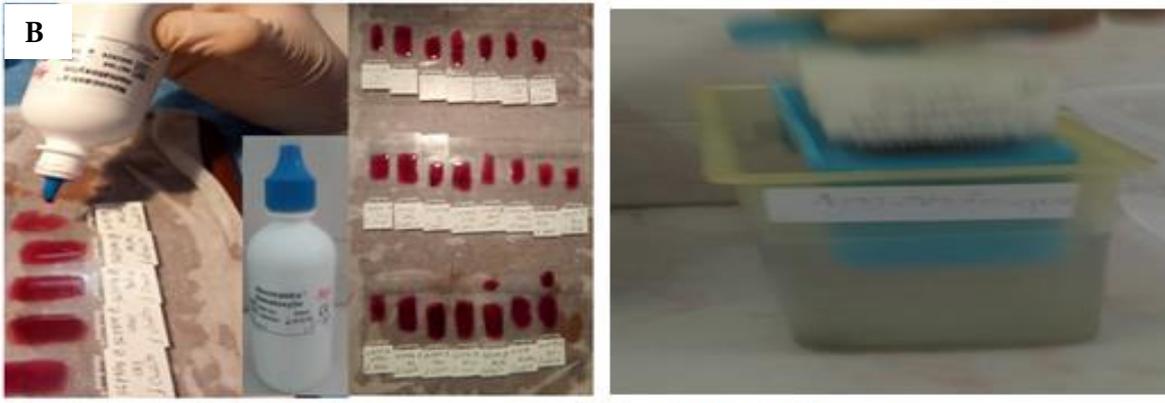
Disposition de l'AC primaire (Bcl2) sur la zone encerclée

Application de l'AC secondaire sur la zone

Application de polymère

Application de DAB (50µl dans 1ml)

B



Coloration à l'hématoxyline

Coloration à l'ammoniac

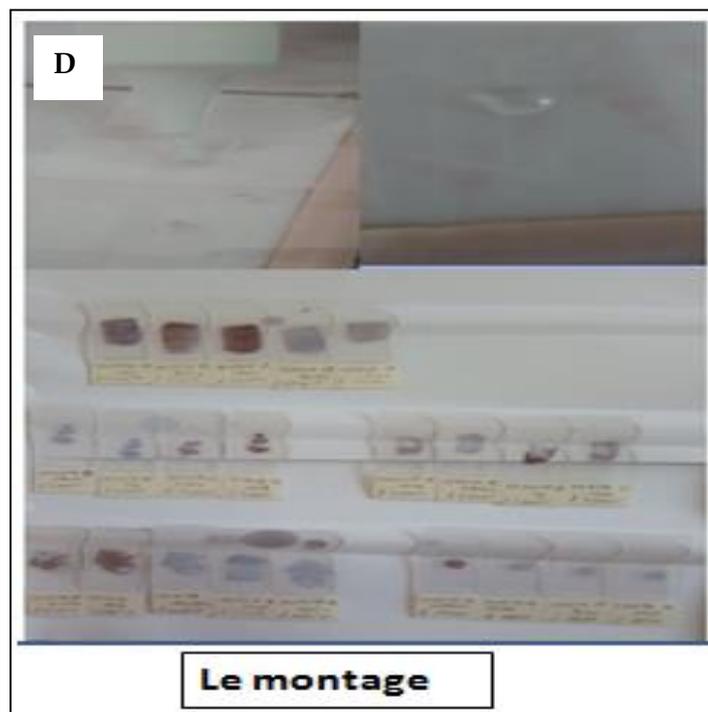


Figure 13 Etapes de l'immunohistochimie (A, B, C, D)

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1. Histopathologie de l'hippocampe

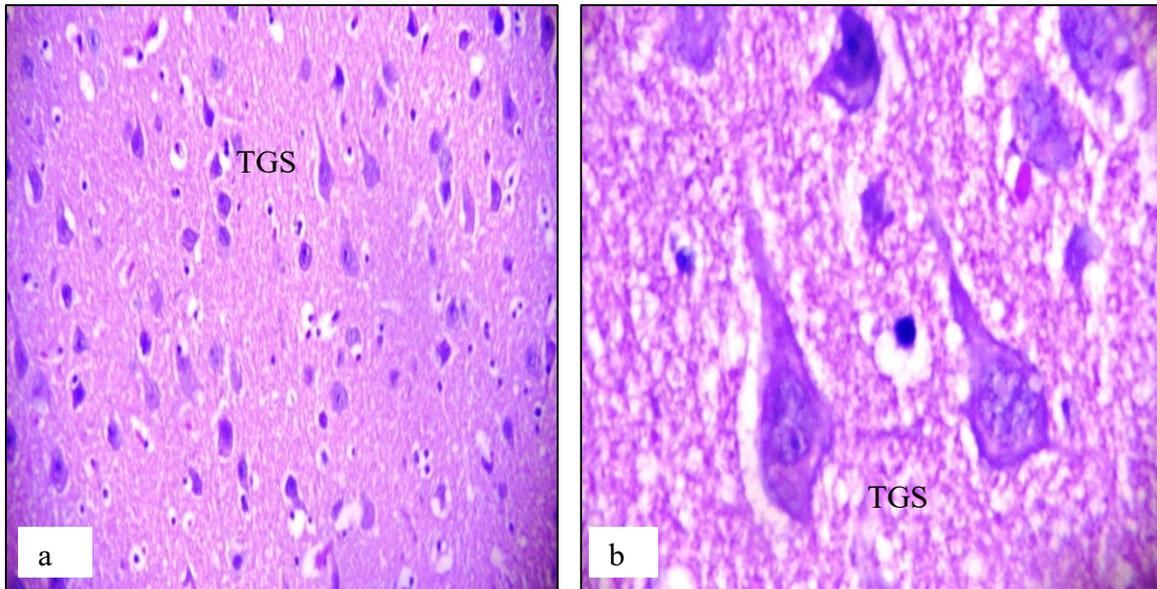


Figure 14 : (a et b) Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin témoin

Coloration HE ; Grossissement : x 10 (a), x 40 (b)

TGS : Tissu Gliale de Soutien.

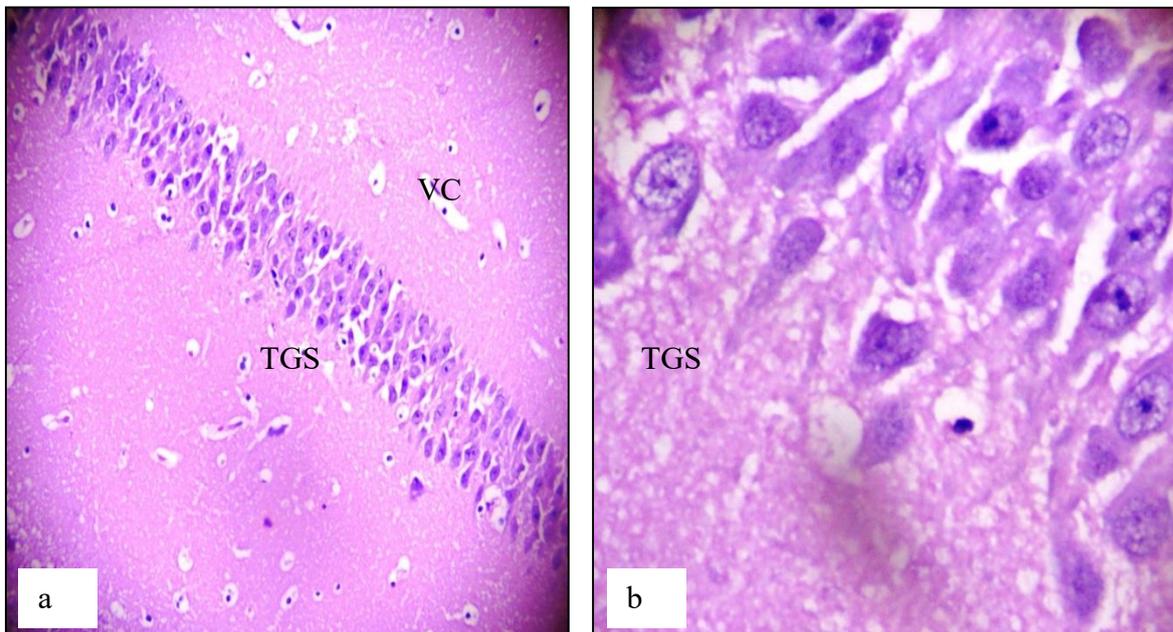


Figure15 : (a et b) Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin traité 1 (0.4 mg/kg)

Coloration HE ; Grossissement : x 10 (a), x 40 (b)

VC : Vaisseau Congestive, TGS : Tissu Congestive

➤ **Chez les lapins Témoins et Traités 1 (Faible dose)**

L'examen microscopique des sections colorées HE de l'hippocampe du groupe I (témoin) et du groupe II (dose faible 0,4mg/kg) était similaire et montrait la structure normale bien connue de l'hippocampe sans lésion visible (Figure 14, 15) respectivement. L'architecture de l'hippocampe entre les couches a été conservée. Les cellules nerveuses de l'hippocampe du groupe I et II sont normales en termes de morphologie, d'arrangement et de distribution des cellules. De plus, une congestion vasculaire discrète a été remarquée chez les lapins traités à faible dose.

