

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

UNIVERSITE BLIDA 1



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE, ENVIRONNEMENT ET SANTE

Option:

BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Thème

**Etude Histologique et Immunohistologique du cerveau et
cervelet chez le Lapin Traité par le Voliam Targo®**

Présenté par :

M^{elle} MOSTEFAOUI Ahlem

M^{elle} BENMIRA ZITOUNI Khadidja

Soutenues le 02/07/2018

Devant le jury composé de :

M^{me} MATAOUI H.	MCB	Présidente
M^{me} BENAZOUZ F.	MAA	Examinatrice
M^{me} BOUKRETA S.	MAA	Promotrice
M^{me} BOUZID N.	MAA	CO-Promotrice
M^{me} SAADI L.	MCA	Chef d'option

Promotion : 2017-2018

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre promotrice, **Mme BOKRETA S.** pour son aide, ses conseils, son orientation et sa grande gentillesse.

Nous tenons à exprimer tout notre reconnaissance et notre profond respect pour notre co-promotrice **Dr BOUZID**, qui n'a ménagé aucun effort pour nous conseiller, nous orienter et nous guider malgré ses lourdes charges. Nous lui témoignons notre profonde gratitude et notre affectueuse reconnaissance.

Nous remercions grandement **Mme KHALDOUN** d'avoir toujours été présente pour répondre à nos questions et pour nous avoir guidées tout au long de notre expérimentation.

Nous adressons également notre profonde gratitude à l'ensemble des membres du jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail :

- **M^{me} MATAOUI H.** Maître de conférence B à UB1 qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.
- **M^{me} BENAZOUZ F.** Maître assistante A à UB1 qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail. Nous tenons à lui exprimer notre profonde gratitude.

Notre profond respect s'adresse également à l'ensemble des membres de laboratoire d'anatomopathologie à l'hôpital NAFISSA HAMOUDA ex : PARNEY de ALGER qui nous ont aimablement et chaleureusement accueillis au sein de leur équipe.

Nos familles et nos amis qui ont étaient toujours là pour nous encourager et nous soutenir. Pour finir, nous adressons nos remerciements à tous nos enseignants qui ont su nous transférer leur savoir et sans qui nous n'aurions pas pu arriver aussi loin dans nos études.

DEDICACES

A mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée et pour leurs soutiens, leurs confiances ainsi que leurs prières tout au long de mes études. Sans eux je ne serais jamais arrivé à ce stade de ma vie, que dieu vous accorde santé, longue vie et vous garde à mes coté.

Mes dédicaces s'adressent aussi :

A mes chère(s) sœurs et frères Merci pour leurs présences, leurs soutiens et leurs encouragements.

A mes adorables amies : Nabila, Khalida, Meriem, Wassila et Nabila avec lesquelles j'ai partagée des moments de joie et de bonheur

A toute la promotion de biologie moléculaire et cellulaire 2018 sans exception.

Merci à tous.

Khadidja ; Ahlem

RESUME

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet neurotoxique de Voliam Targo®, un nouvel insecticide composé de deux matières actives (le chlorantraniliprole et l'abamectine) appartenant à deux familles chimiques différentes, sur le système nerveux central chez des lapins males d'une souche locale *Oryctolagus cuniculus*.

20 lapins males sont répartis en 4 groupes, le premier groupe représente les témoins qui reçoivent de l'eau distillé tandis que les groupes 2, 3 et 4 reçoivent le Voliam Targo® à raison de 1/100 DL50, 1/50 DL50 et 1/20 DL50 respectivement par voie orale pendant 21 jours. A la fin de l'expérimentation, les lapins sont sacrifiées, les organes (cerveau et cervelet) sont prélevés pour une étude histopathologique et immunohistochimique.

Les résultats histopathologiques montrent que le Voliam Targo® a provoqué des changements dans l'histologie des deux organes étudiés, à savoir : une présence d'œdème au niveau de cervelet et l'hippocampe, une dégénérescence et un espacement des cellules nerveuses, une rétraction cellulaire et l'apparition de fonte nucléaire des cellules de Purkinje. Ces multiples altérations semblent être accentuées en fonction de la dose administrée. L'étude immunohistochimique a révélé un marquage cytoplasmique et nucléaire positif des cellules nerveuses en apoptose dans l'hippocampe et le cervelet du lapin marqués par l'anti BCL2. Cependant, chez les lapins marqués par l'anti CD45, les résultats montrent l'absence de réactivité.

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'exposition subaiguë au Voliam Targo® peut être toxique, affectant l'intégrité structurale des tissus de l'hippocampe et de cervelet et peut ainsi entraîner une perte des fonctions tissulaires.

Mots clés : Voliam Targo®, Hippocampe, Cervelet, Toxicité, Histopathologie, Immunohistochimie, Lapin.

ABSTRACT

The aim of the present study is to evaluate the neurotoxic effect of Voliam Targo® that is a combination of two insecticides “abamectin and chlorantraniliprole” belonging to two different chemical families, on the central nervous system in rabbits males of a local strain *Oryctolagus cuniculus*.

20 male rabbits are divided into 4 groups, the first group represents the controls who receive distilled water while the groups 2, 3 and 4 receive the Voliam Targo® at a concentration of 1/100 LD50, 1/50 LD50 and 1/20 LD50 respectively orally for 21 days. At the end of the experiment, the rabbits are sacrificed; the organs (brain and cerebellum) are removed for a histopathological and immunohistochemical study.

The histopathological results show that Voliam Targo® caused changes in the histology of the two organs studied, namely: a presence of edema in the cerebellum and the hippocampus, degeneration and spacing of the nerve cells, retraction cell and the appearance of nuclear melting of Purkinje cells. These multiple alterations seem to be accentuated according to the dose administered. The immunohistochemical study revealed positive cytoplasmic and nuclear staining of apoptotic nerve cells in the rabbit hippocampus and cerebellum labeled with anti BCL2. However, in rabbits labeled with anti CD45, the results show the absence of reactivity.

In conclusion, these results suggest that sub-acute exposure to Voliam Targo® may be toxic, affecting the structural integrity of the hippocampal and cerebellar tissues and may result in loss of tissue function.

Key words: Voliam Targo®, Hippocampus, Cerebellum, Toxicity, Histopathology, Immunohistochemistry, Rabbit.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير السمي العصبي لـ Voliam Targo® ، وهو مبيد حشري جديد يتكون من مكونين نشطين (abamectin chlorantraniliprole) ينتميان إلى عائلتين كيميائيتين مختلفتين ، على الجهاز العصبي المركزي في الأرناب. ذكور سلالة محلية جديدة Oryctolagus

قسم 20 ، المجموعة الأولى تمثل الضوابط التي تتلقى الماء المقطر في حين أن 4 ، المجموعة الأولى تمثل الضوابط التي تتلقى الماء المقطر في حين أن LD50 20/1 LD50 50/1 LD50 100/1 Voliam Targo® 4 3 2 التوالي عن طريق الفم لمدة 21 يوما. في نهاية التجربة ، يتم التضحية بالأرناب ، تتم إزالة الأعضاء (الدماغ والمخيخ) للدراسة النسيجية والكيمياء المناعية.

تظهر النتائج النسيجية أن Voliam Targo® تسبب في تغيرات في الأنسجة في العضوين السابقين ، وهما: وجود الو في المخيخ و hippocampus تنكس و تباعد الخلايا العصبية ، تراجع الخلية وظهور نوبان النوية من الخلايا Purkinje. يبدو أن هذه التعديلات المتعددة يتم إبرازها طبقاً للجرعة التي تتم إدارتها. كشفت دراسة immunohistochemical إيجابية تلوخ السيتوبلازمية والنوية للخلايا العصبية في الخلايا الأروماتية في قرن آمون والمخيخ المسم BCL2 .CD45 تظهر عدم وجود التفاعلية.

في الختام ، تشير هذه النتائج إلى أن التعرض شبه الحاد لـ Voliam Targo® قد يكون سائماً ، مما يؤثر على السلامة الهيكلية لأنسجة الحصين والمخيخ ، وقد يؤدي إلى فقدان وظيفة الأنسجة

الكلمات المفتاحية : Voliam Targo® ، فرس البحر ، المخيخ ، السمية ، علم التشريح المرضي ، الكيمياء المناعية ،

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Anticorp

ACh : Acétylcholine

ACL : Antigène commun leucocytaire

Bcl-2 : B-Cell CLL/lymphoma 2

CA : Corne d'Ammon

CD45 : Cluster de différenciation 45

CHU : Centre hospitalo-universitaire

CPF : Chlorpyrifos

DAB : Diaminobenzidine tétrahydrochloride

DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloro-éthane

DL₅₀ : Dose létale 50

F : Floccule

FL : flocculonodularis lobus (lobe flocculo- nodulaire)

FL : Fissure postérolatérale

Fp : Fissure primaire

Fs : Fissure secondaire

GABA : Gamma Amino-Butyrique Acide

GluCl : glutamate-gated chloride channels

GD : Gyrus denté

HE : Hématoxyline éosine

HRP : Horseradish peroxydase.

I : Pédoncule cérébelleux inférieur

L/M : *Lacunosum-moleculare*

M : Pédoncule cérébelleux moyen

N : Nodule

O/A : *Orientalisveus*

OPs : Organophosphates

POX : chlorpyrifos-oxon

ROS : Reactive Oxygen Species

RyR : Récepteurs de la ryanodine

S : Pédoncule cérébelleux supérieur

SB : Substance blanche

SG : Substance grise

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

TBS : Tris-buffered saline

VT : Voliam Targo®

V4 : Quatrième ventricule

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Structure chimique de l'Abamectine	8
2	Mécanisme d'action des avermectines	9
3	Structure chimique de chlorantraniliprole	11
4	Mode d'action de Chlorantraniliprole	12
5	Coupe transversale de l'hippocampe	13
6	L'organisation cellulaire du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon	15
7	Coupe sagittale médiane du tronc cérébral et du cervelet	16
8	Vue ventrale du cervelet après ablation du tronc cérébral	17
9	les couches cellulaires du cortex cérébelleux	18
10	Photographie originale représentant l'étape de la dissection	21
11	Automate de déshydratation (Originale)	22
12	L'étape d'enrobage	23
13	Microtome	24
14	Coloration HE	24
15	L'étape de montage	25
16	Observation microscopique des lames	26
17	Etape de démasquage thermique	27
18	Etapes de l'immunohistochimie	29
19	Lames prêtes à l'observation	30
20	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin témoin. Coloration HE; Grossissement: x4(a) x10(b), x40 (c)	32
21	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin Traités 1 (VT à faible dose). Coloration HE; Grossissement: x 10	32
22	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin Traités 2 (VT à dose moyenne) Coloration HE; Grossissement: x10(a), x40(b)	33
23	Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin Traités 3 (VT à forte dose). Coloration HE; Grossissement: x 10(a), x 40(b)	34
24	Structure histologique du cervelet chez le témoin. Coloration HE; Grossissement: x 4 (a), x 10 (b)	36
25	Structure histologique du cervelet chez le lapin Traités 1 (VT à faible dose)	37

	Coloration HE; Grossissement: x 10	
26	Structure histologique de cervelet chez le lapin Traités 2 (VT à dose moyenne).Coloration HE; Grossissement : x 10(a), x 40(a)	37
27	Structure histologique de cervelet chez le lapin Traités 3 (VT à forte dose) Coloration HE; Grossissement : x 10(a), x 40(b)	38
28	Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cerveau chez le lapin Traités par VT à faible dose. Grossissement : x 10	41
29	Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cerveau chez le lapin Traités par VT à moyenne dose. Grossissement : x 10	41
30	Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cervelet chez le lapin Traités par VT à faible dose. Grossissement : x 10	42
31	Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cervelet chez le lapin Traités par VT à moyenne dose. Grossissement : x 40	42
32	Photographie d'immunomarquage par Bcl-2 de cervelet Gr x40 (a) ; Gx10(b) et cerveau Gx40 (c) chez le lapin Traités par VT à forte dose	43
33	Photographie d'immunomarquage par CD45 de cerveau(a) et cervelet (b) chez le lapin Traités par VT à forte dose. Grossissement : x 40	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
I	Quelques familles chimiques de pesticides et leur classement selon leur cible	3
II	Etape de déparaffinage	26
III	Etape de déshydratation	29

Sommaire

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Rappels Bibliographiques	3
I.1. Généralités sur les pesticides	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Classification	3
I.1.3. Composition	4
I.1.4. Toxicité.....	4
I.1.4.1. Toxicité aiguë ou subaiguë.....	4
I.1.4.2. Toxicité chronique (à long terme).....	5
I.1.5. Effet des pesticides sur la santé.....	5
I.1.5.1. Effet de pesticides sur le système nerveux.....	5
I.2. Voliam Targo	6
I.2.1. Définition	6
I.2.2. Abamectine.....	7
I.2.2.1. Structure et classification.....	7
I.2.2.2. Toxicocinétique.....	8
I.2.2.3. Mode d'action d'abamectine	8
I.2.2.4. Toxicité d'abamectine	9
I.2.3. Chlorantraniliprole	10
I.2.3.1. Structure et classification	10
I.2.3.2. Mode d'action de chlorantraniliprole	11
I.2.3.3. Toxicité de chlorantraniliprole.....	12
I.3. Système nerveux central	12
I.3.1. Cerveau.....	13
I.3.1.1. Hippocampe	13
I.3.1.1.1. Organisation anatomique	13
I.3.1.1.2. Organisation cellulaire.....	14
I.3.2. Cervelet	16
I.3.2.1. Organisation anatomique	16
I.3.2.2. Organisation cellulaire	17
CHAPITRE II : Matériel et Méthodes	19
II.1. Matériel	19
II.1.1. Matériel biologique	19
II.1.1.1. Model animal	19
II.1.1.2. Les anticorps	20
II.1.2. Matériel non biologique	20
II.2. Méthodes	20
II.2.1. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes.....	21
II.2.2. Etude histologique	21

II.2.3. Etude Immunohistochimique	26
---	----

CHAPITRE III : Résultats et Discussion..... 31

III.1. Résultats et discussion de l'étude histologique..... 31

III.1.1. Histopathologie de l'hippocampe..... 31

III.1.1. Histopathologie de cervelet 35

III.2. Résultats et discussion de l'étude immunohistochimique 41

Conclusion 46

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Au cours des deux dernières décennies, la révolution industrielle et le développement technologique dans le domaine de l'agriculture a considérablement compliqué les problèmes de l'environnement (**Andra et al., 2017**). L'explosion démographique de la population mondiale et ses besoins alimentaires et sanitaires sont les principales raisons ayant conduit à une augmentation spectaculaire de la production et l'utilisation des pesticides susceptibles d'engendrer l'apparition de plusieurs maladies (**El-Hassani et al., 2008 ; Stoytcheva, 2011**).

Les pesticides sont des substances utilisées pour prévenir, détruire, repousser ou atténuer les ravageurs. Ils regroupent des composés organiques et inorganiques à action plus ou moins spécifique, tels que les herbicides, les fongicides et les insecticides (**Echobichon, 2001**). L'usage des pesticides posent cependant des dommages sur les écosystèmes naturels et des problèmes sur la santé publique (**Housseine Bouya, 2015**) en particulier les pathologies cancéreuses, des maladies neurologiques (maladie de Parkinson, sclérose latérale amyotrophique et maladie d'Alzheimer) ainsi que dans la reproduction (**Lebailly et al., 2007**).

De nombreuses études antérieures ont montré que les pesticides sont toxiques pour l'organisme animal, en provoquant une neurodégénérescence des cellules du cerveau, le dysfonctionnement de l'activité locomotive, l'apprentissage et la fonction de mémorisation (**El Hassani et al., 2008**).

En effet, le cerveau est le plus grand consommateur d'énergie d'où la production intense des radicaux libres. Cette évidence explique l'importance du cerveau dans le corps, mais aussi sa sensibilité aux xénobiotiques qui affectent globalement les enzymes mitochondriales, les enzymes de détoxification, les neurotransmetteurs ou encore induisent la voie de signalisation apoptotique, la nécrose cellulaire dans le cerveau (**Baltazar MT et al., 2013**).

Le Voliam Targo® (VT) est un nouvel insecticide et acaricide, composé de deux matières actives appartenant à deux familles chimiques différentes: le chlorantraniliprole (45g/l, Anthranilamide) et l'abamectine (18g/l, Avermectine), efficace sur plusieurs ravageurs clés des fruits et légumes. La synergie de ses deux matières actives offre une meilleure efficacité ; en agissant sur deux sites d'action différents : les récepteurs Ryanodine et les canaux chloridriques (**Valent et al., 2012**).

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressées à la recherche d'une toxicité subaiguë par voie orale du Voliam Targo® à raison de trois doses (faible, moyenne et forte) administrées quotidiennement pendant 21 jours, sur le système nerveux central chez des lapins males d'une souche locale *Oryctolagus cuniculus*. L'étude est basée sur l'étude histologique et immunohistochimique de l'hippocampe et le cervelet des lapins traités.

Notre travail comporte trois chapitres. Dans le premier, nous rapportons des rappels bibliographiques sur les pesticides, le Voliam Targo® et l'organe étudié. Nous décrivons le matériel et les techniques utilisés dans le deuxième chapitre. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième chapitre. A la fin, une conclusion et des perspectives sont présentées.

1. Généralités sur les pesticides

I.1.1. Définition

La réglementation algérienne définit le pesticide à travers **l'article 2 de la loi algérienne du journal officiel N° 87-17 du 01 Aout 1987** relative à la protection phytosanitaire désigne un pesticide ou produit phytosanitaire comme : « substance ou mélange de substances destiné à repousser, détruire ou combattre les organismes nuisibles, en vue de la protection végétale. Le terme comprend les agents biologiques, les régulateurs de croissance, les correcteurs de carence, les défoliants, les agents de dessiccation, les agents d'éclaircissage ainsi que les substances appliquées sur les cultures avant ou après récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport ».

I.1.2. Classification

Les pesticides sont habituellement classés par famille en fonction de leur structure chimique : organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides, lactones macrocycliques, pyridines, anthranilamides etc. Elles peuvent être également regroupées selon leurs cibles principales qui sont pour la majorité d'entre elles des végétaux, des champignons ou des insectes considérées comme nuisibles à l'agriculture. On détermine les principales classes suivantes de pesticides : les insecticides, les herbicides, les fongicides, les rodenticides, les molluscicides et les fumigants (**Tableau I**) (**Boland et al., 2004**).