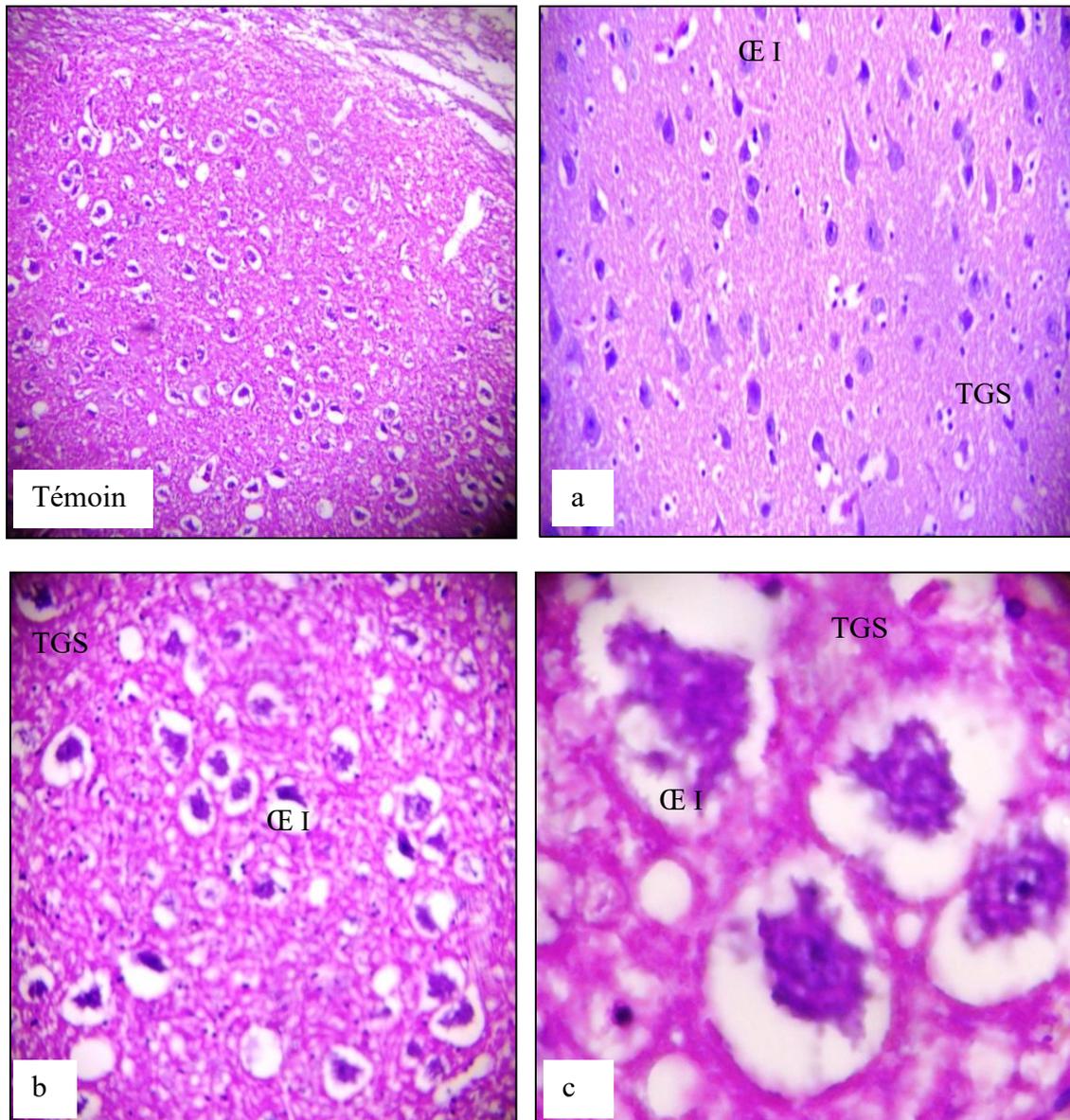


Figure 16 (a, b et c) Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin traité 2 (1 mg/kg)

Coloration HE ; Grossissement :x 4(a), x 10(b), x 40(c)

CE I : Œdème interstitiel, TGS : Tissu Gliale de soutien.

➤ **Chez les lapins Traités 2 (Moyenne dose)**

L'observation microscopique des coupes de l'hippocampe du groupe III (moyenne dose 1 mg/kg) a révélé la présence de nombreuses cellules nerveuses rétractées et oedématisées, quelques lésions évidentes avec des halots clairs péri-cellulaires (Figure 16).

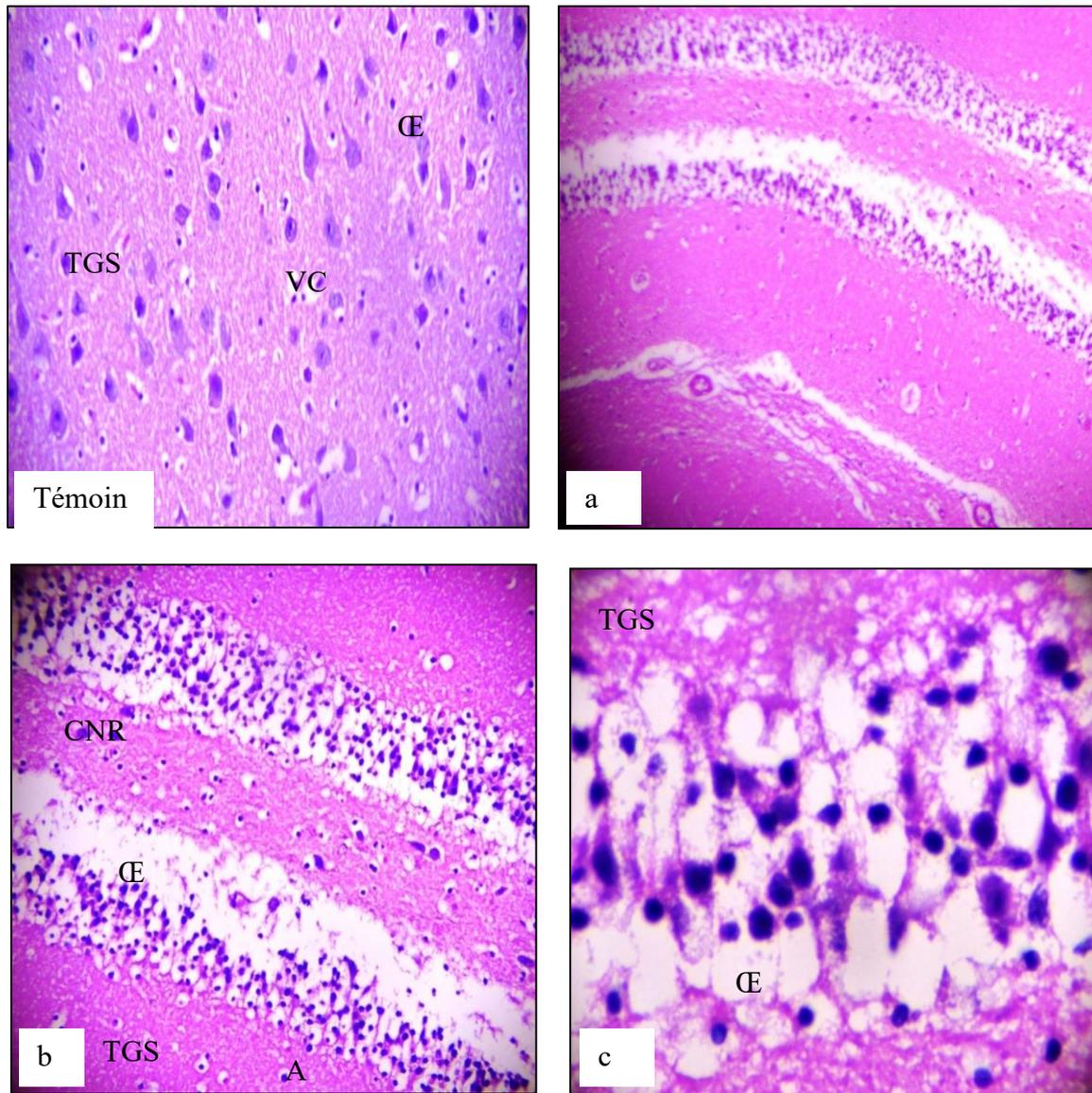


Figure 17 (a, b et c) Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin traité 3 (2 mg/kg)

Coloration HE ; Grossissement :x 4, x 10), x 40

A : Astrocyte, TGS : Tissu gliale de Soutien, CŒ : Œdème, CNR : Cellule Nerveuse Rétracté, VC : Vaisseau Congestive.

➤ Chez les lapins Traités 3 (Forte dose)

L'examen des coupes colorées HE obtenues à partir du groupe recevant une forte dose (2mg/kg) de la doramectine (groupe III) a révélé des changements histologiques sévères de l'hippocampe par rapport au groupe témoin. Une désorganisation des cellules nerveuses, un œdème important avec congestion des vaisseaux sanguins a été remarqué. Certains cellules nerveuses sont rétractées, d'autres sont éclatées (Figure 17).

III.2. Histopathologie de cervelet

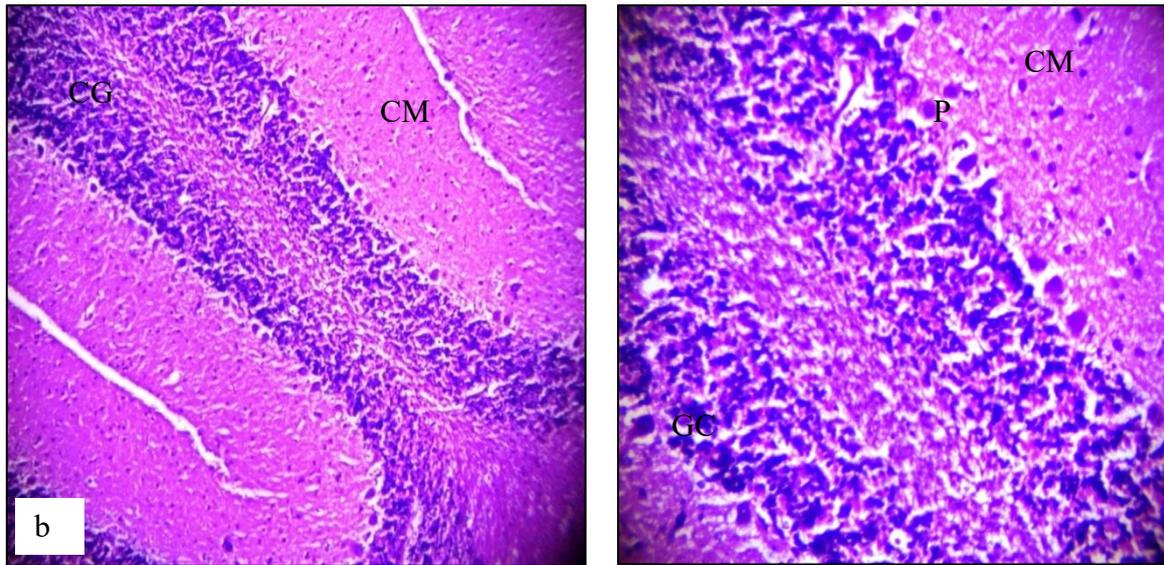


Figure 18 (a et b) Structure histologique du cervelet chez le témoin

Coloration HE ; Grossissement : x 4 (a), x 10 (b)

A: Astrocyte, CG : Couche Granulaire, CM : Couche Moléculaire, P : Cellule de Purkinje.

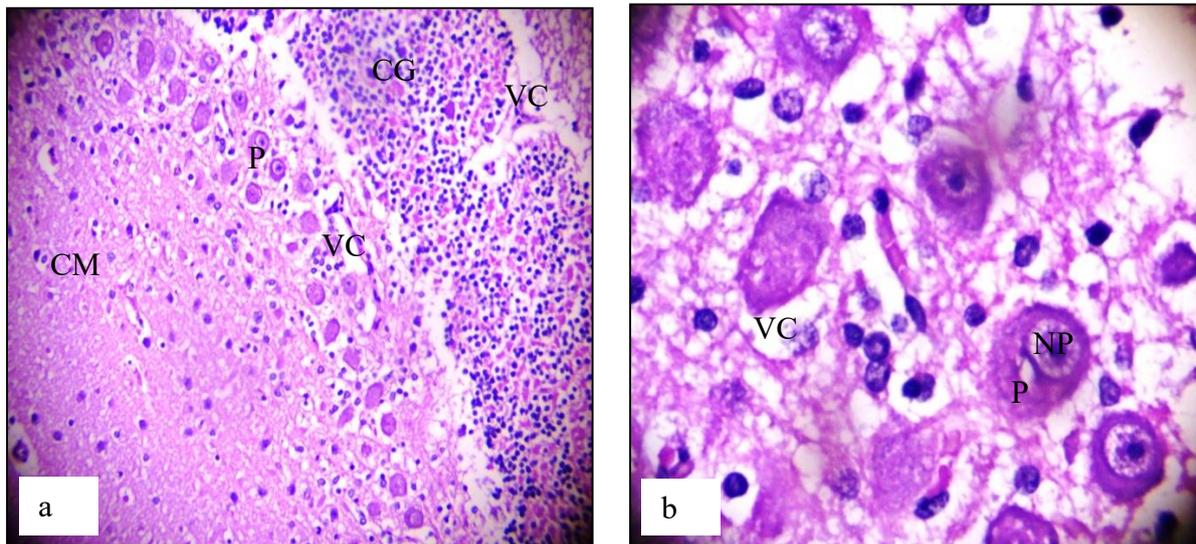


Figure 19 (a et b) Structure histologique du cervelet chez le groupe traité 1 (0.4 mg/kg)

Coloration HE ; Grossissement : x 10 (a), x 40 (b)

CM : Couche Moléculaire. CG : Couche Granulaire, VC : Vaisseau Congestive. P : Cellule de Purkinje. NP : Noyau de cellule de Purkinje.

- **Chez les lapins Témoins et Traités 1 (Faible dose)** L'étude histologique menée sur le cervelet chez les lapins témoins et les lapins traités à faible dose (0.4mg/kg) montre une structure normale des trois couches corticales cérébelleuses: couche moléculaire (CM), granulaire (CG) avec Alignement des cellules nerveuses de Purkinje qui sont bien individualisées (Figure 18, 19).

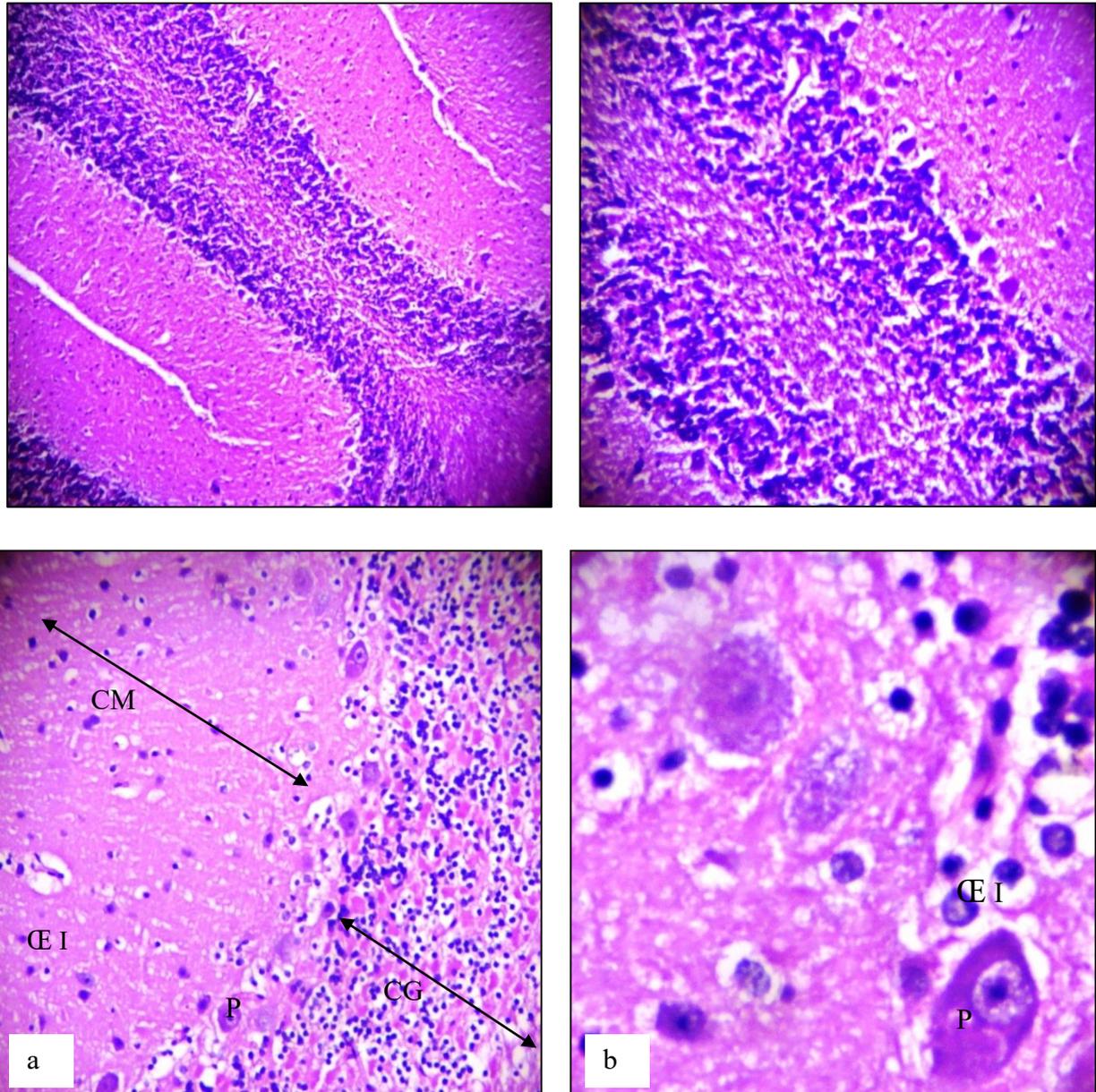


Figure 20 (a et b) Structure histologique de cervelet chez le groupe traité 2 (1 mg/kg)

Coloration HE; Grossissement :x 4, x 10), x 40

CE I : Œdème interstitiel. P : Cellule de Purkinje.