Tableau I : Quelques familles chimiques de pesticides et leur classement selon leur cible :

Famille chimique	Exemples de molécules	Classement selon cible
Organochlorés	DDT, Chlordane, Lindane, Dieldrine, Heptachlore...	Insecticides
Organophosphorés	Malathion, Parathion, Chlorpyrifosa , Diazinon	Insecticides
Carbamates	Aldicarbe, Carbaryl, Carbofuran, Méthomy	Insecticides
	Asulame, Diallylate, Terbutcarbe, Triallate	Herbicides
	Benthiavalicarbe	Fongicides
Pyréthrinoides	Perméthrine...	Insecticides
Lactones macrocycliques	Abamectine, Doramectine, Iivermectine	Insecticides
Anthranilamides	Chlorantraniliprole, Rynaxypyr...	Insecticides

I.1.3. Composition

Un pesticide est composé de plusieurs substances :

- Une (ou plusieurs) matière active : c'est la matière active qui donne au pesticide un effet toxique. Les propriétés d'un pesticide découlent pour l'essentiel de sa matière active.
- Un diluant : qui est matière liquide (solvant) incorporé à une préparation et destiné à abaisser la concentration en matière active. Ce sont le plus souvent des huiles végétales.
- Surfactant : c'est un agent actif de surface, appelée aussi humecteur, épandeur et collant. Il réduit la tension de la surface, augmente l'émulsion, la diffusion et les propriétés humectantes des formulations liquides pour permettre au pesticide de coller aux parasites ou de s'étendre de manière plus uniforme sur les feuilles et les surfaces de la plante.
- Adjuvant (ou synergiste): qui est un produit chimique ajouté à un pesticide pour en accroître l'efficacité. Il n'est actif qu'en présence de matière active des pesticides. **(Boland *et al.*, 2004).**

I.1.4. Toxicité

Les pesticides présentent un risque potentiel pour la santé humaine et constituent l'origine probable de plusieurs pathologies. En effet, la toxicité d'un pesticide dépend d'un certain nombre de facteurs : la dose et l'activité biologique, la voie d'exposition, le degré d'absorption, l'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme, les effets de la matière active et de ses métabolites ainsi qu'à la sensibilité personnelle (antécédents, patrimoine génétique, etc) **(Tron *et al.*, 2001).**

On distingue deux types de toxicité :

I.1.4.1. Toxicité aiguë ou subaigüe

Elle se manifeste généralement immédiatement ou peu de temps après une exposition ponctuelle ou de courte durée (quelques minutes, heures ou jours) **(Bencheikh, 2010).**

I.1.4.2. Toxicité chronique (À long terme)

L'intoxication chronique survient normalement suite à l'absorption répétée de faibles doses de pesticides, le délai avant l'apparition des symptômes ou d'une maladie peut parfois être long, dans certains cas plusieurs années **(Boland *et al.*, 2004).**

I.1.5. Effet de pesticides sur la santé

Bien que l'utilisation des pesticides ait apporté de nombreux avantages dans les domaines agricoles, sanitaires et industriels. Toutefois, ces substances présentent des effets néfastes sur l'environnement ainsi que sur des espèces non ciblées y compris l'homme. **(Savary C, 2014)**

La population humaine est exposée par différentes voies (inhalation, absorption cutanée, ingestion) à des mélanges de pesticides à faibles doses et pendant une longue durée, via les différentes sources de contamination. Cette exposition semble avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Dans la littérature scientifique, l'exposition à certains pesticides a été liée chez l'homme à des cancers associés à la suppression immunitaire, des réactions allergiques, des réponses auto-immunes, la suppression de la fonction immunitaire et une plus grande sensibilité aux agents pathogènes **(Savary C, 2014)**. Certains pesticides peuvent affecter les fonctions et le développement du système nerveux, chez le fœtus, l'enfant et l'adulte et altérer de ce fait le potentiel des individus exposés in utero **(Multigner, 2005)**.

I.1.5.1. Effets de Pesticides sur le système nerveux

Les pesticides sont des substances toxiques pour les insectes, les animaux, y compris l'homme **(Lauvverys et al., 2007)**. Ils interfèrent principalement les canaux ioniques et les neurotransmetteurs **(Costa, 2006 ; Kanthasamy et al., 2012)**. La plupart des effets chroniques des pesticides vont apparaître à la suite d'expositions d'intensités plus faibles mais répétées et se caractériser par des troubles neuropsychiques et comportementaux ou par des atteintes du système nerveux central à l'origine d'atteintes neurodégénératives.

Plusieurs études suggèrent que l'exposition professionnelle aux pesticides est associée à une diminution progressive des capacités neurocomportementales **(Stephens et al., 1995)** et à l'apparition de troubles neuropsychologiques tels que difficultés de concentration, troubles de la mémoire ou anxiété **(Baldi et al., 2001 ; van Wandel de Jood et al., 2001)**.

Parmi les maladies neurodégénératives, la maladie de Parkinson a fait l'objet du plus grand nombre de travaux en relation avec les pesticides. Ces études ont montré une corrélation entre le risque de développer la maladie de Parkinson et l'utilisation professionnelle des pesticides **(Priyadarshi et al., 2000; Ritz and Yu, 2000; Priyadarshi et al., 2001; Baldi et al., 2003a; Ascherio et al., 2006; Elbaz and Tranchant, 2007)** avec une implication importante des herbicides et des insecticides et en particulier les organochlorés, organophosphorés et carbamates **(Brown et al., 2006; Hancock et al., 2008)**. De plus, la mise en évidence *post mortem* de taux élevés de pesticides dans des structures cérébrales

comme le noyau caudé chez les individus parkinsoniens de Manchester (**Corrigan et al., 2000**) suggère un réel problème d'exposition chronique de ces populations

Bien que la maladie de Parkinson soit associée à un âge avancé, l'hypothèse que la mort progressive des neurones dopaminergiques pourrait être la conséquence d'événements initiés durant le développement intra-utérin a été soulevée (**Thiruchelvam et al., 2002, Ribas-Fito et al., 2003**). Si cela était confirmé, les expositions maternelles périconceptionnelles pourraient alors constituer un risque important de survenue de la maladie.

Les effets neurotoxiques des pesticides peuvent être classés en quatre groupes principaux : (1) ceux qui causent une perte des neurones par apoptose ou nécrose (neuropathies) ; (2) ceux qui entraînent une dégénérescence des axones (axonopathies) ; (3) ceux qui altèrent la structure de la myéline (myélinopathies) ; et (4) ceux qui affectent la neurotransmission, en interférant avec la libération ou la recapture des neurotransmetteurs, ou en agissant comme agoniste/antagoniste de récepteurs. La quasi-totalité des insecticides ciblent le système nerveux central des insectes, en agissant comme agonistes des récepteurs de l'acétylcholine (ACh) de type nicotinique, ou comme inhibiteurs des récepteurs de l'acide -aminobutyrique (GABA), en perturbant la transmission synaptique par une action sur les canaux dépendant du sodium et du voltage, ou encore en bloquant l'action de l'acétylcholinestérase. Ces effets ubiquitaires sont à l'origine de leurs actions sur les récepteurs des mammifères, et expliquent leur nocivité chez l'homme (**Lush et al., 1998**).

I.2. VOLIAM TARGO®

I.2.1. Définition

Le Voliam Targo® (VT) est un nouvel insecticide et acaricide, composé de deux matières actives appartenant à deux familles chimiques différentes: le chlorantraniliprole (45g/l, Anthranilamide) et l'abamectine (18g/l, Avermectine), efficace sur plusieurs ravageurs clés des fruits et légumes.

Le Voliam Targo® est considéré comme étant l'insecticide redoutable contre Tuta Absoluta sur tomate, Carpocapse et acariens sur pommier. La particularité du produit est issue des différents avantages techniques obtenus du mélange de ses deux matières actives ; la synergie de deux matières actives offre une meilleure efficacité ; en plus, le VT a deux sites d'action différents : le chlorantraniliprole agit par activation des récepteurs Ryanodine, tandis que l'abamectine agit par activation des canaux chloridriques (**Valent et al., 2012**).

Le Chlorantraniliprole se fixe aux récepteurs à ryanodine des insectes. Il provoque l'épuisement des réserves de calcium intracellulaire dans les fibres musculaires, et cause la contraction incontrôlée des muscles, la paralysie puis la mort de l'insecte. Le Chlorantraniliprole agit principalement en tant qu'ovicide, ovo-larvicide et larvicide, une efficacité adulticide a également été observée. L'Abamectine agit par contact et ingestion sur les formes mobiles des acariens et sur les insectes piqueurs (Boels *et al.*, 2012).

I.2.2. Abamectine

I.2.2.1. Structure et Classification

L'abamectine, utilisée pour le traitement des arbres fruitiers, légumes et cultures environnementales, appartient à la famille des avermectines. L'abamectine est un mélange d'avermectines B1a : C₄₈ H₇₂ O₁₄ (min 80 %) et d'avermectine B1b : C₄₇ H₇₂ O₁₄ (max 20 %), qui sont des lactones macrocycliques naturelles issues de la fermentation d'un actinomycète du sol (*Streptomyces avermitilis*) (Figure 1). Les deux composants ont les mêmes propriétés biologiques et toxicologiques (Boels *et al.*, 2012). L'abamectine a été largement utilisée dans le monde entier et est toujours l'un des plus courants pesticides utilisés en Algérie (Khaldoun *et al.*, 2015).

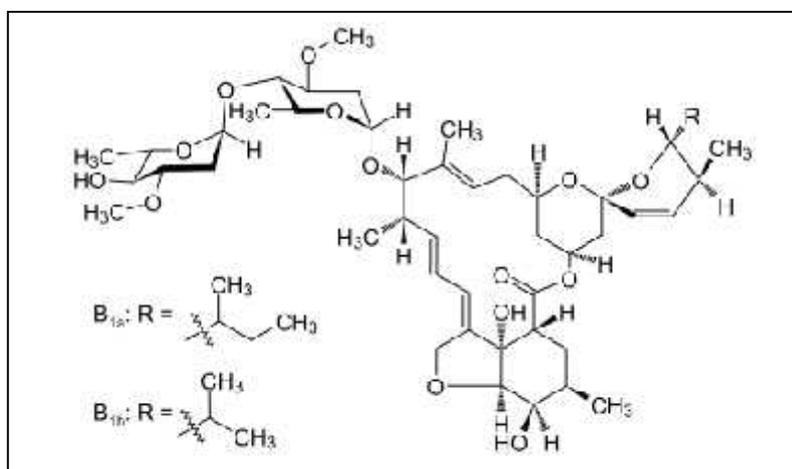


Figure 1 : Structure chimique de l'Abamectine (INRS, 2016).

I.2.2.2. Toxicocinétique

Les données humaines sont pauvres. L'absorption cutanée est probablement faible. L'absorption par inhalation est probablement négligeable compte tenu de la très faible tension de vapeur de la molécule et de la taille des particules dans l'aérosol lors de la pulvérisation (> 15 µm). L'absorption digestive est probablement très faible car l'abamectine serait dégradée

en milieu acide. Les paramètres seraient en fait proches de ceux de l'ivermectine : absorption orale de 20 à 30% de la dose ingérée, fixation aux protéines plasmatiques d'environ 10%, large volume de distribution (5 L/Kg); faible passage de la barrière hémato-méningée, métabolisme hépatique avec excrétion fécale des métabolites, demi-vie d'élimination de 41 heures (Boels et al., 2012).

I.2.2.3. Mode d'action d'abamectine

Les avermectines ont une affinité importante pour les canaux chlorures glutamate-dépendants (GluCl) présents dans les cellules nerveuses et musculaires des invertébrés. Ces composés interagissent de façon stéréospécifique avec ces canaux. Aussi, il a été montré que les avermectines interagissent avec les canaux chlorure GABA dépendants et avec les récepteurs aux benzodiazépines. Ceci provoque un blocage des canaux chlore en position ouverte et donc un flux entrant d'ions chlore au sein des cellules nerveuses du parasite. Une hyperpolarisation des cellules nerveuses est alors induite empêchant alors la transmission des influx nerveux normaux. Les parasites sont alors paralysés puis meurent (Camargo, 2005) (Figure 2).

Chez les vertébrés, l'acide gamma amino butyrique (GABA) ainsi que la glycine sont connus pour bloquer l'activité électrique des cellules nerveuses et musculaires en augmentant la conductance des ions chlorure (Arena et al., 1995). L'acide gamma-aminobutyrique est un neurotransmetteur présent dans tout l'organisme des invertébrés, mais aussi dans le système nerveux central des vertèbres. L'interférence entre les avermectines et ces canaux contribue donc à la paralysie du parasite mais elle est également à l'origine des effets secondaires et de la toxicité chez l'hôte, par interférence sur la transmission nerveuse (Omura, 2008).

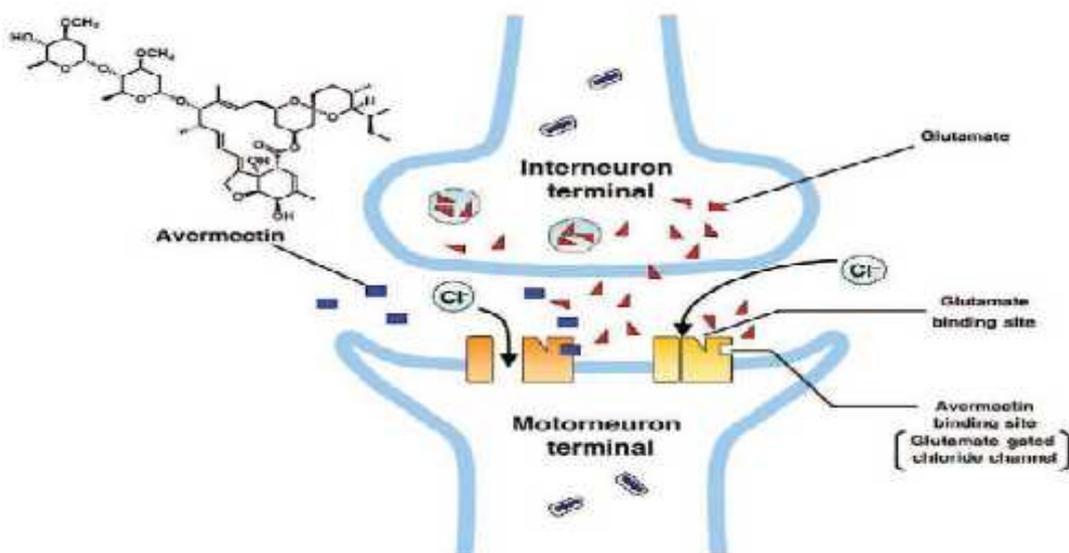


Figure 2 : Mécanisme d'action des avermectines (Omura, 2008).

I.2.2.4. Toxicité d'abamectine

L'abamectine est un produit hautement toxique pour les insectes et peut aussi être toxique pour les mammifères. Les préparations concentrées émulsifiables peuvent causer une irritation légère à modérée des yeux et une légère irritation de la peau. Les symptômes d'intoxication observés chez les animaux de laboratoire comprennent la dilatation des pupilles, les vomissements, les convulsions et / ou les tremblements et le coma. L'abamectine agit sur les insectes en interférant avec la transmission neuronale et neuromusculaire. Il agit sur un type spécifique de synapse situé uniquement dans le cerveau et est protégé par la barrière hémato-encéphalique. Cependant, à des doses très élevées, la barrière hémato-encéphalique mammalienne peut être pénétrée, entraînant des symptômes de dépression du SNC (Boels et al., 2012).

De nombreux effets indésirables ont été notés suite à l'utilisation des avermectines chez les animaux. Le chien, une toxicité peut survenir lors de l'administration prolongée d'ivermectine par voie orale (Mueller et Bettenay, 1999). Divers signes cliniques de toxicité par les avermectines ont été observés chez le chien : nerveux (55.7%), digestifs (18.5%), et sensoriels (16.5%) (Grzegolec, 2008).

L'intoxication par l'abamectine peut altérer la fonction hépatique (Hsu et al., 2001 ; El-Shenawy, et al., 2010 ; Eissa et al., 2010 ; Khaldoun et al., 2013), la fonction rénale (Nasr et al., 2006 ; Abd-Elhady et al., 2013 ; Khaldoun et al., 2015 ; Fahim et al., 2016). Castanha Zanoli et al., (2012) ont montré que l'abamectine perturbe la bioénergétique mitochondriale. De plus, il a été reporté que l'abamectine a un effet neurotoxique chez les souris et les rats (Sun et al., 2010 ; Nasr et al., 2016).

Chez les mammifères, deux mécanismes concourent à la faible toxicité des avermectines. Tout d'abord, les cibles de ces molécules chez les mammifères sont les canaux chlores GABA-dépendants, canaux moins sensibles aux avermectines que les canaux chlore-dépendant du glutamate (Wolstenholme et Rogers, 2005).

De plus, les récepteurs au GABA ne sont localisés que dans le SNC des mammifères, qui lui-même est protégé par la glycoprotéine P située sur la barrière hémato-encéphalique. Les glycoprotéines P ont pour rôle l'excrétion active de leur substrat à l'extérieur de la cellule, ce qui réduit l'exposition aux xénobiotiques. De nombreuses molécules sont des substrats des glycoprotéines P : **avermectines**, loperamide, vincristine, morphine, digoxine, verapamil etc (Van Tellingen, 2001).

I.2.3. Chlorantraniliprole

I.2.3.1. Structure et Classification

Le chlorantraniliprole est un nouvel insecticide anthranilique diamide (**Figure 3**), efficace pour lutter contre les insectes nuisibles lépidoptères, ainsi que certaines espèces dans les ordres Coleoptera, Diptera et Hemiptera (**Hanning et al., 2009**). Il possède un nouveau mode d'action, une activité biologique élevée, une très faible toxicité pour les mammifères et une sélectivité pour les arthropodes non ciblés (**Bassi et al., 2009**). En activant les récepteurs de la ryanodine des insectes, il stimule la libération et l'épuisement des réserves de calcium intracellulaires du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires, causant une altération de la régulation musculaire, de la paralysie et finalement de la mort des espèces sensibles (**Cordova et al., 2006**).

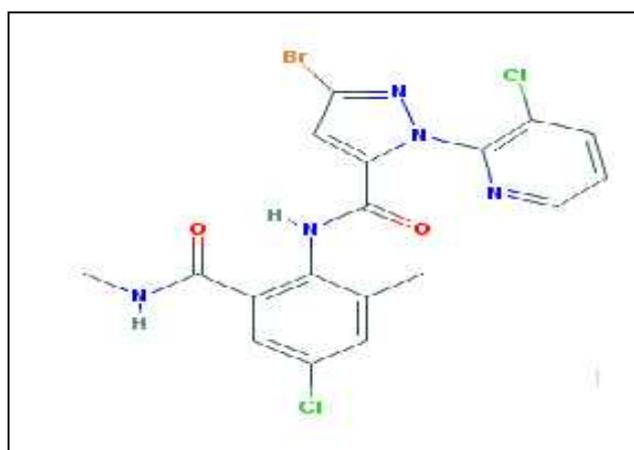


Figure 3 : Structure chimique de chlorantraniliprole (**PubChem, 2018**).

I.2.3.2. Mode d'action de Chlorantraniliprole

Le chlorantraniliprole est un un nouvel insecticide anthranilamide substitué. Il cible les récepteurs de la ryanodine (RyR), qui régulent le flux de calcium pour contrôler la contraction musculaire. Les diamides anthraniliques se lient aux RyR, ce qui les maintient ouverts, et stimule la libération de calcium à partir des réserves internes de muscle lisse et strié, causant une altération de la régulation des muscles, de la paralysie et finalement de la mort des insectes (**Hanning et al., 2009**) (**Figure 4**). La principale voie d'exposition est l'ingestion (**Lahm et al., 2007; Yu, 2015**).