➤ Chez les lapins Traités 2 (Moyenne dose)

La structure histologique du cervelet chez les lapins exposés à la doramectine à des doses moyennes a montré un espacement des cellules ganglionnaires entre lesquelles on note la présence d'un œdème interstitiel. Les cellules de Purkinje sont plus au moins rétractées, lisses avec un halot clair (Figure 20).

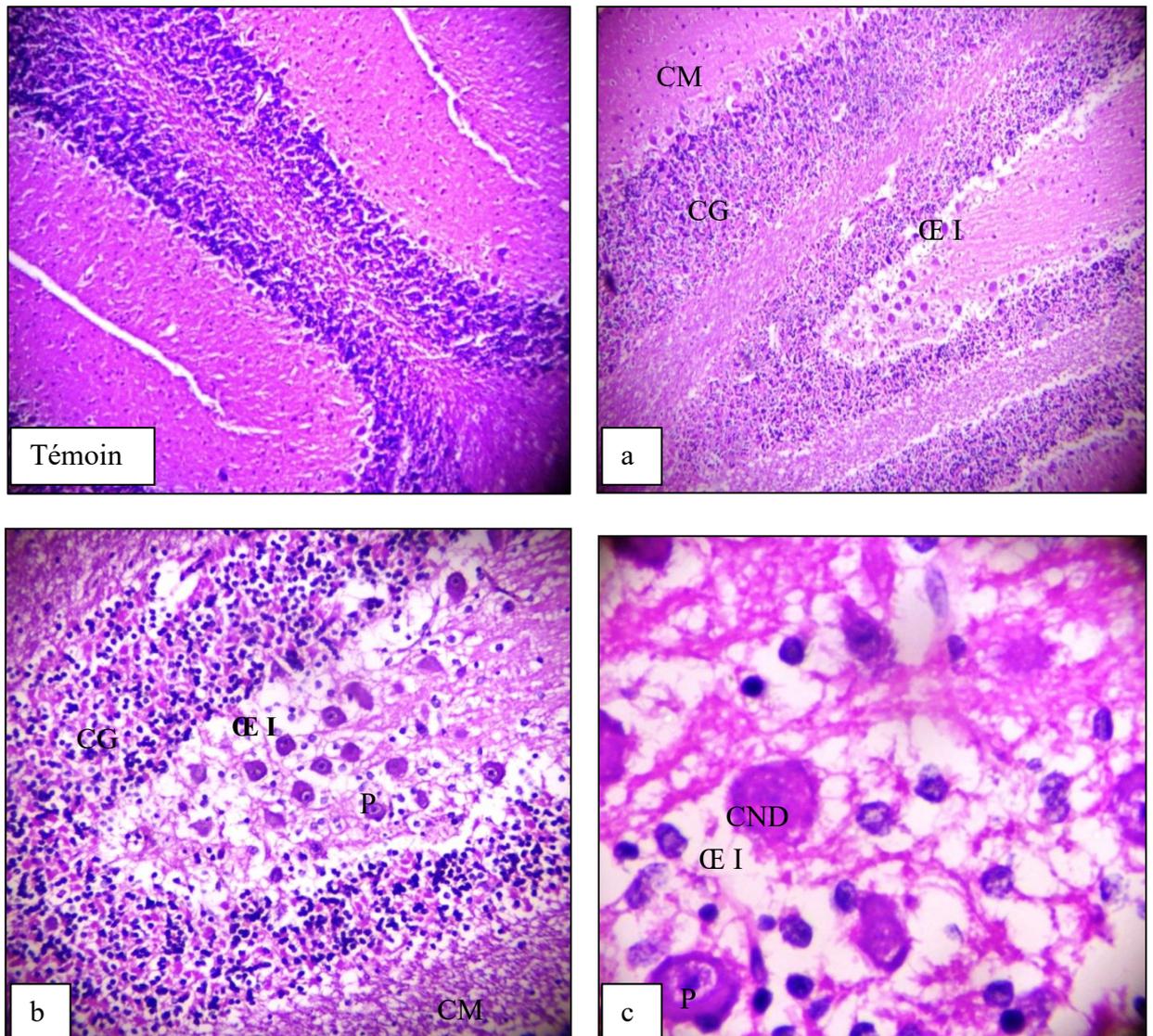


Figure 21 (a et b) Structure histologique de cervelet chez le groupe traité 3 (2 mg/kg)

Coloration HE ; Grossissement :x 4(a), x 10(b), x 40 (c).

CM : Couche Moléculaire, CG : Couche Granulaire, VC : Vaisseau Congestive, P : Cellule de Purkinje, N : Noyau de cellule du Purkinje, CE I : Œdème Interstitiel, CND : Cellule Nerveuse Dégénérescence.

➤ **Chez les lapins Traités 3 (Forte dose)**

Les coupes histologiques du cervelet chez les lapins recevant la forte dose (2mg/kg) de la doramectine ont révélé des changements dégénératifs dans les cellules de Purkinje par rapport au contrôle ; il y a présence des cellules nerveuses sans noyau qui témoigne la souffrance des cellules nerveuses de purkinje. En plus, nous avons remarqué la présence d'un important œdème interstitiel et des cellules de pukinje espacées et rétractées (Figure 21).

III.3. Examen Immunohistochimique

Immunoréactivité a été évalué. selon l'intensité de la coloration positive des cellules

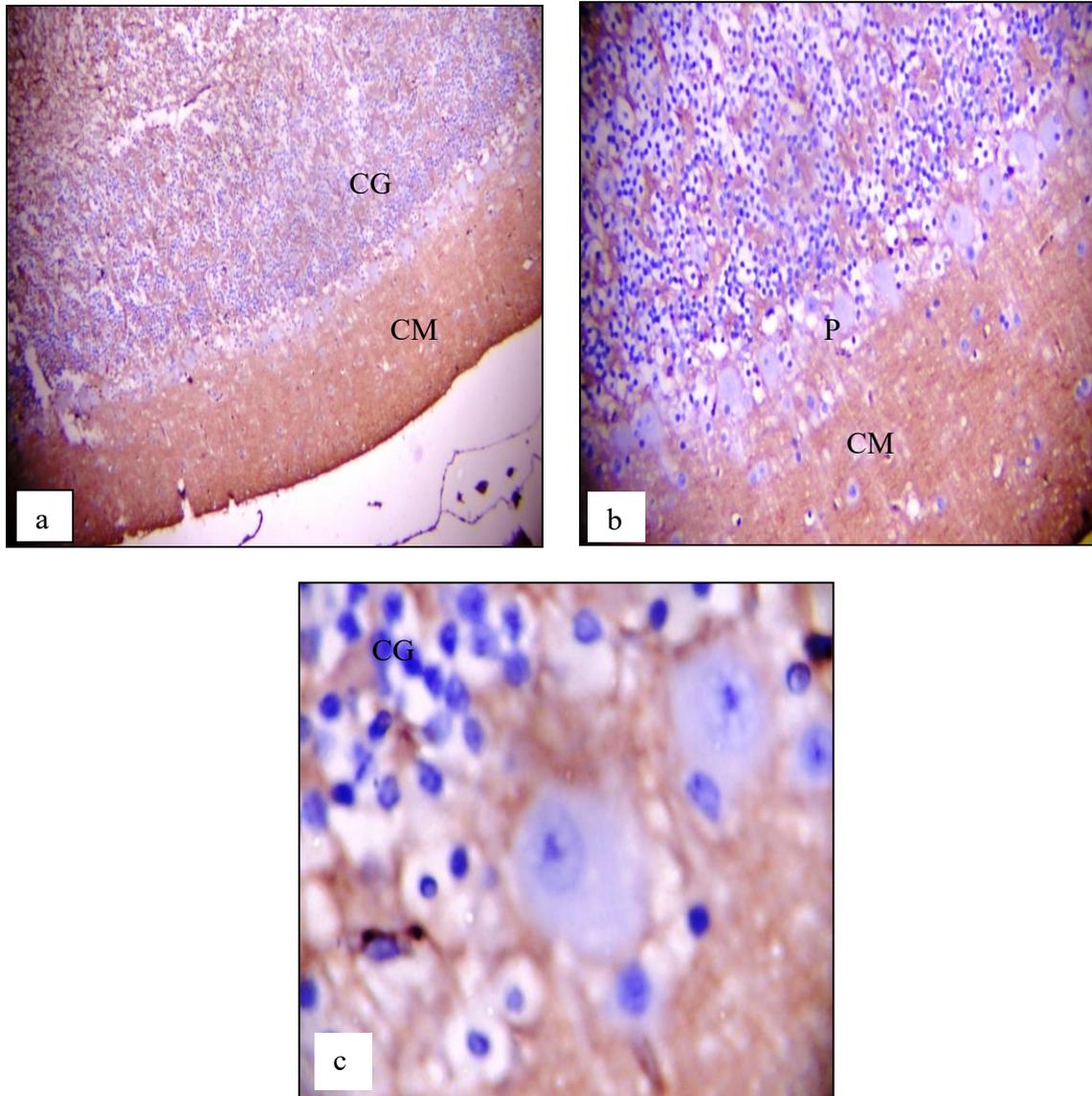


Figure 22 (a, b et c) Analyse immunohistochimique de Bcl2 dans le cervelet chez les lapins du groupe Traités 1 (Faible dose) montrant une réaction immunitaire négative pour Bcl2 ; **Grossissement : x 4 (a), x 10 (b) x40 (c)**

CM : Couche Moléculaire, **CG** : Couche Granulaire, **P** : Cellule de Purkinje.

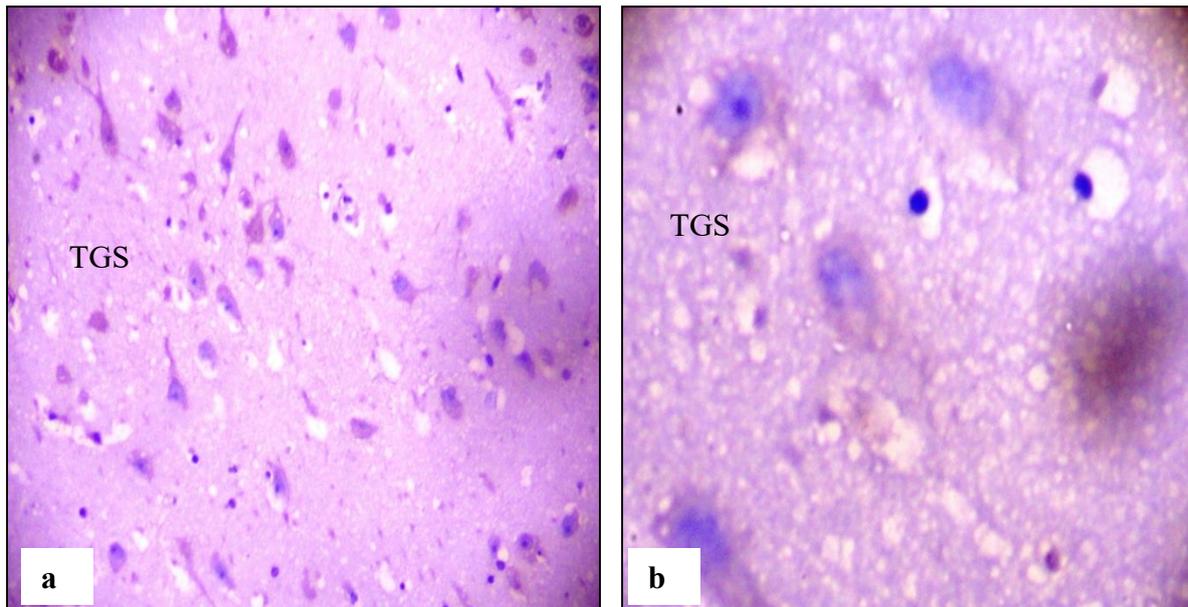


Figure 23 (a, b et c) Analyse immunohistochimique de Bcl2 dans l'hippocampe chez les lapins du groupe Traités 1 (Faible dose) montrant une réaction immunitaire négative pour Bcl2 G : x10 (a), x40 (b)

TGS : Tissu Gliale de Soutien.

➤ **Chez les lapins du groupe Traités 1 (Faible dose)**

L'examen immunohistochimique du cerveau et de cervelet de ce groupe a montré une immunoréactivité négative pour Bcl2 (Figure 22, 23).

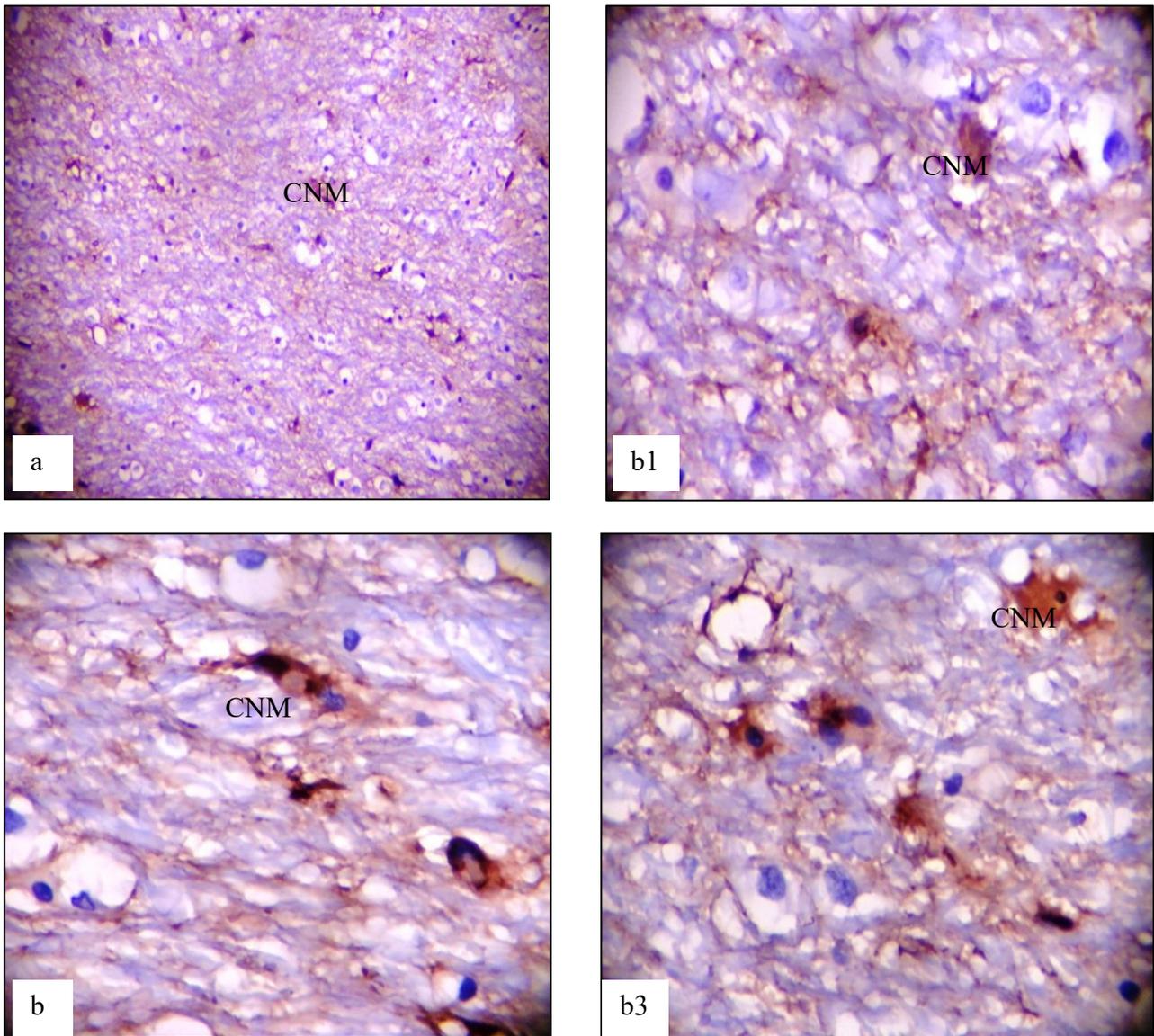


Figure 24 (a, b1, b2 et b3) Analyse immunohistochimique de Bcl2 dans l'hippocampe chez les lapins du groupe Traités 2 (moyenne dose) montrant une réaction immunitaire positive pour Bcl2

Grossissement : x 10 (a), x 40 (b ;1,2,3)

CNM : Cellule Nerveux Marquée

➤ **Chez les lapins du groupe Traités 2 (Moyenne dose)**

L'examen immunohistochimique de l'hippocampe chez les lapins Traités par la doramectine à la dose moyenne révèle un marquage nucléaire et cytoplasmique positive à l'anticorps anti-Bcl2 de quelques cellules qui ont été marquées rétractées. Les cellules détectées prennent la coloration marron allant au ruban foncé (Figure 24)