Le chlorantraniliprole (Acelepryn®, Syngenta, Greensboro, Caroline du Nord, États-Unis) est le premier diamide anthranilique homologué pour être utilisé sur les plantes ornementales de gazon et de paysage (**Redmond et Potter, 2017**). Le chlorantraniliprole présente une excellente sélectivité différentielle vis-à-vis des récepteurs de la ryanodine des

insectes par rapport aux récepteurs mammaliens. Le chlorantraniliprole est essentiellement non toxique pour les mammifères, les oiseaux et les poissons parce que les RyR des vertébrés sont 400 à 3000 fois moins sensibles que les RyR des insectes sensibles (**Cordova et al., 2006; Wang et al., 2012**).

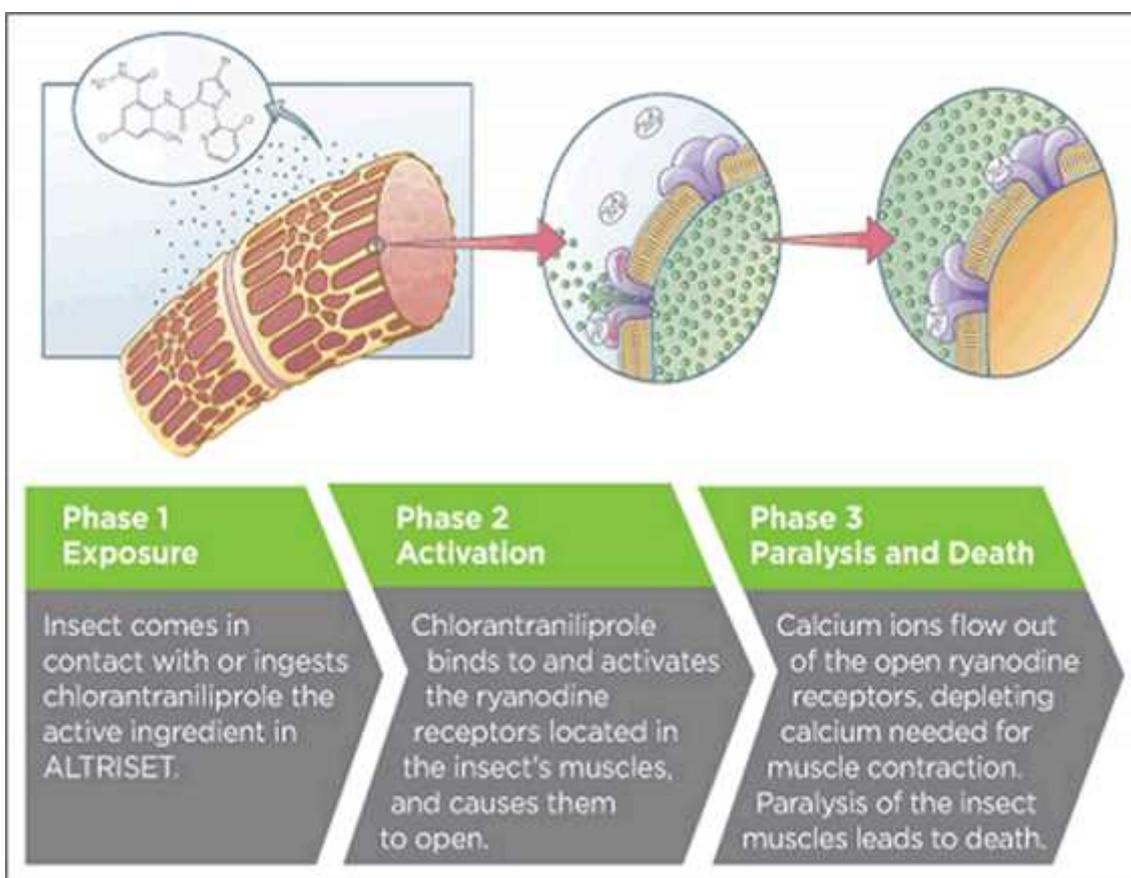


Figure 4 : Mode d'action de Chlorantraniliprole (**Bentley et al., 2010**).

I.2.3.3. Toxicité du Chlorantraniliprole

Le chlorantraniliprole possède une faible toxicité aiguë quelle que soit la voie d'exposition. Il est peu ou pas irritant pour la peau et les yeux et il n'est pas un sensibilisant cutané. Chez les animaux exposés à des doses répétées de chlorantraniliprole, les effets sur la santé visaient notamment le foie et la glande surrénale (**Bentley et al., 2010**). Il s'agissait principalement d'effets de nature adaptative ou observés à la dose limite des essais ou à une valeur proche de celle-ci. Aucun signe de cancérogénicité, de toxicité pour la reproduction, de neurotoxicité ou d'immunotoxicité n'a été constaté chez la souris et le rat, à des doses s'approchant de la dose limite de 1 000 mg/kg p.c./j ou la dépassant. Lorsque le chlorantraniliprole a été administré à des animaux gravides, rien n'indiquait qu'il nuisait au fœtus en développement (**Pmra, 2014**).

I.3. Système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est la partie du système nerveux comprenant l'encéphale et la moelle épinière. Certaines classifications incluent également la rétine et les nerfs crâniens I et II. Le SNC est protégée par la boîte crânienne pour l'encéphale et par la colonne vertébrale pour la moelle épinière. Avec le système nerveux périphérique (SNP), il a un rôle fondamental dans l'intégration des informations reçues et la coordination de l'activité de l'organisme (Neuwelt et al., 2011).

I.3.1. Cerveau

Depuis la découverte du cerveau des mammifères, il a été montré que la neurogenèse 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).

I.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. Sa capacité à moduler sa morphologie en réponse à des modifications environnementales lui permet de jouer un rôle crucial dans le processus de mémorisation et d'apprentissage. (Amaral et Witter, 1989).

I.3.1.1.1. Organisation anatomique

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) ((Pallud, 2005) (Figure 5).

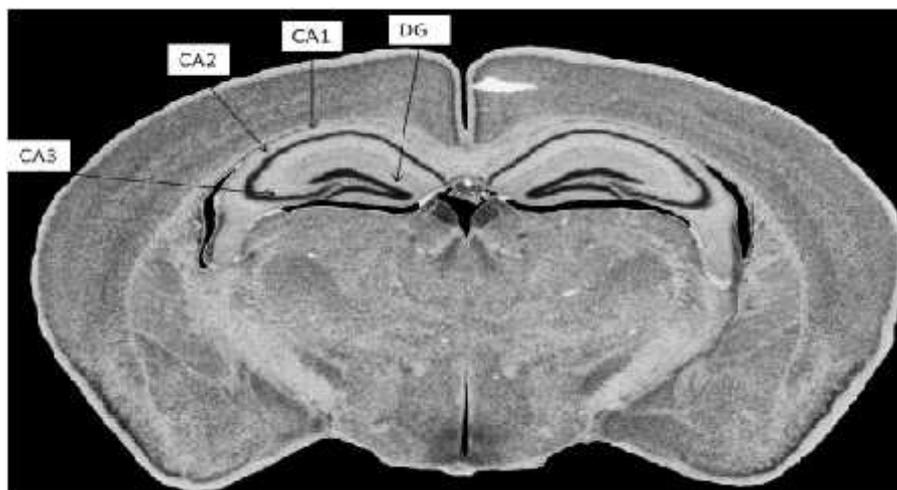


Figure 5 : Coupe transversale de l'hippocampe (Rosen et al., 2000).

CA1 ;CA2 ;CA3 : subdivisions histologique 1,2 et 3 de la corne d'Ammon (CA) ; DG :Gyrus Denté

I.3.1.1.2. Organisation cellulaire

- **Gyrus dentelé (GD) :**

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 GD sont les cellules granulaires, qui forment la couche cellulaire du même nom. La couche granulaire est facilement identifiable grâce à sa forme caractéristique en V ou en U. (Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998).

- **Cellules granulaires du gyrus dentelé :**

Les cellules principales du gyrus dentelé se nomment donc cellules granulaires, et c'est l'empilement de leurs corps cellulaires (de 4 à 8 corps cellulaires) en une strate compacte qui forme la couche du même nom. Ils sont 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. (Amaral et Witter, 1989; Freund et Buzsáki, 1996; Johnston et Amaral, 1998).

- **Autres cellules du gyrus dentelé :**

Alors que la couche granulaire est principalement formée des cellules granulaires et que la couche moléculaire est essentiellement acellulaire, la couche polymorphique possède, pour sa part, plusieurs types de cellules. Parmi celles-ci, on peut citer les cellules moussues, qui reçoivent des contacts des fibres moussues, et les cellules polymorphiques, qui sont, comme leur nom l'indique, de plusieurs types mais qui ont pour point commun leur projection vers d'autres régions du gyrus dentelé (Amaral et Witter, 1989; Johnston et Amaral, 1998).

- **La corne d'Ammon (CA) :**

La corne d'Ammon est divisée en deux régions : CA3 ou la région adjacente au gyrus dentelé et CA1 ou la région juxtaposée au subiculum. Le CA3 peut à son tour être subdivisé en 3 sous régions : le CA3a étant le segment adjacent à la région CA2, le CA3c étant la portion voisine de la région du hile et le CA3b étant la section comprise entre CA3a et CA3c. La corne d'Ammon possède cependant 7 strates distinctes (Lopes da Silva *et al.*, 1990) :

(1) **La couche moléculaire**, qui est directement adjacente à la fissure hippocampique et qui contient surtout des fibres et des terminaisons dendritiques.

(2) **La couche lacunosum**, qui est principalement constituée de faisceaux de fibres parallèles provenant des collatérales des cellules pyramidales ou de fibres extrinsèques à l'hippocampe.

Les couches *moleculare* et *lacunosum* sont fréquemment combinées ensemble en une seule et même couche portant le nom de *lacunosum-moleculare* ou L/M.

(3) **La couche *radiatum***, qui possède relativement peu de corps cellulaires mais de nombreux systèmes de fibres.

(4) **La couche *pyramidale***, qui contient les corps cellulaires des cellules pyramidales, regroupés en une rangée compacte de 3 à 6 cellules de large.

(5) **La couche *oriens*** qui regroupe les dendrites basales des cellules pyramidales, les corps cellulaires de plusieurs types de cellules, ainsi que d'autres collatérales des cellules de CA3.

(6) **La couche *alveus*** qui regroupe les axones des cellules pyramidales et quelques corps cellulaires qui semblent avoir été déplacés de la couche *oriens*. Les couches *alveus* et *oriens* sont souvent regroupées en une seule et même couche portant le nom de *oriensalveus* ou O/A.

(7) **La couche épithéliale** qui délimite l'hippocampe et la surface du ventricule.

Au niveau du CA3, une autre couche appelée couche *lucidum* a également été décrite. Elle regroupe les axones des cellules granulaires du gyrus dentelé (**Figure 6**) (**Johnston et Amaral, 1998**).

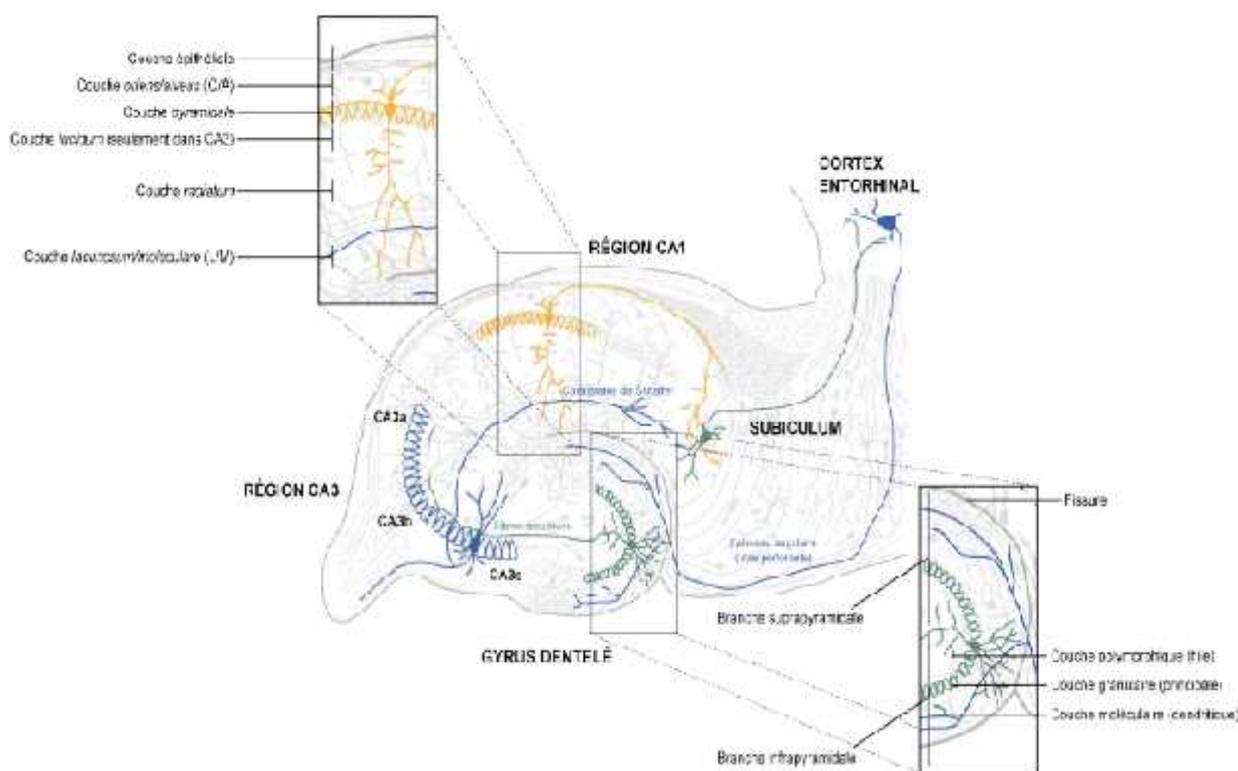


Figure 6 : L'organisation cellulaire du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon (Adapté de Ramón y Cajal, 1911).

I.3.2. Cervelet

Le cervelet est une structure nerveuse appartenant à l'encéphale. Il occupe la majeure partie de la fosse cérébrale postérieure en se plaçant en arrière du tronc cérébrale auquel il est rattaché de manière symétrique par les pédoncules cérébelleux. Le cervelet est donc une

structure située en dérivation du tronc cérébral. Cet emplacement stratégique explique ses modalités d'action sur les grandes voies nerveuses ascendantes et descendantes (Vuillier *et al* ,2011).

3.2.1. Organisation anatomique

Le cervelet est classiquement décrit comme constitué de trois parties : le vermis, impair et médian, entouré de part et d'autre par deux hémisphères pairs et symétriques. À sa surface, le cervelet est parcouru par de nombreuses fissures et sillons transversaux, plus ou moins profonds et concentriques, qui contribuent à délimiter les lobules et les lobes (Figure 7).

La face supérieure du cervelet est séparée des hémisphères cérébraux par une structure dure-mérienne, la tente du cervelet. Sa face inférieure repose dans les fosses cérébelleuses de l'os occipital. Sa face antérieure est appliquée contre la face dorsale du tronc cérébral constituant le toit du quatrième ventricule. Elle comporte les trois paires de pédoncules cérébelleux, supérieurs, moyens et inférieurs, qui laissent passer des faisceaux afférents et efférents unissant le cervelet aux autres parties du système nerveux central (Figure 8).

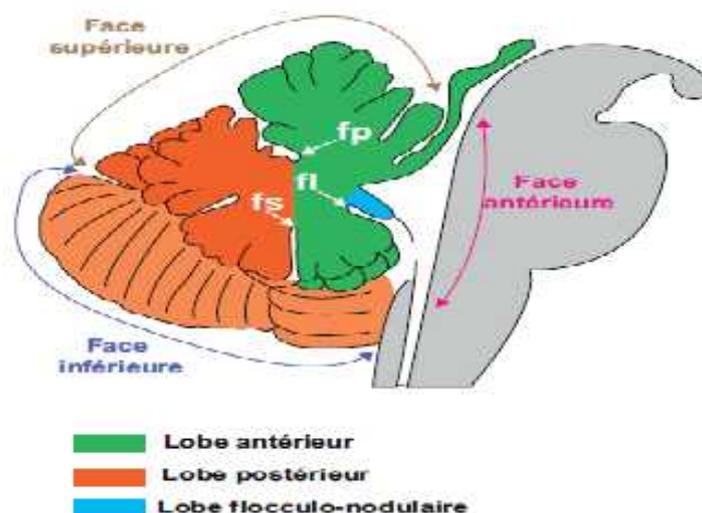


Figure 7 : Coupe sagittale médiane du tronc cérébral et du cervelet (Vuillier *et al* ,2011).

(pf: primary fissure, sf: secondary fissure, plf: postero-lateral fissure)

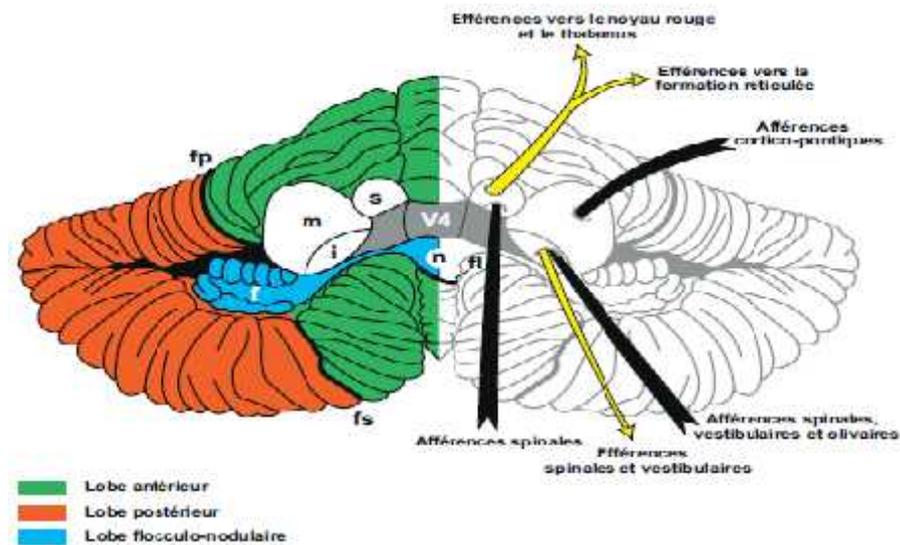


Figure 8 : Vue ventrale du cervelet après ablation du tronc cérébral (Vuillier *et al* ,2011).

(n : nodule, f : floccule, fp : fissure primaire, fs : fissure secondaire, fl : fissure postérolatérale, V4 : quatrième ventricule, s : pédoncule cérébelleux supérieur, m : pédoncule cérébelleux moyen, i : pédoncule cérébelleux inférieur).

3.2.2. Organisation cellulaire

Le cortex cérébelleux comporte trois couches de neurones ce sont de surface à la profondeur (**Figure 9**) :

- **La couche moléculaire**, qui est pauvre en cellules nerveuses et comporte deux types de cellules étoilées ; les petites cellules étoilées superficielles sont situées dans le tiers externe de la couche moléculaire ; les cellules étoilées profondes (cellules en panier) occupent les deux tiers internes de la couche moléculaire ; les axones des cellules en panier émettent des branches collatérales qui entourent le corps cellulaire des cellules de Purkinje ; la couche moléculaire renferme l'arborisation des dendrites des cellules de Purkinje sous-jacentes.
- **La couche des cellules de Purkinje**, qui comporte des neurones multipolaires caractéristiques du cervelet. Les cellules de Purkinje ont un corps cellulaire volumineux, d'aspect piriforme, et les dendrites issues de l'apex du corps cellulaire sont richement arborisées dans la couche moléculaire ; l'axone prend naissance à la base du corps cellulaire et traverse la couche des gains sous-jacente pour gagner les noyaux cérébelleux profonds ; les axones des cellules de Purkinje représentent les seules fibres efférentes du cortex cérébelleux ; cette couche reçoit les fibres grimpantes (axones provenant des neurones de l'olive bulbaire).
- **La couche granulaire**, qui comporte les gains de cervelet, cellules de petite taille dont on ne voit pratiquement que le noyau très coloré ; l'axone des gains monte dans la

couche moléculaire ou il se divise en « T », constituant les fibres parallèles qui entrent en contact avec les dendrites des cellules de Purkinje ; cette couche contient également des cellules de Golgi de type II, plus volumineuse et moins nombreuses ; cette couche reçoit des fibres moussues venant du pont et de la moelle épinière. (Gérard *et al.*, 2016)

Le cervelet contient également une très importante quantité de cellules gliales, celles-ci se trouvant aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche.

Tous les types de cellules gliales y sont représentés (les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales) (Sotelo, 1967).

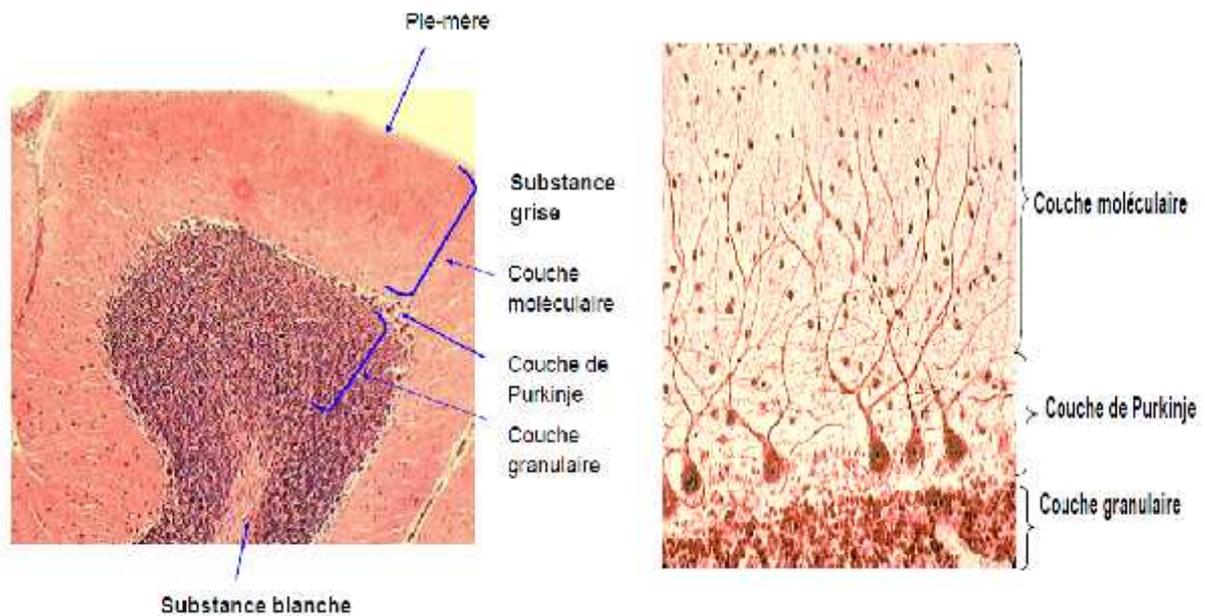


Figure 9 : les couches cellulaires du cortex cérébelleux (Gérard *et al.*, 2016)

II. Matériel et méthodes

Notre expérimentation a été réalisée 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 pour l'étude toxicologique.
- Laboratoire d'anatomie pathologie CHU Parnet, d'Alger, où nous avons réalisé l'étude histologique et immunohistochimique.

II.1. Matériel

II .1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Modèle animal

Le modèle animal choisi dans la présente étude est le lapin d'une souche locale « *Oryctolagus cuniculus* » provenant de l'animalerie de Djebba wilaya de Tizi Ouzou. Les différentes espèces de lapin sont des modèles expérimentaux très utiles dans diverses sphères de recherche biomédicale (embryologie, toxicologie, virologie, ect) et ils sont fréquemment utilisés dans des tests de toxicité (**Dewree et Drion, 2006**).

Notre étude a été réalisée sur 20 lapins males, âgés de 3 à 4 mois et ayant un poids moyen de 2kg500 à 3kg. Durant la période d'expérimentation, ces animaux reçoivent chaque jour une alimentation standard et équilibré et de l'eau *ad libitum*. L'administration de l'insecticide (Voliam Targo) est faite par voie orale, à l'aide d'une sonde de gavage.

➤ Taxonomie du Lapin

La position taxonomique du lapin (*Oryctolagus cuniculus*) est la suivante (**Grasse.,1949 ; Lebas et al., 1984**) :

- Règne : Animalia
- Embranchement : Mammifères
- Classe : Mammifères
- Super Ordre : Glires
- Ordre : Lagomorphes
- Famille : Léporides (lièvre et lapin)
- Sous-famille : Leporinae

- **Genre** : *Oryctolagus*

- **Espèce** : *Oryctolagus cuniculus*

II.1.1.2. Anticorps

Une étude immunohistochimique indirecte est réalisée dans le but d'évaluer le statut inflammatoire et apoptotique des cellules de tissu d'intérêt (cervelet et hippocampe). Les anticorps utilisés sont :

- AC anti-CD45, pour la détection de CD45 (ACL) (antigène commun leucocytaire) qui est une protéine tyrosine phosphatase liée au récepteur exprimé sur tous les leucocytes et qui joue un rôle crucial dans la fonction de ces cellules.
- Anticorps monoclonal anti-BCL2 (Monoclonal Mouse Anti-Human Bcl2 oncoprotein clon 124), pour la détection des cellules contenant l'antigène Bcl2 qui est une protéine membranaire mitochondrial qui bloque la mort cellulaire (anti-apoptotique) de certaines cellules.

II.1.2. Matériel non biologique :

La molécule testée (Voliam Targo) dans la présente étude est une formulation d'un insecticide composé de deux matières actives : le chlorantraniliprole et l'abamectine, commercialisé par SYNGENTA.

Le matériel non biologique constitué de verrerie de laboratoire, d'appareillages, des réactifs chimiques et de différents colorants organiques est représenté dans l'Annexe 1.

II.2. Méthodes :

➤ **Traitement des animaux**

Notre étude a été entreprise afin d'examiner les effets d'un traitement subaiguë avec trois doses de Voliam Targo®, chez des lapins mâles d'une souche locale. La dose létal 50 (DL50) de Voliam Targo® par voie orale est de 500 mg/kg (**Valent et al., 2012**). L'ensemble des animaux (20 lapins) sont répartis en 04 lots de 5 lapins chacun:

- **lot 1:** Lot témoin recevant 1 ml/lapin/jour de l'eau distillée par gavage.
- **lot 2 :** Lot traité recevait pendant 21 jours par gavage 5 mg/kg/jour de Voliam Targo (1/100 DL50).

- **Lot 3** : Lot traité recevait pendant 21 jours par gavage 10 mg/kg/jour de Voliam Targo (1/50 de la DL50).
- **Lot 4** : Lot traité recevait pendant 21 jours par gavage 25 mg/kg/jour de Voliam Targo (1/20 de la DL50).

II.2.1. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

Les animaux ont été maintenus à jeun 24 heures avant le sacrifice, ce dernier est effectué au 22^{ème} jour de l'expérimentation. Les organes sont prélevés soigneusement, ils sont ensuite imprégnés dans du formol à 10% afin de bien les conserver avant l'étude histologique (**Figure 10**).



Figure 10 : Photographie originale représentant l'étape de la dissection.

II.2.2. Etude histologique

La technique d'anatomopathologie utilisée au laboratoire est adaptée de l'ouvrage de **René Hould (1984)** intitulé : Technique d'histopathologie et de cytopathologie.

❖ Fixation des échantillons et rinçage

La fixation vise à maintenir les cellules et le tissu dans un état assez proche que possible de l'état vivant en s'opposant au processus d'autolyse qui est due à la libération d'enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires (**Djoudad-Kadji et al., 2011**).

Après les prélèvements, le cerveau et cervelet, sont fixés dans le formol à 10%, communément utilisé comme fixateur standard, pendant 48h. Les échantillons sont ensuite mis dans des cassettes en plastique (**Annexe 01**) sur lesquels est inscrit le numéro du lapin et la dose du traitement.

Les coupes histologiques ont été faites au CHU Nefissa Hammoud, au laboratoire d'anatomie-cytologie-pathologie. Le protocole de la technique suit les étapes suivantes :

❖ Déshydratation et éclaircissement

Les organes fixés doivent être imprégnés par la paraffine. Comme la paraffine n'est pas miscible dans l'eau, la déshydratation a pour but de substituer l'eau contenue dans les cellules par de l'alcool. Les organes fixés sont déshydratés progressivement par un passage dans des solutions alcooliques à degrés croissant. L'alcool est alors remplacé par un solvant organique, miscible à la fois dans l'alcool et dans la paraffine fondue, il s'agit du xylène.

La déshydratation se fait grâce à un automate de déshydratation (**Figure 11**) 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 11 : Automate de déshydratation (Originale)

❖ Imprégnation :

Dans une étuve réglée à 58°C, les organes sont imprégnés dans deux bains successifs de paraffine durant 1h30 chacun afin d'éliminer le xylène.

❖ Inclusion des échantillons (enrobage)

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières (**Figure 12**). Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. 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

- Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel le fragment prélevé est inclus.



Figure 12 : L'étape d'enrobage

❖ Confection des coupes histologiques

Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome avec une épaisseur de 3 (**Figure 13**). L'ensemble des tranches vont former un ruban dans lequel on retrouve des coupes sériées de prélèvement tissulaire, elles sont étalées dans un bain marie à 37°C, puis dépliées. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre qui seront ensuite incubées dans une étuve à 60°C afin d'initier le processus de déparaffinage avant la coloration.

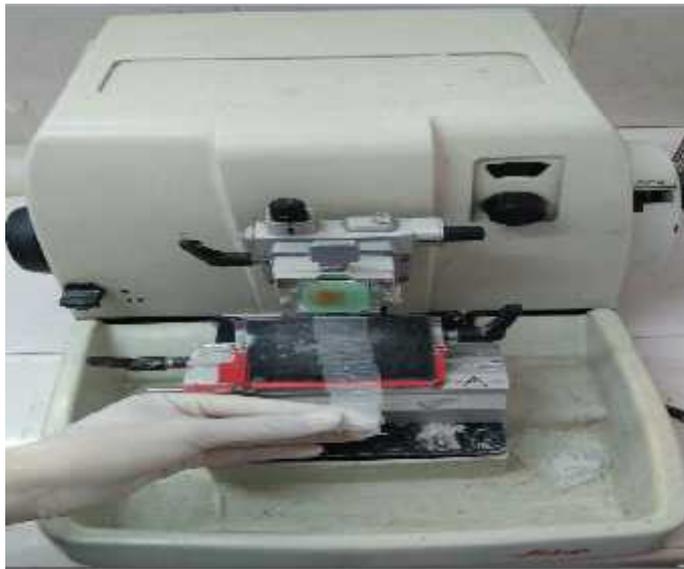


Figure 13 : Microtome

❖ Déparaffinage et réhydratation des coupes

Cette étape sert à retirer la paraffine du tissu et la remplacer par l'eau pour permettre la pénétration des colorants. Les coupes sont passées dans un bain de xylène pendant 30

minutes. Cependant, la réhydratation a pour but de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau. Les organes sont imprégnés dans un bain d'alcool 100° pendant 10 minutes.

❖ Coloration à l'hématoxyline éosine (HE)

La coloration HE est la coloration usuelle adoptée en anatomie pathologique. Elle permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau bleu et cytoplasme rose violacé) afin de déterminer leur répartition, architecture et structure. La coloration HE passe par les étapes suivantes :

- 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 14**)

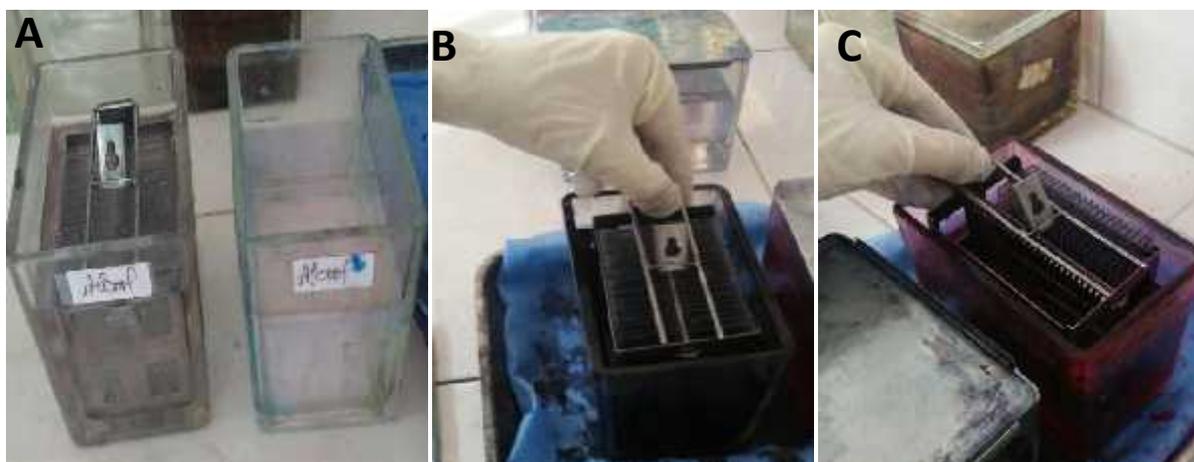


Figure 14 : Coloration HE

❖ Montage et observation

Après la coloration, les lames sont mises dans un bain d'éthanol suivi d'un bain contenant un mélange d'éthanol/xylène puis dans deux bains successifs de xylène (**Figure 15A**). Une lamelle est fixée sur chaque lame par Eukitt (**Figure 15B**). Ensuite, les lames sont nettoyées au xylène puis séchées et observées au microscope photonique optique de type Leica aux grossissements (Gx4, Gx10, Gx40) muni d'une caméra Leica MC170HD. Les images obtenues par cette caméra ont été transférées sur l'écran d'ordinateur à l'aide du logiciel Leica Application EZ (LASEZ) et ont été par la suite analysées et discutées afin d'en tirer les conclusions de notre étude (**Figure 15C**).

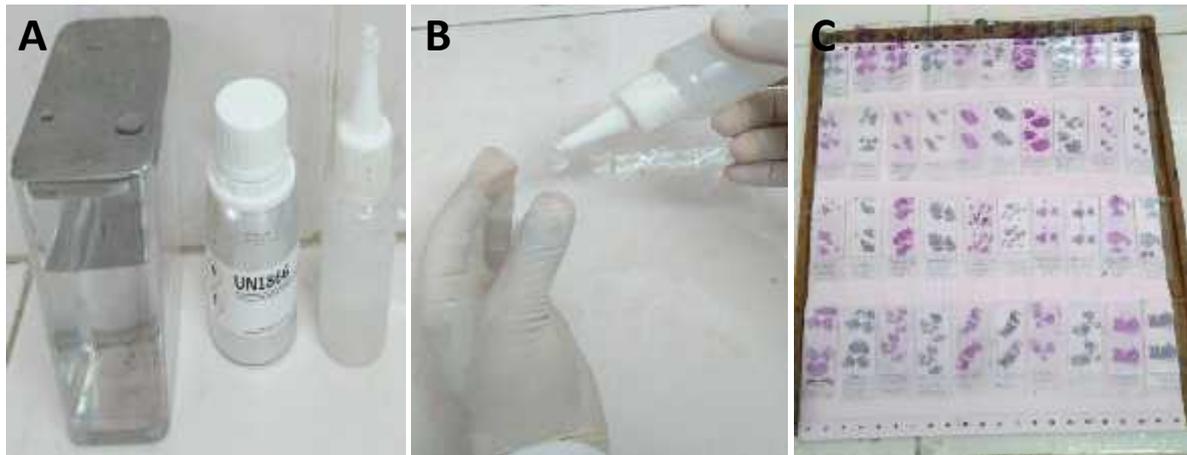


Figure 15 : L'étape de montage. A. Les produit utilisés lors du montage des lames; B. L'application de l'Eukit sur une lamelle; C. Les lames prêtes pour l'observation microscopique.

Lecture :



Figure 16 : Observation microscopique des lames

II.2.3. Etude Immunohistochimique

Etude immunohistochimique permet la révélation de protéines spécifiques et de leur localisation cellulaire dans une coupe de tissu préalablement fixée en formol et incluse en paraffine. La méthode consiste à mettre en évidence un antigène grâce à la fixation d'un anticorps primaire puis celle d'un anticorps secondaire couplé à un polymère inerte qui porte des enzymes. Ce complexe est ensuite mis en évidence avec un révélateur dont l'hydrolyse produit un précipité de couleur marron.

Les structures ayant fixé l'anticorps primaire sont donc facilement repérables avec cette coloration. Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée, teintant les noyaux et les cytoplasmes en bleu. Toutes les structures apparaissent et le repérage microscopique des

zones intéressantes est facilité (**Bahrami et al., 2008**). Cette technique se déroule selon le protocole suivant:

➤ **Déparaffinage**

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

Tableau II : Etape de déparaffinage

	Solution	Durée
1	Xylène	10 min
2	Xylène	10 min
3	Alcool 100	10 min
4	Alcool 100	10 min
5	Alcool 90	5 min
6	Alcool 70	5 min
7	Alcool 50	1 min
8	Eau distillée	5 min

➤ **Démasquage thermique**

Les lames sont placées dans un portoir qui est transféré dans un bac de solution de démasquage préchauffée (Préparation de la TBS : 50 ml (pH6) + 950 ml d'eau distillée (Bcl 2 et CD45 dans un milieu acide « pH 6 ») ; Puis, les bacs sont mis dans un bain marie à 95- 97° C pendant 50 min (**Figure 17A**).

L'intérêt de cette étape est de rompre les liaisons moléculaires créées par le fixateur et donc de restaurer les déterminants antigéniques qui ont été masqués par la fixation au formol.

- Retirer ensuite du bain marie et laisser refroidir dans la même solution pendant 20 min.
- Rincer les lames au TBS pendant 1min. Le but étant d'éliminer toute trace de la solution de démasquage (**Figure 17B**).
- Essuyer les lames et encercler les coupes histologiques par Dako pen (**Figure17C**) (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.