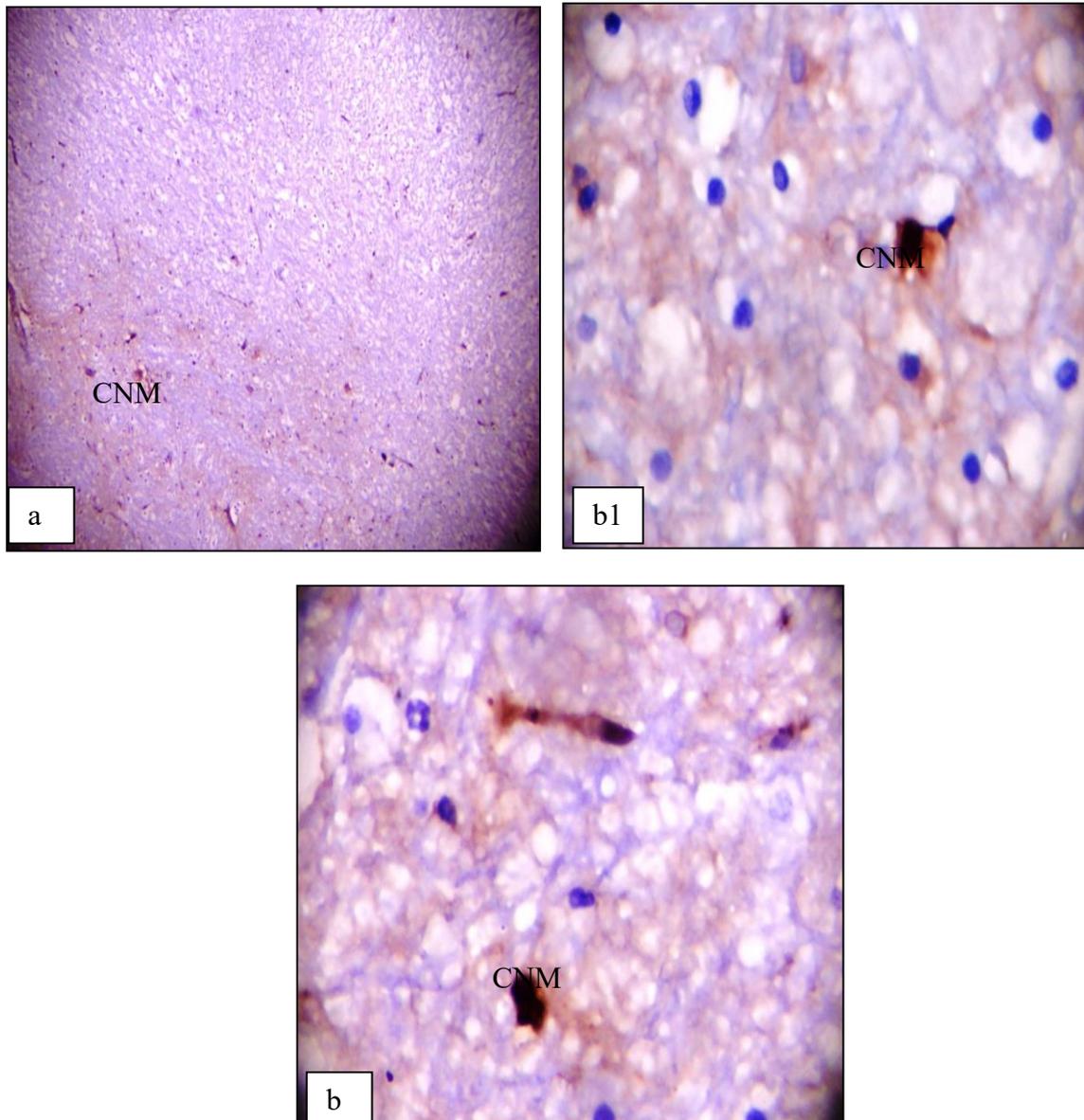


Figure 25 (a, b1 et b2) Examen immunohistochimique de Bcl2 dans le cervelet chez les lapins Traités par la doramectine à forte dose montrant une forte réaction immunitaire positive pour Bcl2

Grossissement : x 4 (a), x 40 (b ;1,2)

CNM : Cellule Nerveux Marquée

➤ **Chez les lapins Traités 3 (Forte dose)**

L'analyse immunohistochimique du cervelet chez les lapins traités par la doramectine à forte dose a montré de nombreux neurones avec une forte réaction immunitaire positive à l'anticorps Bcl2 dans leur cytoplasme et leur noyau (Figure). Les cellules marquées prennent la coloration marron allant au ruban foncé.

III.2. Discussion

Les lactones macrocycliques (ML) sont des antiparasitaires puissants largement utilisés pour contrôler les parasites internes et externes chez les animaux domestiques et le bétail. Ces xénobiotiques sont des molécules hydrophobes caractérisées par un large spectre d'activité avec une efficacité remarquable et durable. En outre, ces composés sont caractérisés par une large distribution, un long temps de résidence, et une élimination extensive dans le lait pendant la lactation (**Hennessy and Alvinerie, 2002**).

Cependant, l'utilisation intensive des xénobiotiques, entraîne leur accumulation dans les écosystèmes provoquant ainsi l'apparition de diverses pathologies humaine, parmi lesquels le cancer et les maladies neurodégénératives (**Greig et al., 2005 ; Lebailly et al., 2007**). Dans cette présente étude, nous nous sommes intéressés, à étudier l'impact de l'administration répétée de la doramectine sur l'hippocampe et le cervelet chez le lapin male et donc à la mise en évidence d'un éventuel effet neurotoxique.

L'analyse des coupes histologiques de l'hippocampe et le cervelet d'animaux traités par la doramectine montre une architecture cellulaire plus ou moins altérée en fonction de la dose. En effet, la faible dose de la doramectine (0.4 mg/kg) n'a induit aucune lésion visible au niveau de l'hippocampe et le cervelet. Alors que les coupes histologiques de SNC après administration d'une forte dose (2mg/kg), révèle des altérations structurales plus accentuées qui se manifeste par une désorganisation des cellules nerveuses, un œdème important avec congestion des vaisseaux sanguins dans l'hippocampe et une dégénéscence dans les cellules de Purkinje de cervelet.

Nos résultats sont en accord partiel avec les résultats de **Mahmoud et al., (2017)** qui ont trouvé des changements dégénératifs dans les neurones qui deviennent arrondis, gonflés, avec un noyau pycnotique et une perte de dendrites chez les lapins traités à des doses thérapeutiques et double dose thérapeutique d'ivermectine. Les lésions cérébrales étaient directement liées à la dose et à la fréquence d'administration. De plus, **Arise et al., (2012)** ont montré une perte de stratification distincte du tissu cérébral avec une augmentation des cellules polymorphonucléaires chez les rats traités avec l'ivermectine associé à l'albendazole pendant 14 jours. En outre, nos résultats histopathologiques corroborent ceux de **Qureshi et al.,(2013)** et **Ming et al., (2013)** qui ont révélé que l'exposition subaigüe à l'ivermectine chez les pigeons conduisaient à des caractéristiques morphologiques dégénérées et nécrotiques et

de malformations vasculaires dégénérées dans le cerveau, ainsi que à l'apparition des œdèmes cytoplasmiques dans le cervelet.

Il a été rapporté que les xénobiotiques (y compris les médicaments) induisent des réponses (**Omicinski et al., 2011**) perturbant la respiration et affectant la production d'énergie. Cela peut entraîner la dépendance des cellules du cerveau à la respiration anaérobie pour générer de l'énergie. L'accumulation éventuelle d'acide lactique dans les cellules du cerveau peut conduire à des dommages cellulaires suite à l'acidose lactique associés à l'inflammation. La capacité de cet xénobiotique à générer cet effet peut être attribuée à fait que les avermectines sont connues pour être neurotoxiques en raison de leur mode d'action sur les récepteurs GABA (**Leo et al., 1996**).

Les avermectines interagissent avec le système GABA des invertébrés provoquant ainsi leur paralysie. Sachant que les vertébrés possèdent également un système GABA, mais contrairement aux invertébrés, celui-ci se localise uniquement au niveau du système nerveux central et est donc protégé par la barrière hémato-méningée (**Brunner et al., 2005**). Cependant, les données récentes montrent que tous les avermectines interfèrent avec l'activité du transport par la Pgp, pouvant ainsi provoquer une accumulation de ces xénobiotiques dans le système nerveux et d'autres tissus (**Menez et al., 2012**).

En effet, l'ivermectine a déjà été décrite comme un puissant inhibiteur de la glycoprotéine P, qui est extrêmement importante dans la régulation du transport et l'élimination d'une large gamme de xénobiotiques (**Dider et Loo, 1996 ; Carcamo et al., 2011**). En outre, la nature lipophile de la doramectine peut conduire à son accumulation dans le SNC et produire des changements dans les tissus nerveux.

L'étude immunohistochimique de l'hippocampe chez les lapins traités par la doramectine à la dose moyenne montre un marquage nucléaire et cytoplasmique positive à l'anticorps anti-Bcl2 de quelques cellules qui ont été marquées rétractées. En outre, notre étude a montré de nombreux neurones avec une forte réaction immunitaire positive à l'anticorps Bcl2 dans leur cytoplasme et leur noyau dans le cervelet des lapins traités par la doramectine à forte dose.

Notre résultats immunohistochimique montre la présence de marquage à l'anticorps Bcl2. La Bcl2 est une molécule anti-apoptotique de 239 acides aminés. Elle est constituée de quatre

domaines d'homologies qui sont aussi présents chez d'autres protéines de la même famille. La présence de marquage à l'anticorps Bcl2 nous permet de conclure qu'il y a une prolifération des cellules au niveau de tissu qui présente le marquage.

Conclusion et perspective

Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail est d'explorer l'effet neurotoxique de la doramectine, un médicament vétérinaire anthelminthique, chez le lapin d'une souche locale « *Oryctolagus cuniculus* ».

Notre étude a conduit aux résultats suivant:

- L'observation microscopique des coupes de SNC des lapins traités à la faible dose de la doramectine (0.4mg/kg) a montré une structure histologique normale et classique de l'hippocampe et de cervelet sans lésion visible.
- L'examen microscopique des sections colorées HE de l'hippocampe du groupe III (moyenne dose 1 mg/kg) a révélé la présence de nombreuses cellules nerveuses rétractées et oedématisées ainsi que des dommages structuraux évidents.
- Des altérations histologiques sévères de l'hippocampe ont été provoquées par l'exposition subaiguë à la forte dose (2 mg/kg), à savoir : une désorganisation des cellules nerveuses, un œdème important et une congestion des vaisseaux sanguins.
- Les coupes histologiques du cervelet chez les lapins recevant la forte dose de la doramectine ont révélé des changements dégénératifs dans les cellules de Purkinje. En plus, nous avons remarqué la présence d'un important œdème interstitiel et des cellules de Purkinje espacées et rétractées.
- L'analyse immunohistochimique du cervelet et de l'hippocampe chez les lapins traités par la doramectine à forte dose et à moyenne dose respectivement, a montré un marquage immunitaire positif à l'anticorps Bcl2 dans leur cytoplasme et leur noyau.