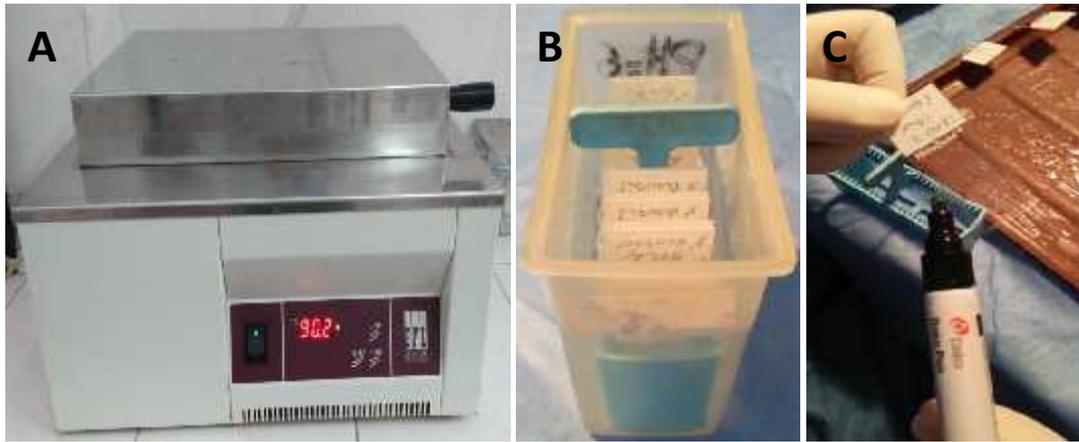


Figure 17 : Etape de démasquage thermique

➤ **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 (**Figure 18A**). Egoutter les lames verticalement.

➤ **Marquage à Ac primaire**

Quelques gouttes d'Ac primaire (Bcl2, CD45) sont versées sur les coupes séparément (**Figure 18B**), on laisse incuber jusqu'à 1 heure et les lames doivent être recouvertes. Suivi par rinçage dans 2 bains de TBS (5 min chacun).

➤ **Révélation par le système HRP**

Quelques gouttes d'Ac secondaire sont ajoutées (**Figure 18C**), 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).

➤ **Application de polymère**

Quelques gouttes de polymère sont ajoutées pendant 30 min (**Figure 18D**) puis un rinçage au TBS a été réalisé (5min× 2).

➤ **Application du chromogène DAB**

Appliquer suffisamment en solution de la préparation suivante (50 ul de diluant dans 1 ml de DAB) (**Figure 18E**) puis recouvrir les éléments histologiques, laisser incuber 10 min et puis rinçage au TBS (5min× 3).

➤ **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 (de façon moins intense) 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 (**Figure 18F-G**).

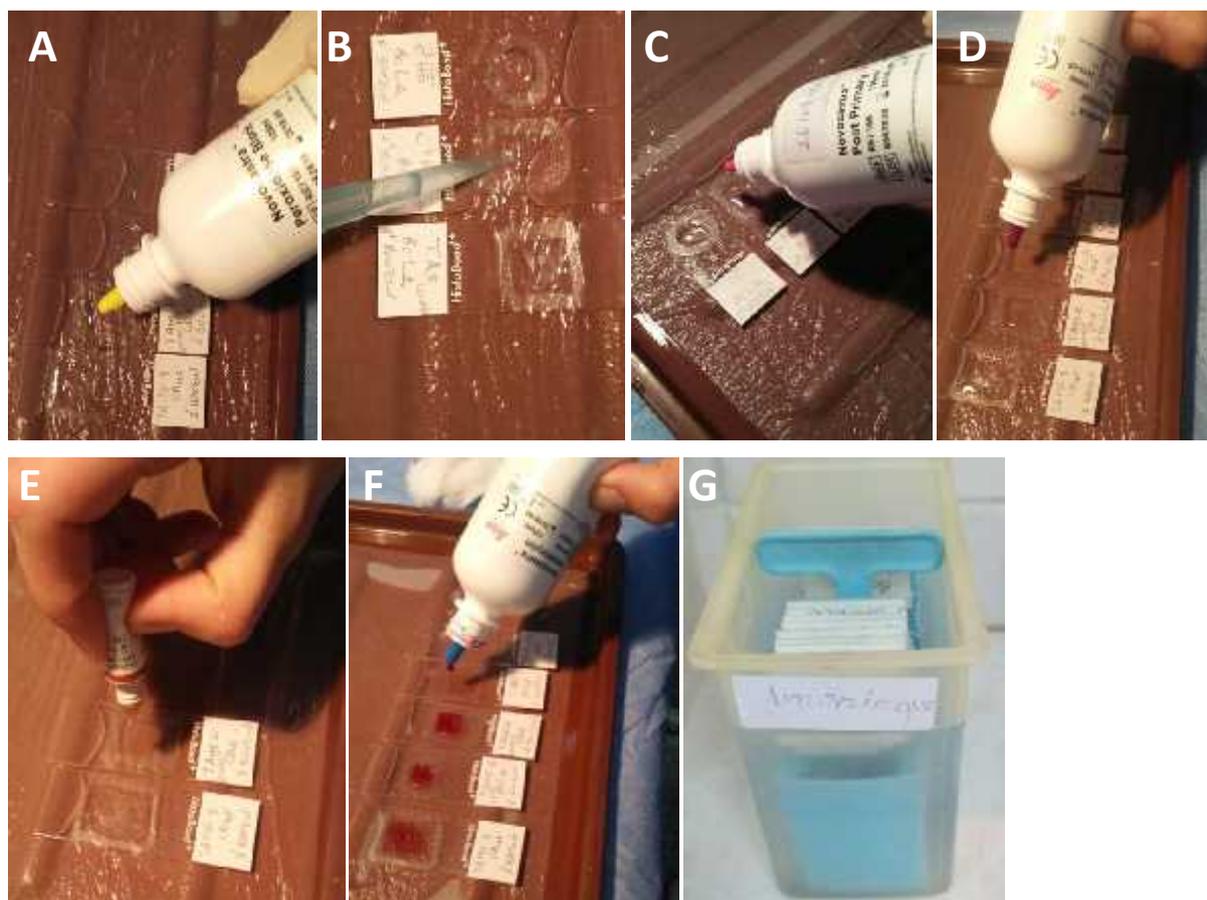


Figure 18 : Etapes de l'immunohistochimie

➤ **Déshydratation et montage**

Les lames sont plongées dans une batterie de 06 bacs (**Tableau III**), Puis on procède au montage lame-lamelle (**Figure 19A**)

Tableau III: étape de déshydratation

	Solution	Durée
1	Alcool 70	3 min
2	Alcool 90	3 min
3	Alcool 100	3 min

4	Alcool 100	1 min
5	Xylène	3 min
6	Xylène	3 min

- L'ensemble lame et lamelles a été par la suite séché à l'air libre (**Figure 19B**) et sont prêtes pour l'observation microscopique à l'aide d'un microscope photonique aux grossissements : $G \times 40$ et les photos sont prises à l'aide d'un appareil photos numérique.

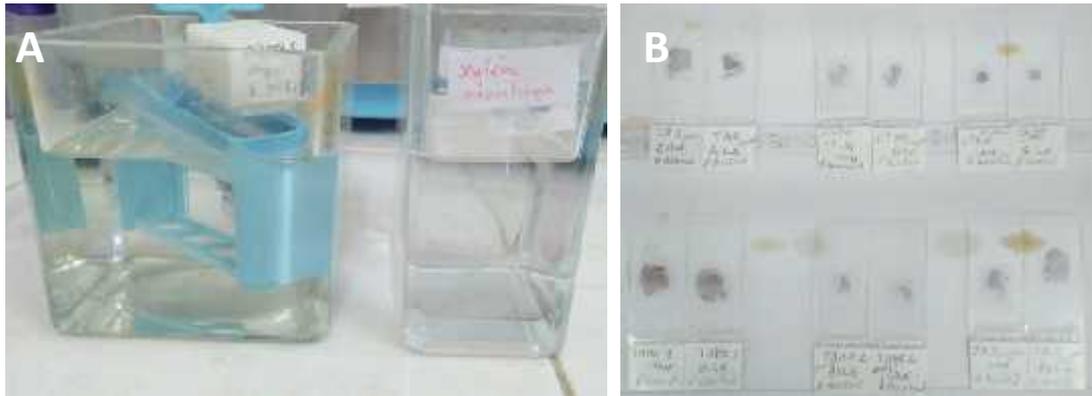


Figure 19 : Lames prêtes à l'observation

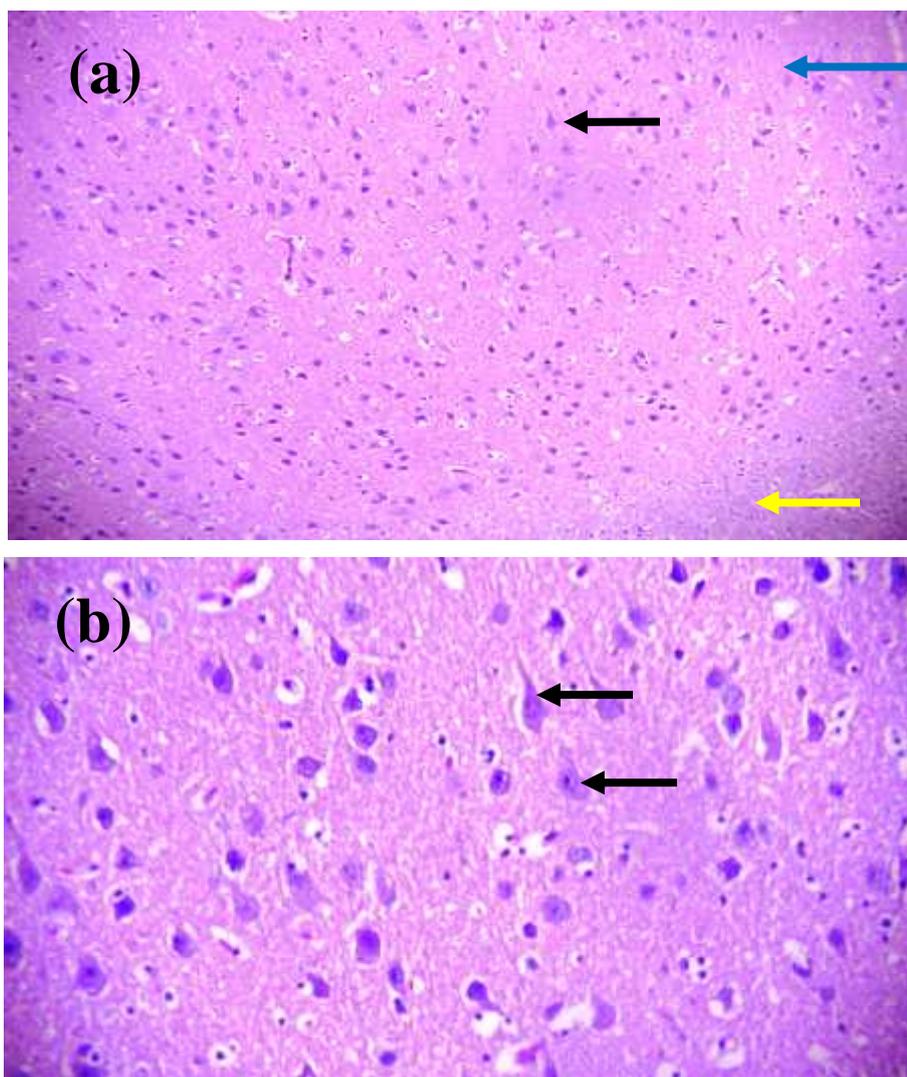
III.1. Résultats et discussion de l'étude histologique

Les coupes histologiques de l'hippocampe et de cervelet colorées à l'hématoxyline éosine (H&E) des animaux du groupe témoin et ceux des groupes traités au pesticide « Voliam Targo® » ont été observées dans le but de mettre en évidence des éventuelles altérations tissulaires provoquées par ce xénobiotique.

III.1.1. Histopathologie de l'hippocampe

➤ Chez les lapins Témoins et Traités 1 (VT à faible dose)

L'analyse microscopique des coupes histologiques de l'hippocampe des lapins témoins et ceux traités par la faible dose de VT montre une architecture normale classique du tissu de l'hippocampe sans lésion visible. Il y'a une répartition cellulaire homogène. Les cellules nerveuses de l'hippocampe sont normales et intactes en termes de morphologie, d'arrangement et de distribution cellulaires (**Figure 20 et 21**).



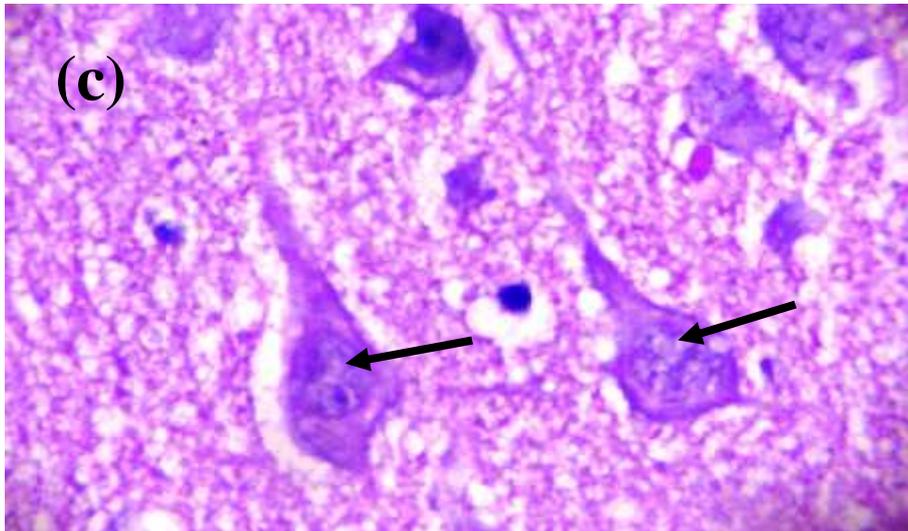


Figure 20 : Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin témoin. Coloration HE; Grossissement : x 4 (a) x 10 (b), x 40 (c)

Flèche bleu : Parenchyme cérébral ; **Flèche jaune** : Tissu gliale de soutien ; **Flèche noir** : Cellules nerveuses granulaires

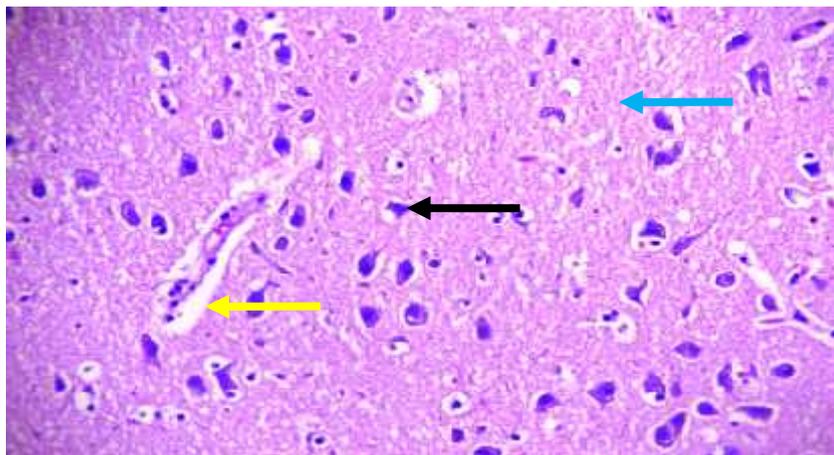


Figure 21 : Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin Traités 1 (VT à faible dose). Coloration HE; Grossissement: x 10

Flèche bleu : Parenchyme cérébral ; **Flèche jaune** : Vaisseau capillaire ; **Flèche noir** : Cellules nerveuses granulaires

➤ **Chez les lapins Traités 2 (VT à dose moyenne) et Traités 3 (VT à forte dose)**

L'observation microscopique de l'hippocampe des lapins traités par la dose moyenne de VT a révélé une modification morphologique des tissus hippocampiques bien visible par rapport au groupe témoin. Une désorganisation architecturale des cellules nerveuses de l'hippocampe a été remarqué (**Figure 22**).

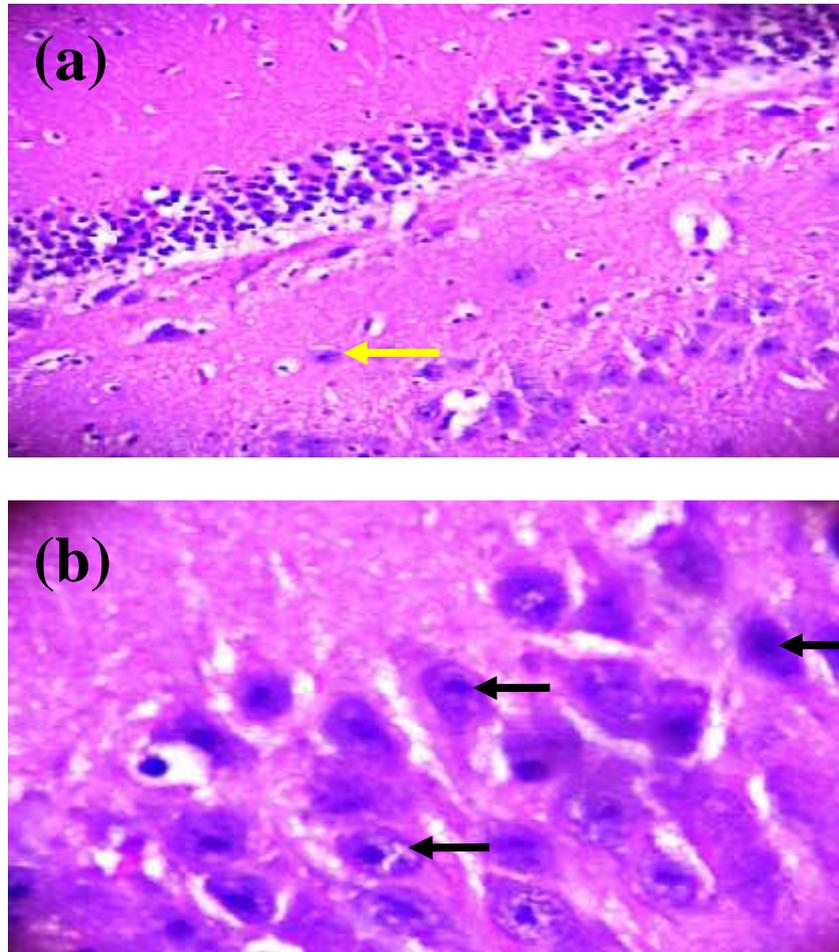


Figure 22 : Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin Traités 2 (VT à dose moyenne) .Coloration HE; Grossissement: x10 (a) , x40 (b)

Flèche jaune : Cellule granulaire ; **Flèche noir :** Désorganisation architecturale des cellules nerveuses

Les coupes histologiques de l'hippocampe après administration d'une forte dose de VT, ont présentés des altérations structurales plus accentuées. Le tissu hippocampique était le siège d'un œdème important et d'une désorganisation de l'architecture des cellules nerveuses, ces dernières apparaissent rétractées et présentent des halots clairs pericellulaires. (**Figure 23**).