Quelques perspectives se dessinent à la lumière des résultats obtenus :

- Il serait intéressant de reprendre l'étude sur une période plus longue pour évaluer la neurotoxicité chronique de ce xénobiotique.
- Il serait intéressant de faire appel à des méthodes alternatives de biologie moléculaires qui peuvent apporter des détails sur le mode d'action des avermectines.
- Rechercher l'effet amélioratif de substances antioxydants sur la toxicité de la doramectine.

Références bibliographiques

References Bibliographiques

- Allabi, a. C., Laleye. A., Amougou, O., Agonkoun, A., Gala, Jean-Luc., Horsmans, Y., (2012). *Polymorphismes du gène ABCB1 (MDR1) et impacts fonctionnels dans le transport de xénobiotiques. Particularités chez les sujets Noires Subsahariens*. Int. J. Biol. Chem. Sci. 6(2). 844-863.
- Alvinerie, M., Sutra, J.F., Galtier, P., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C., (1999). *Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle*. Res Vet Sci 66, 57-61.
- Amaral DG, Witter MP., (1989). *The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data*. Neuroscience; 31(3):571-591. Review.
- Arena, J.P., Liu, K.K., Paress, P.S., Frazier, E.G., Cully, D.F., Mrozik, H., Schaeffer, J.M., (1995). *The mechanism of action of avermectins in Caenorhabditis elegans: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity*. J Parasitol 81, 286-294.
- Arise, RO and Malomo, SO., (2009). *Effect of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats*. Afr. J. Biochem. Res.3(5):190-7.
- Arise, R. O.; Malomo, S. O. and Oyewole, O. I., (2012). *Histological changes in selected tissues of Ivermectin and/or Albendazole treated rats*. Int. J. Toxicol. Appl. Pharmacol.2(1):1-5.
- Bassissi, M.F., Alvinerie, M., Lespine, A., (2004). *Macrocyclic lactones: distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 138, 437-444.

- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA., (2016). *Neuroscience, Exploring the Brain. Fourth Edition. New York.* ISBN 978-0-7817-7817-6. 612.8-dc23. 1019pp.
- Berezowski, Vincent et al., (2016). *Physiologie humaine.* Paris : Édition Dunod, 418pages (Collection sous la direction de Marie-HélèneCanu). ISBN 978-2-10-07-4032-1.
- Bloom R.A., Matheson J.C., (1993). *Environmental Assessment of avermectins by the US Food and Drug Administration,* Vet. Parasitol. 48, 281-294.
- Brunner M, Langer O, Sunder-Plassmann R, Dobrozemsky G, et al., (2005). *Influence of functional haplotypes in the drug transporter gene ABCB1 on.*
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J.B., Wallick, H., Stapley, E.O., Oiwa, R., Omura, S., (1979). *Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. Antimicrob Agents Chemother.* 15, 361-367.
- Cambier J, Masson M, Dehen H, Masson C., (2008). *Neurologie.* 12ème edition. Elsevier Masson. 540pp.
- Carcamo JG, Aguilar MN, Barrientos CA, Carreño CF, Quezada CA, Bustos C, et al., (2011). *Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and the sea lice Caligus rogercresseyi. Aquaculture;* 321:207—15.

- Castanha Zanolli, J.C., Maioli, M.A., Medeiros, H.C.D., Mingatto, F.E. (2012). *Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: a potential mechanism of hepatotoxicity*, *Toxicol. In Vitro* 26 (1) 51–56.
- Copin JC, Gasche Y. (2003). Morphology and physiology of the blood-brain barrier. *Ann Fr Anesth Reanim.* ;22:202-14.
- Crooks, S.R.; Ross, P.; Thompson, C.S.; Haggon, S.A. and Elliot, C.T., (2000). *Detection of the unwanted residues of Ivermectin in bovine milk by dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay luminescence*. *Vet. Dec.*, 15 (6): 371-376.
- Derlon A .L. M., (2006). Étude pharmacocinétique de l'influence du sexe sur le profil plasmatique de la sélamectine chez le chien.
- Dider A, Loor F., (1996). The abamectin derivative ivermectin is potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs*;7:745—51.
- Dourmishev, A.L., Dourmishev, L.A., Schwartz, R.A., (2005), *Ivermectin: pharmacology and application in dermatology*. *Int J Dermatol* 44, 981-988.
- Elzoghby, R.R., Amin, A., Hamouda, F.A., Ali, A., (2015). *Toxicological and pathological studies of Ivermectin on male albino rats*. *Journal of American Science* 11, 73-83.
- Fisher, M.H., Mrozik, H., (1992). *The chemistry and pharmacology of avermectins*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 32, 537-553.
- Freund TF, Buzsáki G., (1996). *Interneurons of the hippocampus*. *Hippocampus*.;6(4):347- 470. Review.

- Goudie A.C., Evans N.A., Gration K.A.F., Bishop B.F., Gibson S.P., Holdom K.S., Kaye B., Wicks S.R., Lewis D., Weatherley A.J., BRUCE C.I., HERBERT A., SEYMOUR D.J., (1993)., *Doramectin – a potent novel endectocide*. Vet. Parasitol., 49: 5-15.
- Greig, N.H., Utsuki, T., Ingram, D.K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q.S., Mamczarz, J., Holloway, H.W., Giordano, T., Chen, D., Furukawa, K., Sambamurti, K., Brossi, A., Lahiri, D.K., (2005). *Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates*.
- Gros, Alexandra. (2018)., *La neurogenèse adulte chez les Mammifères*, Planet-Vie, <http://planet-vie.ens.fr/article/2490/neurogenese-adulte-mammiferes>.
- Hejmadi, M.V., Jagannathan, S., Delany, N.S., Coles, G.C., Wolstenholme, A.J., (2000)., L-glutamate binding sites of parasitic nematodes: an association with ivermectin resistance? Parasitology 120 (Pt 5), 535-545.
- Hennessy, D.R. and Alvinerie, M.R., (2002). *Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms*. In: Vercruysse, J., Rew, R.S. (Eds.), *Macrocyclic Lactones and Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing, pp. 97–123.
- Ismail, H.A., Suliman, S.E., Bulldan, G.A., Seri, H.I., 2013. *Haematological, biochemical and histopathological alteration induce by Ivermectin in donkeys (Equus asinus)*. Sudan J. Sci. Tech. 14, 1-14.
- Johnston D, Amaral DG., (1998). *The Hippocampus, in The Synaptic Organization of the Brain Fourth Edition*. GM Shepherd ed. New-York, NY: Oxford University Press. pp. 417-458.
- K Bedan Al Jassim, A Hassan Jawad, E AlMasoudi, S Khadim Majeed., (2016). *Histopathological and biochemical effect of ivermectin on kidney function, lung and the ameliorative effects of vitamin C in rabbits*. Bas.J.Vet.Res.Vol.14,No.4,

- Khaldoun-Oularbi H, Richeval C, Djenas N, Lhermitte M, Humbert L, Baz A., (2013). *Effect of sub-acute exposure to abamectin (insecticide) on liver rats (Rattus norvegicus)*. Ann Toxicol Anal. 25(2): 63-70.
- Lafaix A, Olivier. (2013). *Implication du récepteur au NMDA dans le vieillissement, l'apprentissage et la mémorisation : Approche expérimentale par surrégulation de la sous-unité GluN2B du récepteur au NMDA dans l'hippocampe*. Thèse de doctorat pour obtenir le grade de DOCTEUR VÉTÉRINAIRE. Toulouse: Université Paul-Sabatier de Toulouse, , 81 pages.
- Lamb, D.C., Ikeda, H., Nelson, D.R., Ishikawa, J., Skaug, T., Jackson, C., Omura, S., Waterman, M.R., Kelly, S.L., (2003)., *Cytochrome complement (CYPome) of the avermectin-producer Streptomyces avermitilis and comparison to that of Streptomyces coelicolor A3 (2)*. Biochem Biophys Res Commun p 450, 307, 610-619.
- Lebailly P, Niez E, Baldi I., (2007). Données épidémiologiques sur le lien entre cancers et pesticides. Oncology 9:361–369.
- Losson, B. (1997)., *Traitement insecticides et acaricides: progres recents et mise au point sur la problematique des resistances*. Annales de Médecine Vétérinaire. Volume 141: p 71-75.
- Mahmoud, S, GabAllah, AbdEl-baset, E, El-mashad, Aziza, A, Amin, Marwa, M, Darweish., (2017). *Pathological studies on effects of ivermectin on male and female rabbits*.
- Marchilac, Anne., (2004). *Voies de signalisation intracellulaires, apoptose et pathologies neurodégénératives*. Psychol NeuroPsychiatr Vieillesse 2004 ; vol. 2, n° 3 : 203-14.
- McKellar, Q., Benchaoui, H., (1996). *Avermectins and milbemycins*. J. Vet. Pharmacol. Ther. 19, 331–351.