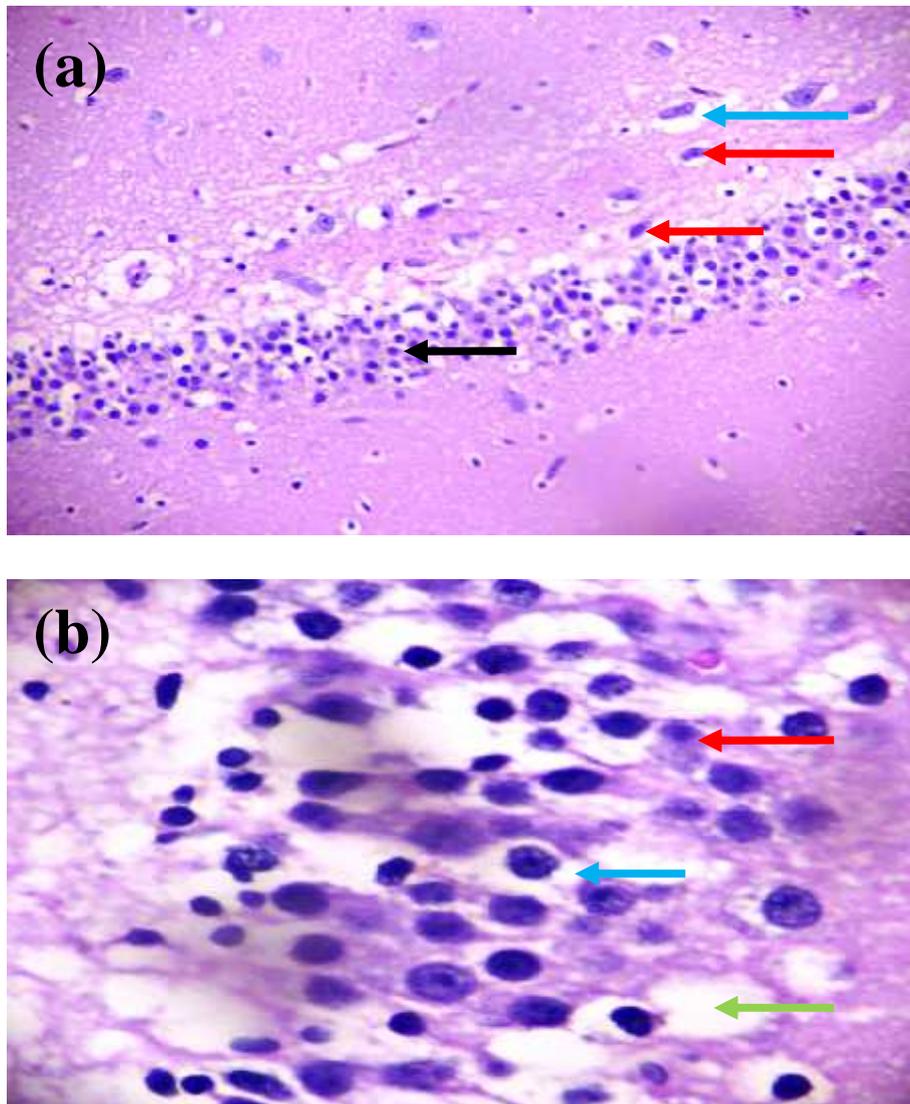


Figure 23 : Structure histologique de l'hippocampe chez le lapin Traités 3 (VT à forte dose). Coloration HE; Grossissement: x 10(a), x 40(b).

Flèche rouge : Rétraction cellulaire ; **Flèche bleu** : Halo claire péri cellulaire ; **Flèche verte** : Œdème; **Flèche noir** : Désorganisations des cellules nerveuses.

Le traitement par le Voliam Targo® à forte dose a engendré des lésions tissulaires hippocampiques. Ces altérations constituent des signes de cérébro-toxicité chez le lapin traité par le Voliam Targo®. Ces altérations des cellules affectent la fonction des neurones et peuvent contribuer à un dysfonctionnement de l'hippocampe et aussi de cerveau. En effet, Ces lésions peuvent être le résultat de la mort cellulaire par nécrose ou apoptose mitochondrie-dépendant (Shafer *et al.*, 2005 ; Mani *et al.*, 2014 ; Syed, 2016).

Nos résultats histopathologiques corroborent ceux de **Khaldoun et al., (2017)** après un traitement des rats par thiaméthoxam et les travaux de **Ali et al., (2017)** ; **Gasmi et al.,**

(2017) et **Wu et Liu, (2015)** chez les rats males traités par le deltamethrine, un pesticide insecticide de la famille des pyréthriinoïdes, qui ont montré des altérations structurales au niveau de l'hippocampe.

En effet, l'étude effectuée par **Daniella et al., (2014)**, a révélé des effets toxiques du chlorpyrifos (CPF) sur le cerveau. Il a été constaté que l'administration du CPF a entraîné l'apparition de plusieurs lésions au niveau du cortex et la corne d'Ammon impliquées dans divers pathologies neurologiques, ce qui pourrait expliquer l'altération de la mémoire de reconnaissance et la mémoire spatiale.

De plus, diverses études ont montré un lien potentiel entre l'exposition aux pesticides sur les neurones pyramidaux de l'hippocampe et la mémoire. Il a été récemment signalé des dommages neuronaux dans de multiples régions du cerveau, y compris l'hippocampe, l'amygdale et le cortex dans un modèle murin lors d'une exposition au métabolite actif des organophosphates (OPs). Une lésion neuronale dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe a été observée, sur une culture cellulaire (PC12) dans un milieu contenant le métabolite actif du parathions POX (**Laximikant., 2014**). Une exposition à (1 et 10µM) de chlorpyrifos-oxon a provoqué les mêmes lésions neuronales mesurées par la fluorescence d'iodure de propidium (**Dongren Yang et al 2008**).

III.2. Histopathologie de cervelet

➤ Chez les lapins Témoins et Traités 1 (VT à faible dose)

L'étude histologique du cervelet chez les lapins témoins et ceux traités par la faible dose de VT montre une architecture histologique normal de cervelet ; une couche de Purkinje intacte, une couche moléculaire et une couche granulaire avec une répartition cellulaire homogène (**Figure 24 et 25**).

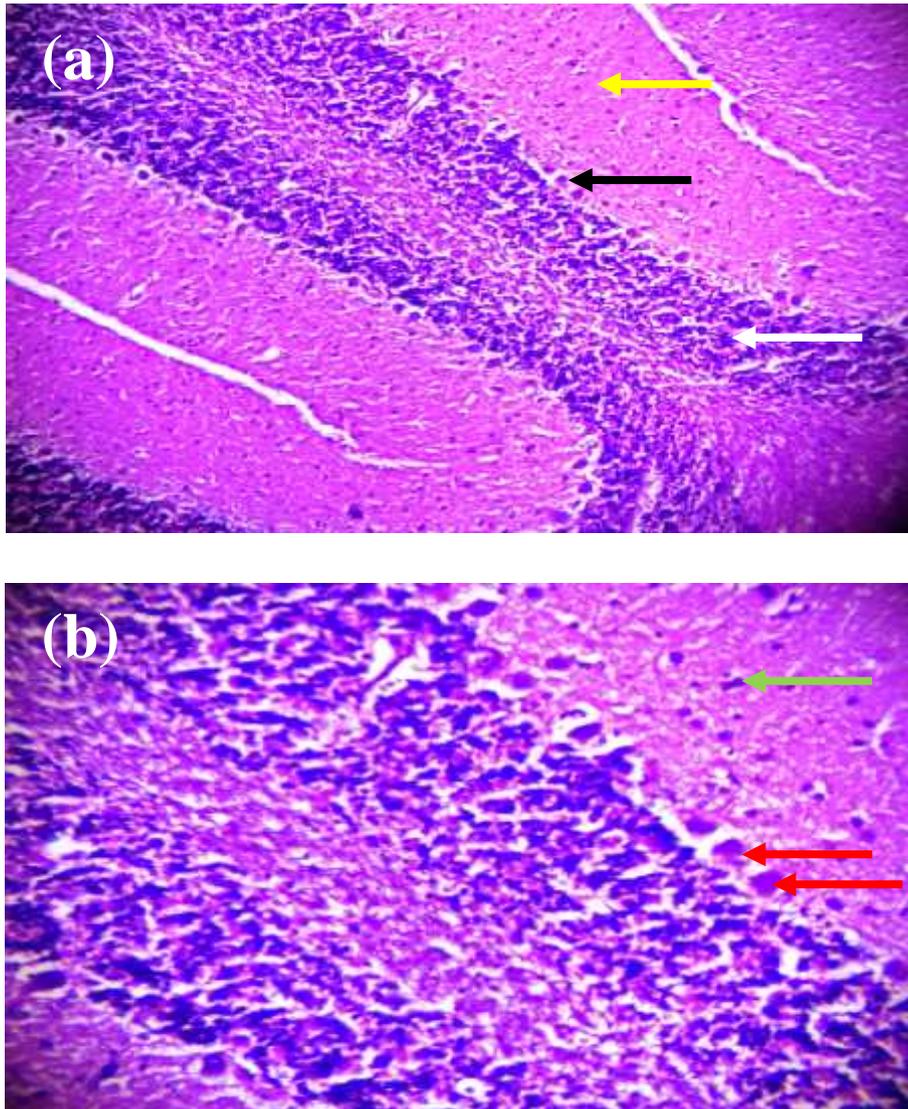


Figure 24 : Structure histologique du cervelet chez le témoin . Coloration HE; Grossissement: x 4 (a), x 10 (b).

Flèche jaune : Couche moléculaire; **Flèche noir :** Cellule nerveuse de Purkinje; **Flèche blanc :** Couche granulaire ; **Flèche verte :** Astrocyte ; **Flèche rouge :** Cellules de Purkinje.

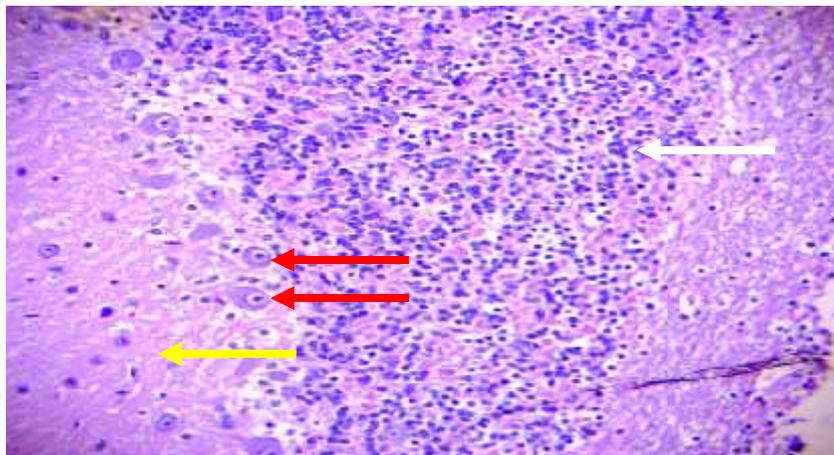
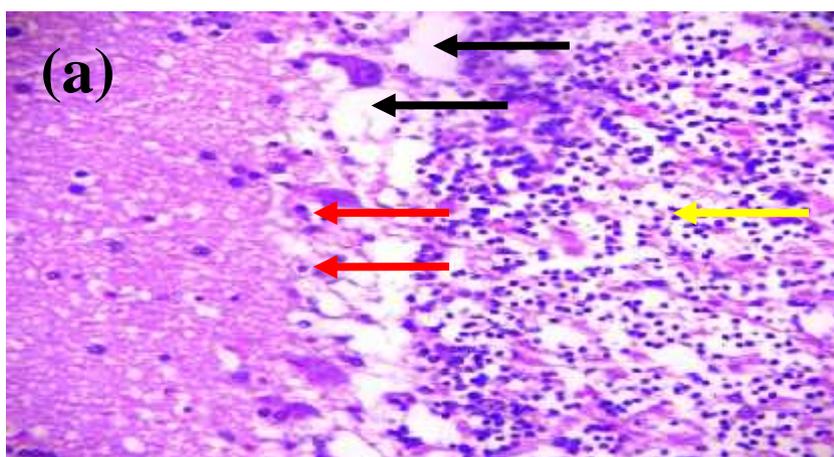


Figure 25 : Structure histologique du cervelet chez le lapin Traités 1 (VT à faible dose). Coloration HE; Grossissement: x 10

Flèche blanc : Couche granulaire ; **Flèche rouge**: Cellule de Purkinje ; **Flèche jaune** : Couche moléculaire.

➤ **Chez les lapins Traités 2 (VT à dose moyenne) et Traités 3 (VT à forte dose)**

L'observation microscopique de cervelet des lapins traités par la dose moyenne de VT a révélé un espacement des cellules de Purkinje et un œdème interstitiel (**Figure 26**) tandis que les coupes histologiques de cervelet après administration d'une forte dose de VT, ont montrés la présence d'œdème interstitiel au niveau de cervelet, une dégénérescence et rétraction des cellules nerveuses. Les cellules de Purkinje apparaissent espacées et rétractées. De plus, des fontes nucléaires des cellules de Purkinje ont été remarquées (**Figure 27**).



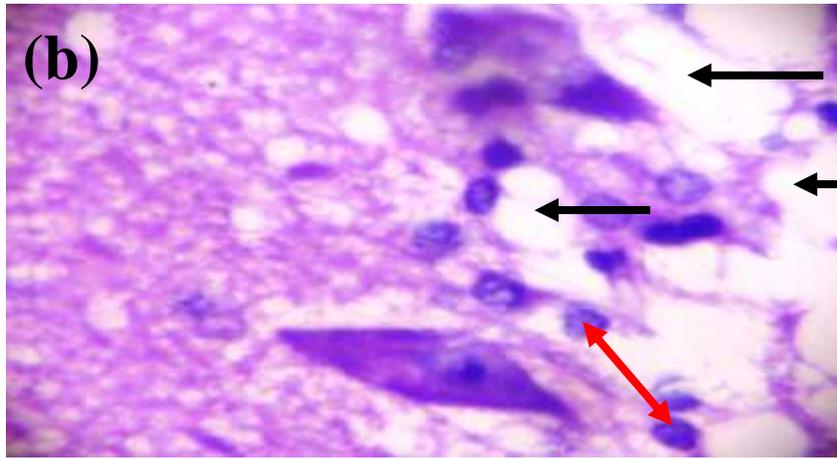


Figure 26 : Structure histologique de cervelet chez le lapin Traités 2 (VT à dose moyenne) .Coloration HE; Grossissement : x 10 (a), x 40 (b).

Flèche noir : Œdème ; **Flèche rouge** : Espacement des cellules de Purkinje ; **Flèche blanc** : Couche granulaire ; **Flèche verte** : Astrocyte ; **Flèche jaune** : Cellules de Purkinje.

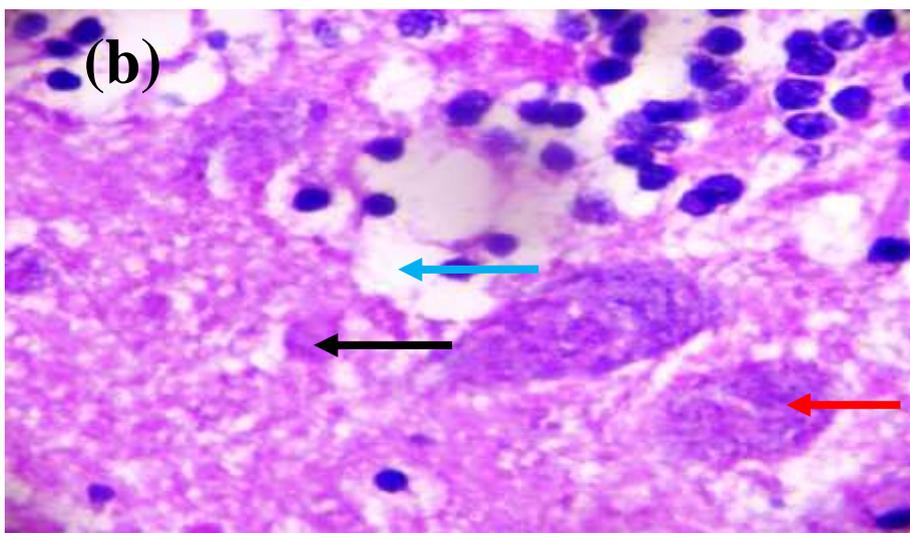
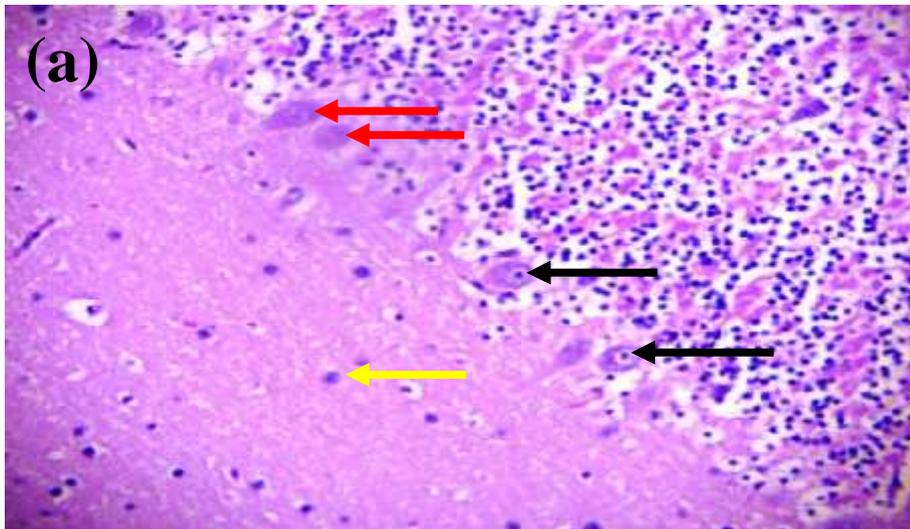


Figure 27 : Structure histologique de cervelet chez le lapin Traités 3 (VT à forte dose). Coloration HE; Grossissement : x 10 (a), x 40(b).

Flèche rouge : Fonte nucléaire des cellules de Purkinje (dégénérescence) ; **Flèche noir** : Rétraction cellulaire ; **Flèche jaune** : Astrocyte ; **Flèche bleu** : Œdème.

Aucune étude n'a été effectuée sur l'effet de ce xénobiotique (Voliam Targo®) sur le cervelet. Cependant, des résultats similaires sont retrouvés chez des rats adultes traités par 3 pesticides pyréthrinoïdes (Allethrin, Imiprothrin et Phenothrin). L'examen histologique des tissus cérébelleux a révélé une désorganisation légère à marquée, des structures cyto-architecturales avec des multiples nécroses (**Igho et Afoke, 2014**). Des observations similaires ont été rapportés par **Ben Amara et al., (2014)** après exposition subaiguë des rats femelles au Fenthion, un pesticide organophosphoré. **Ben Amara et al., (2014)** ont montré que le traitement par le Fenthion a conduit à une réduction du nombre de cellules de Purkinje avec plus de cellules apoptotiques que les contrôles. Il y avait aussi un œdème, ce qui explique un élargissement de la couche cellulaire de Purkinje. Par ailleurs, une étude menée par (**Khaldoun et al., 2017**) a révélé que l'exposition répétée de thiaméthoxame à une dose élevée pendant 6 semaines chez le rat a provoqué l'apparition des cellules de Purkinje nécrosées avec perte de dendrites et de granules dans la couche granulaire du cervelet.

En raison de la richesse en lipide du tissu cérébral, le Voliam Trgo® peut s'être accumulé; provoquant une production excessive de ROS et des lésions tissulaires (**Ali et al., 2017**). Des études antérieures, ont montré que la nature lipophile des pesticides permet leur accumulation dans les membranes biologiques ; dans les tissus riches en lipides incluant le tissu adipeux, foie, Rein et système nerveux (**Soderlund et al., 2002**).

De plus, le traitement VT a provoqué une dégénérescence et rétraction des cellules nerveuses de Purkinje. Nous avons également observé un œdème dans la couche cellulaire de Purkinje. Cela pourrait être dû à la quantité accrue de produits ROS qui pourraient attaquer les membranes et améliorer leur perméabilité, conduisant à la vacuolisation, la principale réponse aux lésions cellulaires (**Robbins et Angell, 1976**). Les perturbations dans les inclusions lipidiques et l'accumulation d'eau intracellulaire produisent une vacuolisation cytoplasmique (**Bouaziz et al., 2010**).

Plusieurs études ont montré une association entre l'exposition aux pesticides et les maladies neurodégénératives. La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus fortement suspecte d'être reliée à l'exposition aux pesticides (**Thomas B et al., 2011**).

Wang et al., (2014) s'est intéressé à une étude de 500 personnes sur les lieux de travail et de résidence, menée dans la vallée centrale de la Californie et a révélé le lien entre la maladie de Parkinson et l'exposition domestique aux herbicides et insecticides. D'autre part, une étude de cas témoin, a fourni la preuve que l'utilisation fréquente d'un pesticide domestique augmente les probabilités d'atteinte de La maladie de Parkinson (**Shilpa et al., 2013**).

En outre, la mise en évidence des taux élevés de pesticides dans des structures cérébrales comme le noyau caudé chez les individus parkinsoniens de Manchester suggère un réel problème d'exposition chronique de ces populations (**Corrigan FM et al., 2000**).

La présente étude est la première à évaluer l'impact du Voliam Targo® sur l'hippocampe cérébral et le cervelet des lapins mâles, et ainsi, contribue à la littérature existante sur la corrélation potentielle entre les pesticides et la maladie neurodégénérative et la neurotoxicité.

III.2. Résultats et discussion de l'étude immunohistochimique

Dans cette étude, nous avons effectué une évaluation de l'expression immunohistochimique de la Bcl-2 et le CD45 dans le cerveau et le cervelet chez le lapin traité par le VT. Les résultats de l'étude immunohistochimique ont montré que l'exposition subaiguë à faible et moyenne dose (5 et 10 mg / kg / jour respectivement) de VT n'a montré aucun marquage (absence de réactivité) dans le cerveau et le cervelet du lapin (**Figure 28, 29, 30 et 31**).

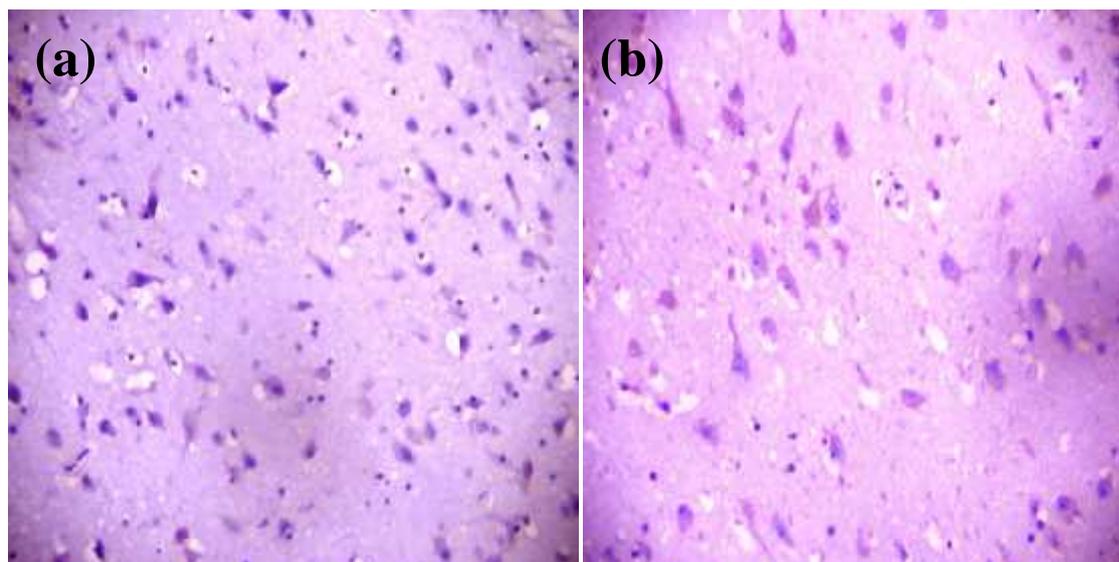


Figure 28 : Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cerveau chez le lapin Traités par VT à faible dose. Grossissement : x 10

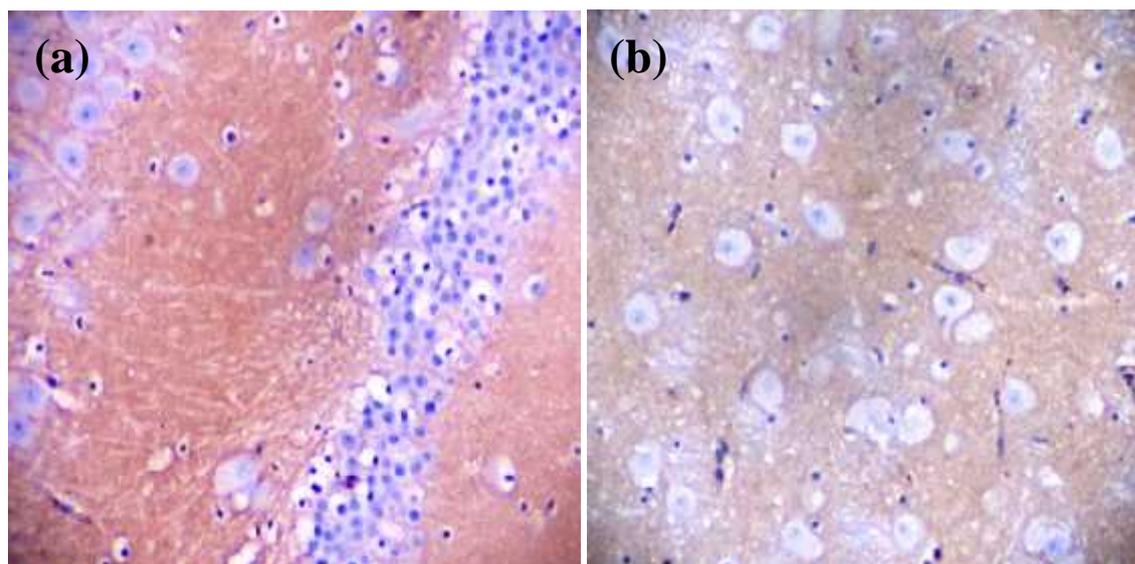


Figure 29 : Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cerveau chez le lapin Traités par VT à moyenne dose. Grossissement : x 10

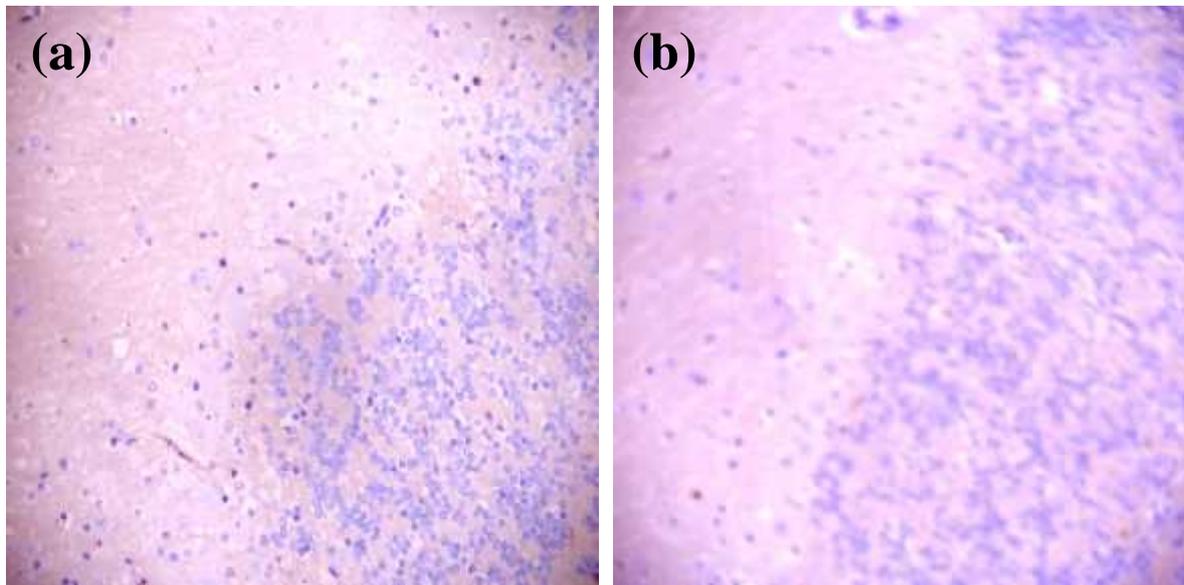


Figure 30 : Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cervelet chez le lapin Traités par VT à faible dose. Grossissement : x 10

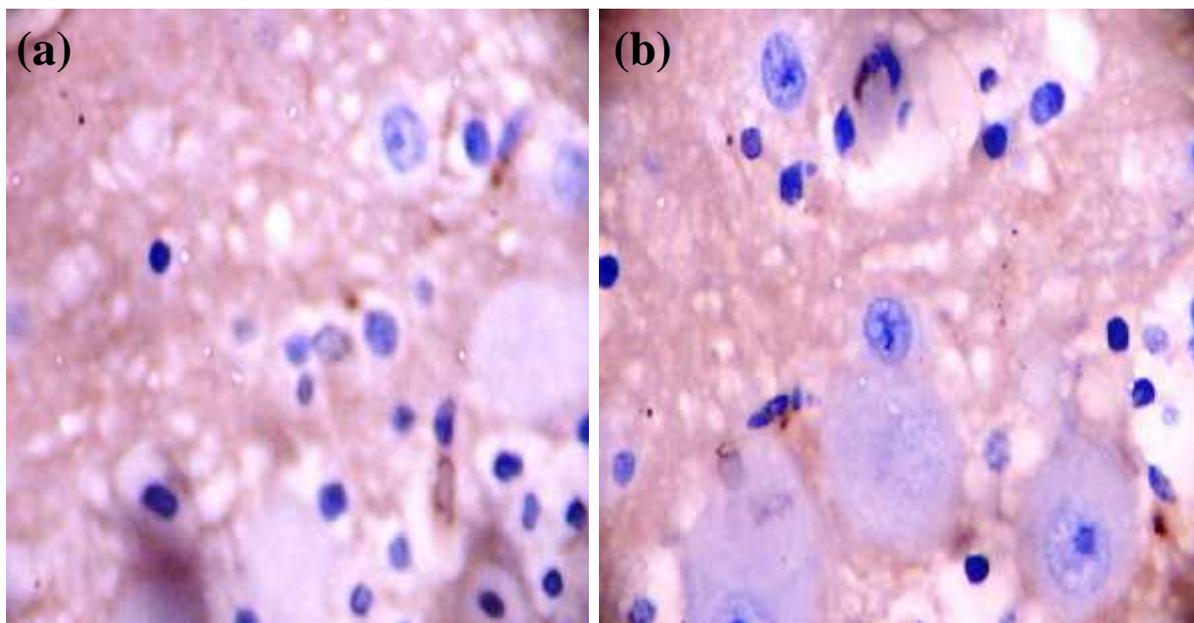


Figure 31 : Photographie d'immunomarquage par CD45 (a) et Bcl-2 (b) de cervelet chez le lapin Traités par VT à moyenne dose. Grossissement : x 40

Pour la forte dose (25 mg/kg/jour), les résultats révèlent un marquage cytoplasmique et nucléaire des cellules nerveuses en apoptose chez les lapins marqués par l'anti BCL2 (**Figure 32**). Cependant, chez les lapins marqués par CD45, les résultats montrent l'absence de réactivité (**Figure 33**).

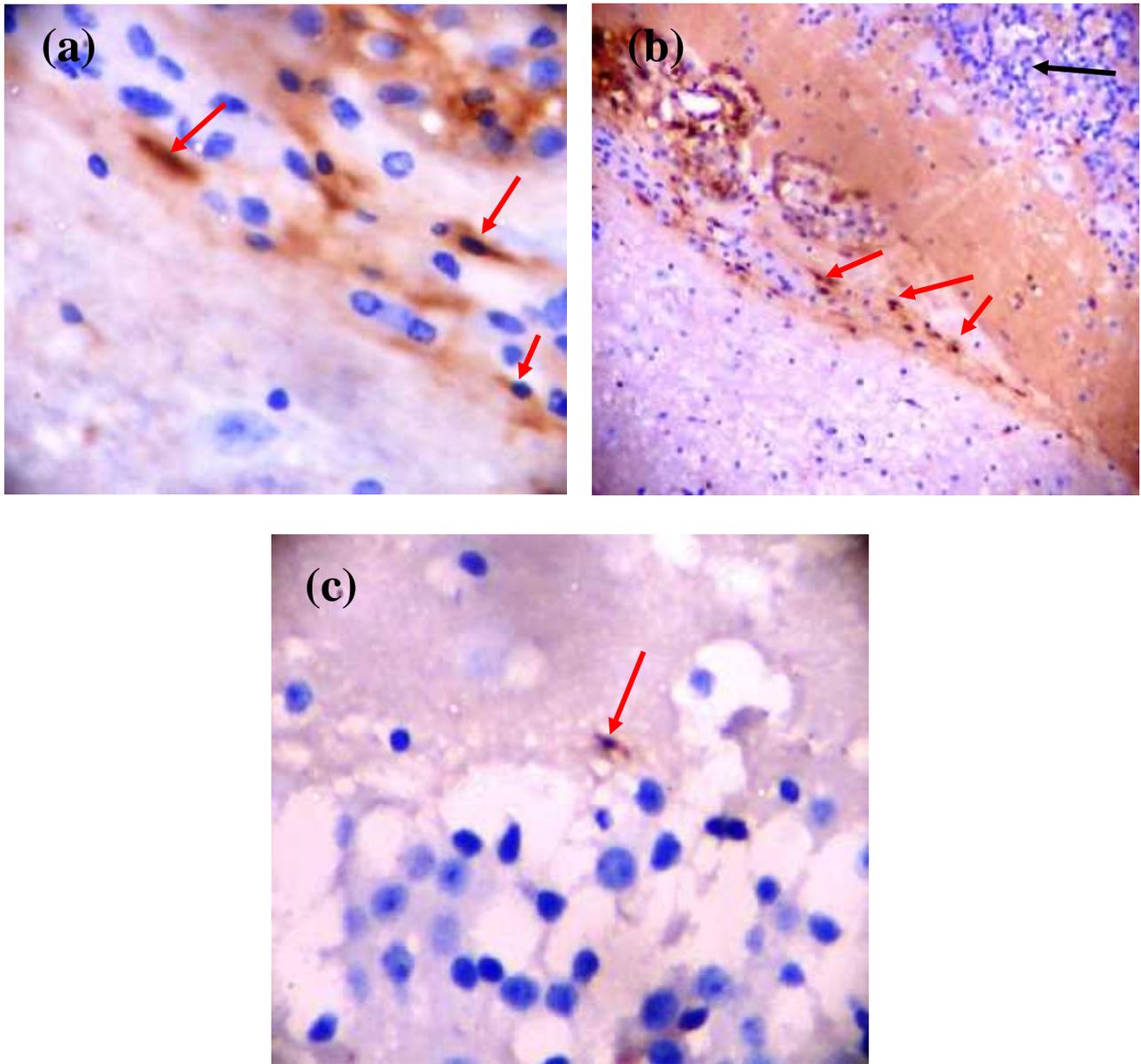


Figure 32 : Photographie d'immunomarquage par Bcl-2 de cervelet Gr x40 (a) ; Gx10(b) et cerveau Gx40 (c) chez le lapin Traités par VT à forte dose.

Flèche noir : couche granulaire ; Flèche rouge : Marquage nucléaire et cytoplasmique des cellules nerveuses rétractées en apoptose.

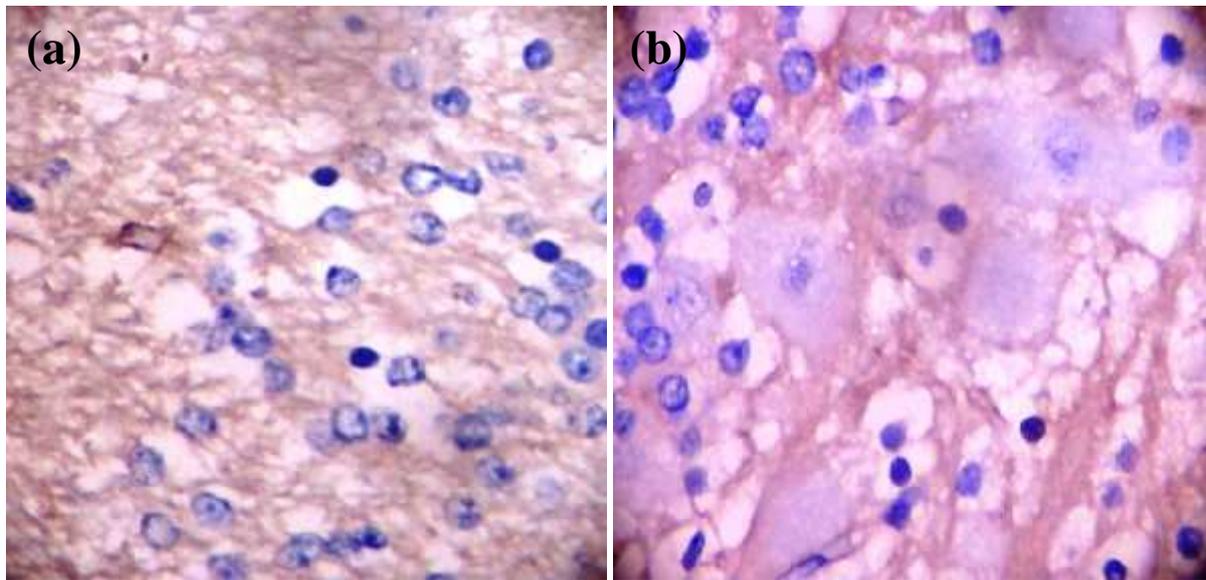


Figure 33 : Photographie d'immunomarquage par CD45 de cerveau(a) et cervelet (b) chez le lapin Traités par VT à forte dose. Grossissement : x 40

L'apoptose neuronale est un mécanisme de neurodégénérescence inductible par les différents stress cellulaires, ainsi que par les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington (**Ravagnan et al., 2002 ; Masoumi, 2009**). Une hypothèse générale actuelle concernant la cause des maladies neurodégénératives est la toxicité d'agrégats protéiques anormaux, qui déclencherait un processus apoptotique (**Yuan & Yankner, 2016**).