- Menez, C., Mselli-Lakhal, L., Foucaud-Vignault, M., Balaguer, P., Alvinerie, M., Lespine, A., (2012). *Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line*. *Biochem. Pharmacol.* 83, 269–278.
- Ming Li ;Tian-Zi You ; Wen-Jun Zhu; Jian-Ping Qu ; Ci Liu ; Bing Zhao ; Shi-Wen Xu and Shu Li., (2013): *Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin*. *J. Ecotoxicol.* 22:1241–1254
- Mkula, S., Stone, JM., Berman, A.L., and Jones, E.G., (2006). *A digitalsteriotaxic atlas of the brain of the monkey, Macaca mulatta* Available at www.brainmaps.org where regular updates and new material will be posted.
- Omiecinski, C.J. J.P. Vanden Heuvel, G.H. Perdew, J.M. Peters. (2011)., *Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities*. *Toxicological Sciences*120: S1 S49-S75
- Omura, S., 1979., *Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation*. *Antimicrob Agents Chemother* 15, 361-367.
- Omura S, Crump A. (2004)., *The life and times of ivermectin - a success story*. *Nature reviews.Microbiology*. Volume 2(12): p 984-989.
- Pascal H., (2010). *Le système nerveux*. 2ème eddition. 44-62pp.
- Pemberton, D.J., Franks, C.J., Walker, R.J., Holden-Dye, L., (2001), *Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant Caenorhabditis elegans delineates the role of the subunit GluCl-alpha2 in the function of the native receptor*. *Mol Pharmacol* 59, 1037-1043.

- Peterson BS et al., (2015). *Effects of prenatal exposure to air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons) on the development of brain white matter, cognition, and behavior in later childhood*. *Jama psychiatry* 72(6): 531-540.
- Pernot, Fabien. (2009)., *Evènements cellulaires et moléculaires associés à l'épileptogénèse dans deux modèles murins d'injection intrahippocampique de toxiques. Implication des mécanismes neuro-inflammatoires*. Thèse de doctorat en santé, le cognition et l'environnement. Paris : Université Joseph Fourier, , 227 pages.
- Ramón y Cajal S. (1911)., *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Vols. 1 and 2. A. Maloine : Paris.
- Richard WB, Brinton MM, Edward EB et al., (1979)., *Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Volume 15(3): p 361-367.
- Sakin F, Yonar SM, Yonar ME, Saglam N. (2012)., *Changes in selected immunological parameters and oxidative stress responses in different organs of *Oncorhynchus mykiss* exposed to ivermectin*. *Rev Chim* 63:989–995.
- Sarasola P, Jernigan AD, Walker DK et al. (2002)., *Pharmacokinetics of selamectin following intravenous, oral and topical administration in cats and dogs*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy*. Volume 25: p 265-272.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., et al., (1994). *Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs*. *Cell* 77, 491-502.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., (1996). *P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs*. *J Clin Invest* 97, 2517-2524.

- Sebbag L. (2011)., *Efficacité des avermectines contre les acarioses du chien : revue systématique*. Thèse de doctorat en vétérinaire, université Paul-Sabatier de Toulouse, France.
- Shoop, W.L., Ostlind, D.A., Rohrer, S.P., Mickle, G., Haines, H.W., Michael, B.F., Mrozik, H., Fisher, M.H., (1995). *Avermectins and milbemycins against Fasciola hepatica: in vivo drug efficacy and in vitro receptor binding*. Int J Parasitol 25, 923-927.
- Shoop, W., Mrozik, H., Fisher, M., (1995). *Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health*. Vet. Parasitol. 59, 139–156.
- Shoop W.L., Soll M., (2002), *Ivermectin, Abamectin and Eprinomectin*. In : Vercruysse J., Rew R.S. (eds), *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. CAB International, Wallingford, 1-29.
- Sheriff JC, Kotze AC, Sangster NC et al., (2002). *Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on feeding and pharyngeal pumping in Trichostrongylus colubriformis in vitro Parasitology*; 125: 477-484.
- Shoeb, Q., (2013). *Biochemical toxicity of ivermectin in wister albino rats*. Am. Eurasian. J. Toxicol. Scie.,5:15-19.
- Toutain, P.L., Upson, D.W., Terhune, T.N., McKenzie, M.E., (1997). *Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle*. Vet Parasitol 72, 3-8.
- Trailovic, S.M. and Varagie, V.M., (2007). *The effect of ivermectin on convulsions in rats produced by Lidocaine and Strychnine*. Vet. Rese. Commun.,31: 863-872.
- Tranquilli, P.A. Leo., Seward, W.J., Todd, R.L., K.S., Dipietro, J.A., (1996). *Clinical observations in collies given ivermectin orally*. Am. J. Vet. Res. 48 684-685.

- Vercruyse, J. and Rew, R. E. (2002). *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- World Health Organization. (1999). *Future trends in veterinary public health = Santé publique vétérinaire : perspectives d'avenir*. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 74 (19), 154 - 156.
- Zhu W.J., LI M., Liu C., Qu J.P., Min Y.H., Xu S.W., Li S. (2013). Avermectin induced liver injury in pigeon. *mechanisms of apoptosis and oxidative stress*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 74–81.
- Yoon, Y.J., Kim, E.S., Hwang, Y.S., Choi, C.Y., (2004). *Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 626–634.

Annexes

Annexes

✓ Matériel histologique



Microtome *Leica*. Originale 2018



Étuve. Originale 2018



Automate-circulation. Originale 2018



Station d'enrobage en paraffine *Leica*. Originale 2018



Bain-marie. Originale 2018



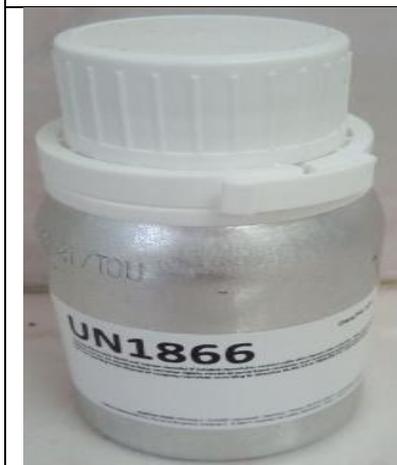
Plaque réfrigéré. Originale 2018



Réfrigérateur. Originale 2018



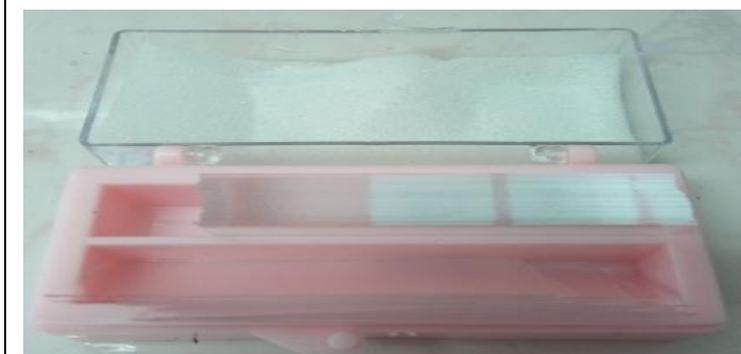
Cassette en plastique inclus en paraffine . Originale 2018



Liquide de montage. Originale 2018



Microscope optique. Originale 2018



Lamelles. Originale 2018



Lames. Originale 2018



Panier. Originale 2018



Portes lames. Originale 2018



Moule métallique. Originale 2018



Parraine . Originale 2018

✓ Matériels dimmunomarquage



Appareil distillateur. Originale 2018



Incubateur. Originale 2018



Porte lames



Micropipette. Originale 2018



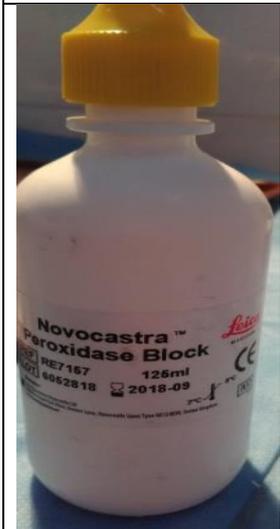
Polymère. Originale 2018



Hématoxyline. Originale 2018



Réactif Bcl2. Originale 2018



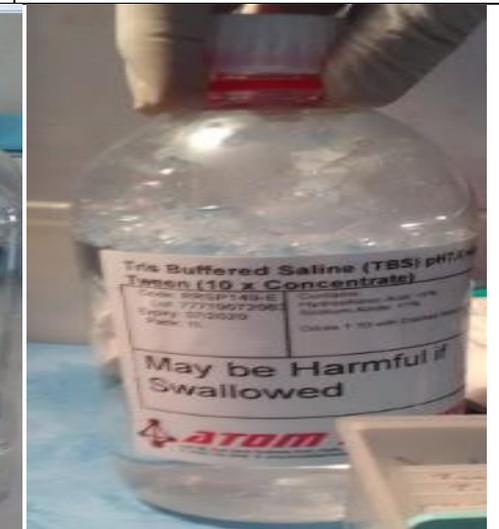
Protéine Block peroxydase. Originale 2018



L'anticorps secondaire. Originale 2018



Solution tempon. Originale 2018



Le TBS. Originale 2018



Trouce de dissection