La mitochondrie est le premier lieu de déclenchement de ce phénomène par l'intermédiaire de plusieurs facteurs tels que les cytochromes et les caspases. La Caspase-3 est une protéine qui interagit avec la caspase-8 et caspase-9 (**Fesik et Shi, 2001**).

L'apoptose peut être déclenchée par deux voies principales connues sous le nom de voies extrinsèques (dépendantes des récepteurs de la mort) et intrinsèques (dépendantes mitochondriales, reticulum endoplasmique) (**Nagata S et al., 2017**). L'activation de la voie extrinsèque implique des protéines transmembranaires positionnées à la surface de la cellule: les récepteurs de mort cellulaire. Ils appartiennent à la superfamille du TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) et sont capables d'induire la cascade apoptotique lorsqu'ils fixent les ligands appropriés menant à l'activation des caspases (**Thorburn, 2004**).

Dans la voie intrinsèque, la libération de facteurs de mort dans le cytosol des mitochondries et la régulation des protéines de la famille Bcl-2 contribue à l'activation de

l'apoptose. Par exemple, une fois que le cytochrome-c, le principal facteur de mort, est libéré dans le cytosol, il active la caspase-9, qui active ensuite la caspase effectrice connue sous le nom de caspase-3. Enfin, les caspases effectrices activées conduisent irréversiblement à la mort cellulaire. (**Nagata S *et al.*, 2017 ; Martin DN *et al.*, 2004**).

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle essentiel dans le processus apoptotique pour réguler la libération du cytochrome-c. La plupart des chercheurs pensent que Bax / Bcl-2 sont les facteurs clés qui régulent l'apoptose (**Guidolin D *et al.*, 2014**). Cependant, Nos résultats après le traitement par le voliam targo à forte dose montrent un résultat positif (marquage nucléaire et cytoplasmique des cellules nerveuses) et cela pourrait être dû à la prolifération cellulaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Aujourd'hui, les effets des pesticides sur l'environnement et la santé humaine constituent une préoccupation majeure. L'objectif de la présente étude est d'évaluer la neurotoxicité subchronique chez le lapin d'une souche locale d'un pesticide nouvellement introduit en Algérie à savoir le Voliam Targo®. A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

- Le gavage de Voliam Targo® à dose 5 mg/kg/j (1/100DL50) du poids corporel chez les lapins mâles adultes n'a pas d'effets néfastes sur l'histologie de cerveau et cervelet.
- L'exposition subaiguë à ce xénobiotique à raison de deux doses moyenne et forte (1/50 et 1/20 DL50) entraîne des modifications histologiques au niveau de l'hippocampe et le cervelet. Ces modifications sont plus ou moins importantes et s'accroissent en fonction de la dose administrée.
- A l'échelle du tissu hippocampique, un œdème important et une désorganisation de l'architecture des cellules nerveuses ont été remarqués.
- Au niveau de cervelet, le pesticide VT cause des altérations tissulaires révélées par la dégénérescence et la mort des cellules de Purkinje.
- Les résultats de l'étude immunohistochimique ont montré que l'exposition subaiguë à faible et moyenne dose (5 et 10 mg / kg / jour respectivement) de VT montre un résultat négatif (absence de réactivité) dans les organes étudiés.
- Par contre, pour la forte dose (25 mg/kg/jour), les résultats révèlent un marquage cytoplasmique et nucléaire des cellules nerveuses en apoptose chez les lapins marqués par l'anti BCL2. Cependant, chez les lapins marqués par CD45, les résultats révèlent l'absence de réactivité.

Au terme de notre étude nous formulons les perspectives suivantes :

- Chercher la toxicité chronique en prolongeons la durée de traitement,
- D'appliquer le même traitement sur des lapins femelles gestantes ou allaitantes et d'en rechercher les conséquences dans leur descendance,
- Chercher la toxicité aux niveaux des autres organes tels que le foie, les reins, les testicules, les ovaires, le cœur...ect,
- D'utiliser la microscopie électronique afin de chercher les lésions à l'échelle ultra-structurale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alexandra Gros . (2018) : La neurogenèse adulte chez les Mammifères, Planet-Vie, <https://planet-vie.ens.fr/article/2490/neurogenese-adulte-mammiferes>

Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M. and Mohammedsaleh, Z.M. (2016) : Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*, 8 (3) : 72–79.

Amaral ,DG., Witter, MP. (1989) : The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989;31(3):571-591. Review.

Andra SS, Austin C, Patel D, Dolios G, Awawda M, Arora M .(2017) : Trends in the application of highresolution mass spectrometry for human biomonitoring: An analytical primer to studying the environmental chemical space of the human exposome. *Environment International*. doi: 10.1016/j.envint.2016.11.026 - Andrezza AC, Cassini C, Rosa

Anthony Wang, Myles Cockburn, Thomas T. Ly, Jeff Bronstein, and Beate Ritz (2014) : The Association Between Ambient Exposure to Organophosphates and Parkinson’s Disease Risk. *Occup Environ Med*. 2014 April ; 71(4): 275–281. doi:10.1136/oemed-2013-101394.

Ascherio A., Chen H., Weisskopf M. G., O’Reilly E., McCullough M. L., Calle E. E., Schwarzschild M. A. and Thun M. J. (2006) : Pesticide exposure and risk for Parkinson’s disease. *Ann. Neurol*. 60, 197–203.

Bahrami A et al., (2008) : Undifferentiated tumor: true identity by immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*, 2008 Mar;132(3):326-48.

Baldi I, Filleul L, Mohammed-Brahim B, et al., (2001) : Neuropsychologic effects of long-term exposure to pesticides : results from the French Phytoneer study. *Environ Health Perspect* 2001 ; 109 : 839-44.

Baldi I, Cordier S, Coumoul X, Elbaz A. (2003) : Pesticides, effets sur la santé. *Exp collect Inserm* 8-12.

Baltazar MT, Dinis-Oliveira RJ, de Lourdes BM, Tsatsakis AM, Duarte JA, Carvalho F.(2014) : Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—a mechanistic approach. *Toxicol Lett* 230:85–103 .

Bencheikh S. (2010) : Les pesticides: définition, classification et données de toxicovigilance. Société Empreintes Edition. 4: 1-16.

Boels, D. Chataigner, D. Hemouet, C. Nisse, P. Puskarczyk, E. Rambourg, M.O. Saviuc, P. (2012) : L’ANSES :étude rétrospective des expositions aux produits phytopharmaceutiques à base d’abamectine.

Boland, J., Koomen, I., Lidth de Jeude, J.V., Geude, D.E. and Oudegans, J. (2004) : Les pesticides compositions, utilisation et risques. 1^{ère} édition. Wageningen : Fondation Agromisa. 1-124.

Bouaziz H, Ben Amara I, Essefi M, Croute F & Zeghal N. (2010) : *Pest Biochem Physiol* 96, 24–29.

Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. (2006) : Pesticides and Parkinson’s disease is there a link? *Environ Health Perspect*. 2006;114:156–164.

Daniella M. Pizzurroa, Khoi Daoa, and Lucio G. Costaa,b. (2014) : Diazinon and diazoxon impair the ability of astrocytes to foster neurite outgrowth in primary hippocampal neurons. a Department of Environmental and Occupational Health Sciences, University of Washington, Seattle, WA, USA. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 February 1; 274(3): 372–382. doi:10.1016/j.taap.2013.11.023.

Dongren Yang¹, Angela Howard, Donald Bruun¹, Mispa Ajua-Alemanj, Cecile Pickart, and Pamela J. Lein¹. (2008) : Chlorpyrifos and Chlorpyrifos- Oxon Inhibit Axonal Growth by Interfering with the Morphogenic Activity of Acetylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 228(1): 32–41.

Castanha Zanoli JC¹, Maioli MA, Medeiros HC, Mingatto FE. (2012) : Abamectin affects the 526 bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. *Toxicol In Vitro*, 26(1):51-6.

Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, et al, (2006) : Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic Biochem Phys* 84:196–214.

Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D. (2000) : Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A.* 2000;59(4):229–234.

Costa LG. (2006) : Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366: 1-13.

Djoudad-Kadji, H., Benslimane, S., Chevalier, C., Kadji, B., Exbrayat, J-M., and Iguer-Ouada, M. (2011) : Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de barbus callensis variation de fixateurs et de colorants. *Revue Française d'Histotechnologie*, 24 (1) : 21-28.

Echobichon, D.J. (2001) : Pesticides use in developing countries, *Toxicology*, 160 (1-3), 27-33.

EISSA, Fawzy Ismail., ZIDAN, Nourelhoda. (2010) : Haematological, biochemical and histopathological alterations induced by abamectin and *Bacillus thuringiensis* in male albino rats. *Acta Biologica Hungarica*, 2010, n°61, p. 13.

Elbaz A, Tranchant C. (2007) : Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2007;262(1–2):37–44.

El Hassani AK, Dacher M, Gary V et al., (2008) : Effects of Sublethal Doses of Acetamidrid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee. *Arch Environ Contam Toxicol* 54(653)

El-Shenawy NS. (2010) : Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24: 1148–1157.

FORTIER, Jacques C., et René HOULD. (2003) : Histotechnologie théorie et procédés, Montréal, Centre collégial de développement de matériel didactique, 717 p.

Freund TF, Buzsáki G. (1996) : Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6(4):347- 470. Review.

Gasmi S, Rouabhi R, Kebieche M, Boussekine S, Salmi A, Toualbia N, Taib C, Bouteraa Z, Chenikher H, Henine S, Djabri B. (2017) : Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24(19):16440-16457.

- Grasse P. P. (1949)** : Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie : Ed. Masson et Cie, Paris, 979p.
- Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, et al. (2008)** : Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol* 86; doi:10.1186/1471-2377-8-6[Online 28 March 2008].
- Hannig, T. Ziegler, M. Paula, G. (2009)** : Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. *Pest Manag Sci* ; 65: 969–974.
- Houcine B. (2015)** : Dégradation par voie électrochimique de nitro bendaldéhyde et cypermethrine et étude cinétique d'oxydation atmosphérique du bupirimate et nitro bendaldéhyde, thèse de doctorat, Reims France, 182 pages
- Hsu, Dur-Zong, Hsu, Ching-Hung, Huang, Bu-Miin, Liu, Ming-Yie. (2001)** : Abamectin effects on aspartate aminotransferase and nitric oxide in rats. *Toxicology* 165, 189–193.
- Igho OE, Afoke IK. (2014)** : A histomorphologic analysis of pyrethroid pesticide on the cerebrum and cerebellum of adult albino rats. *J Exp Clin Anat.* 13:54 - 59
- INRS, (2016)** : Base de données fiche toxicologique, sur le site web de l'INRS : www.inrs.fr/fichetox.
- 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.
- Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V, Sondarva G, Rangasamy V, Rana A. (2012)** : Emerging neurotoxic mechanisms in environmental factors-induced neurodegeneration. *Neurotoxicology* 33(7): 824-833.
- Khaldoun-oularbi, H. Rechval, C. Djenas, N. Lhermitte, M. Humbert, L. Baz, A. (2013)** : Effect of sub-acute exposure to Abamectine (insecticide) on liver rats (*Rattus norvegicus*). *Annales de toxicologie analytique*, 25(2) :p36-70.
- Khaldoun-oularbi, H. Rechval, C. Djenas, N. (2015)** : Néphrotoxicité d'un biopesticide , l'Abamectine chez le rat wistar . Congrée SFTA .
- Khaldoun-oularbi, H. et al (2017)** : Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney liver cerebellum and hippocampus of male rats. *Journal of Xenobiotics*, volume 7:7149, p. 25-30
- Kierszenbaum, L.A. (2006)** : Histologie et biologie cellulaire, une introduction à l'anatomie pathologique. Bruxelles : De Boeck. 1-618.
- Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. (2004)** : Dieldrin promotes proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase and apoptosis in dopaminergic cells: protective effect of mitochondrial anti-apoptotic protein Bcl 2. *Neurotoxicology.* 25:589–598.
- Lahm GP, Stevenson TM, Selby TP, Freudenberger JH, Cordova D, Flexner L, et al., (2007)** : Rynaxypyr: a new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *BioorgMed Chem Lett* 17:6274–6279.
- Lauvverys R, Vincent H, Dominique L. (2007)** : Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles. Masson 31-288pp.

Laxmikant S. Deshpande, Kristin Phillips, Beverly Huang and Robert J. DeLorenz. (2014) : Chronic behavioral and cognitive deficits in a rat survival model of paraoxon toxicity. *Neurotoxicology*.0: 352–357. doi:10.1016/j.neuro.2014.08.008.

Lebailly, P., Mohammed-Brahim, B., Letenneur, L., Dartigues, J.F., Brochard, P. (2007) : Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am. J. Epidemiol.* 157, 409–414. Beseler, C.L., Stallones, L., 2008. A

Lebas F., COUDERT P., ROUVIER R., ROCHAMBEAU de H. (1984) : Le lapin ,élevage et pathologie, Edition FAO, Rome, 298p.

Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH. (1990) : Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev.* 70(2):453-511. Review.

Lush, M. J., Li, Y., Read, D. J., Willis, A. C., and Glynn, P. (1998) : Neuropathy target esterase and a homologous *Drosophila* neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man. *Biochem. J.*332, 1-4.

Mani MV, Asha S, Sadiq MMA. (2014) : Pyrethroid deltamethrin-induced developmental neurodegenerative cerebral injury and ameliorating effect of dietary glycoside naringin in male wistar rats. *Biomed Aging Pathol* 4: 1-9.

Multinger L. (2005) : Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, Risque et santé.* Vol (4).187-194.

Muriel C. (2010) : Les maladies transmissibles des lapins de garenne (*Oryctolagus cuniculus*) en liberté. Thèse en médecine de l'université Claude-Bernard - Lyon I.

Neuwelt, E. a et al., (2011) : Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(3), pp.169-82.

Omura, S. (2008) : Ivermectine : 25 Years and still going strong. *International journal of antimicrobial agents*, 31 (2), 91-98.

Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. (2000) : A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology* 21 : 435-40.

Priyadarshi A., Khuder S. A., Schaub E. A. and Priyadarshi S. S. (2001) : Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ. Res.* 86, 122–127.

PubChem, (2018) : Données déposées ou calculées par PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

Ramón y Cajal S. (1911) : Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, Vols. 1 and 2. A. Maloine : Paris.

René, H. (1984) : Technique d'histopathologie et de cytopathologie, 1 ère édition Montréal : Décarie ; Paris, 400p.

Ribas-Fitó N, Sunyer J, Room M, Grimalt JO. (2003) : Changes in concentrations of organochlorine compounds in the women of Flix, Tarragona. *Gac Sanit.* 17: 309-11.

Ritz B, Yu F. (2000) : Parkinson's disease mortality and pesticide exposure in California 1984-1994. *Int J Epidemiol* 29:323–329.

Robbins S L & Angell D. (1976) : Basic pathology, 2nd edn, pp 113–131, W.B. Saunders Co Philadelphia, London.

Rosen, G., Williams, A., Capra, J., Connolly, M., Cruz, B., Lu, L., Airey, D., Kulkarni, K., Williams, R. (2000) : The Mouse Brain Library [WWW Document]. Mouse Brain Libr. URL <http://www.mbl.org>.

Savary, C. (2014) : Étude de la toxicité chronique et du potentiel cancérigène de contaminants de l'environnement séparément et en mélange sur les cellules HepaRG.

Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. (2005) : Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 113: 123-136.

Shilpa Narayan, Pei-Chen Lee, Zeyan Liew, Kimberly Paul, Janet S Sinsheimer, Jeff M Bronstein and Beate Ritz. (2013) : Household organophosphorus pesticide use and Parkinson's disease *International Journal of Epidemiology* 2013;42:1476–1485 doi:10.1093/ije/dyt170

Shinomiya N, Shinomiya M. (2003) : Dichlorodiphenyltrichloroethane suppresses neurite outgrowth and induces apoptosis in PC12 pheochromocytoma cells. *Toxicol Lett.* 137:175–183.

Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T. & Weiner, M.L. (2002) : Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171: 3-59.

Sotelo C. (1967) : Cerebellar neuroglia: morphological and histochemical aspects. *Prog Brain Res* 25: 226-250.

Stephens R, Spurgeon A, Calvert IA, et al., (1995) : Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. *Lancet* 345 : 1135-9.

Stoytcheva M. (2011) : Pesticides in the Modern World-Risks and Benefits. InTech. ISBN 978-953. 560p

Sun F, Anantharam V, Latchoumycandane C, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. (2005) : Dieldrin induces ubiquitin-proteasome dysfunction in alpha-synuclein overexpressing dopaminergic neuronal cells and enhances susceptibility to apoptotic cell death. *J Pharmacol Exp Ther.* 315:69–79.

Syed F. (2016) : Beta-cyfluthrin induced neurobehavioral impairments in adult rats. *Chemico-Biological Interactions* 243: 19-28.

Tachdjian, Gérard et al., (2016) : Embryologie et histologie humaines. Paris : ELSEVIER, 342 p.

Thiruchelvam M, Prokopenko O, Cory-Slechta DA, Buckley B, Mirochnitchenko O. (2005): Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat + maneb-induced Parkinson disease phenotype. *J Biol Chem.* 280:22530–22539.

Thomas B, Flint B. (2011) : Molecular insights into Parkinson's disease. *F1000 Reports Med* 2011 ; 3 : 7-15.

Tron, I., Piquet, O. and Cohuet, S. (2001) : Effets chroniques des pesticides sur la sante : Etat actuel des connaissances. Bretagne : Observatoire Régional de Santé (ORS) de Bretagne. 1-88.

van Wendel de Joode B, Wesseling C, Kromhout H, Monge P, Garcia M, Mergler D. (2001) : Chronic nervous-system effects of long-term occupational exposure to DDT. 357 : 1014-6.

Véronique M. (2010) : Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie théorie et pratique. Elsevier Masson SAS. P183.

Vuillier , F., Medeiros de Bustos, E´., et al., (2011) : Functional organisation of the cerebellum : A neuroanatomical approach. revue neurologique , p. 361–369 .

Site internet : **Anonyme 4 (2014).** pmra.publications@hc-sc.gc.ca. casantecanada.gc.ca/arla.

ANNEXES

Annexe N°1 : Verreries et autres matériels



Lames



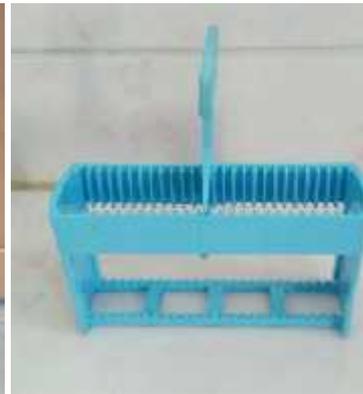
Lamelles



Lame silanisé



Pissette



Panier



Dako pen



Portoir



Micropipette



Pince



Moule



Trousse de dissection



Histo-cassette

Annexe N°2 : Réactifs et solutions

Formole – alcool – l'eau de robinet – l'eau distillé – xylène- hématoxyline- ammoniacque-

Eosine - Paraffine - Eukit

Annexe N°3 : Appareillage



Appareil de déshydratation



Etuve



Microtome



Bain marie



Appareil de démasquage



Appareil d'inclusion en paraffine



Appareil de distillation



Congélateur



Microscope optique