

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

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

Spécialité :
BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE, IMMUNOLOGIE

THEME

**CONTRIBUTION A LA RECHERCHE DES EFFETS DE
DEUX DOSES D'IMIDACLOPRIDE SUR LES GLANDES
SURRENALES ET LA STRUCTURE DE LA RATE CHEZ
LES RATS DE SOUCHE WISTAR**

Présenté par

Mlle BOUKENOUI Khadidja

Soutenu le 26/12/2013

Devant le jury composé de :

M^{me} CHAKHMA A. MAA	USDB	Présidente
M^{me} BOKRETA S. MAB	USDB	Examinatrice
M^{me} ZATRA Y.MAA	USDB	Examinatrice
M^{me} SAADI L.MCB	USDB	Promotrice

Promotion 2012-2013

DEDICACE

A lalla Ratiba,

*Azizti, pour moi tu es le symbole de la bonté par excellence,
la source de tendresse et l'exemple du dévouement.
Tu n'as cessé de m'encourager,
tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour son enfant.*

A sidi Mustapha,

*Babaya hanouni, aucune dédicace ne saurait compenser les sacrifices, autant
matériel que moral, que tu as consentis pour ma formation et ma réussite.
Aucun mot, quelque soit sa valeur ne saura témoigner mon profond
amour, mon respect et mon estime pour toi.*

*Mon Cher père et ma chère mère,
Sachez qu'à chaque pas je n'ai souhaité que vous rendre fières
Et que par ce travail, j'espère vous satisfaire
Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue
vie et bonheur*

Khadidja.

REMERCIEMENTS

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

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

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

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

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

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

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

RESUME

La recherche de la toxicité d'un insecticide néonicotinoïde, imidaclopride, chez les mammifères a fait l'objet de plusieurs études

des expérimentales. Notre présent travail a comme objectif la recherche de la toxicité

par voie orale d'imidaclopride (IMI) à raison de 1/85 et 1/120 DL50 mg/kg/j, étalée sur une période de 30 jours sur la structure de la rate et des glandes surrénales ainsi que sur le taux du cortisol plasmatique chez des rats de souche wistar.

Notre étude est portée sur 22 rats répartis en trois groupes : un groupe témoins (n=5), un groupe traité à 1/85 DL50 (5,18) mg/kg/j d'IMI (n=10) et un autre groupe traité à 1/120 DL50 (3,67) mg/kg/j d'IMI (n=7). Après décapitation, le sang recueilli est destiné au dosage du cortisol et les surrénales ainsi que la rate sont fixées dans du bouillabaisse afin de réaliser une étude histopathologique.

Une augmentation non significative du taux de cortisol est enregistrée chez le groupe traité à 1/85 DL50 d'IMI. Alors que l'étude histologique de la rate et la surrénale montrent des altérations chez les deux groupes traités : une hyperplasie de la pulpe blanche et une déplétion lymphocytaire qui est accentuée chez les traités à forte dose ainsi que la présence de congestions sanguines, d'infiltrations cellulaires et d'une dilatation des capillaires sanguins au niveau de la zone réticulée et la médullaire. En se basant sur les altérations histopathologiques révélées par les traitements à l'IMI, on suggère que la toxicité par voie orale de l'IMI est dose-dépendante et que la dose sans effet observable est inférieure à 1/120 DL50 IMI (<3,67) mg/kg/j.

Mots clés : Imidaclopride, Rats de souche wistar, Toxicité par voie orale, Dose sans effet observable.

ملخص

إن البحث عن مفعول سمية مبيد الحشرات إيميداكلوبريد عند الثدييات موضوع عدة دراسات تجريبية وبحثنا يتجه في نفس السياق لتقييم مفعول سمية الإيميداكلوبريد عن طريق التجريع الفموي ل 85/1 و 120/1 DL50 مغ/كغ/يوم لمدة 30 يوم على بنية الطحال و الغدة الكظرية و على التركيز البلازمي للكرتيزول عند إناث الجرذان من فصيلة Wistar

شملت دراستنا 22 أنثى جرذان موزعة على ثلاثة أفواج: فوج شاهد(ن= 5)، فوج مطعم بجرعة 85/1 (5,18) DL50 غ/كغ/يوم (ن=10) وفوج مطعم بجرعة 120/1 DL50 (3,67) مغ/كغ/يوم (ن=7) . بعد قطع رؤوسها يُلتقط الدم بهدف الكشف على تركيز الكورتيزول. أما الغدة الكظرية و الطحال فتثبتت في محلول البوان لإنجاز دراسة نسيجية مرضية.

سُجِّلَ إرتفاع غير معنوي في معدل الكورتيزول عند المطعمين بجرعة 85/1 DL50 مغ/كغ/يوم بينما أظهرت الدراسة النسيجية للطحال و الغدة الكظرية وجود إتلافات عند كلتا الفوجين المعالجين. تتمثل هذه الإتلافات في تضخم اللب الأبيض ونضوب لمفاوي شديد في حالة المعالجين بالجرعة الكبيرة DL50 85/1 ، كذلك وجود احتقان دموي ؛ تسلل خلوي و تمدد الشعيرات الدموية في منطقة الشبكية و اللب. إعتقادا على هذه الإتلافات النسيجية الناتجة عن التزقيم بالإيميداكلوبريد نقترح أن سميته تعتمد على الجرعة المستعملة و أن الجرعة ذات التأثير الغير الظاهر أقل من DL50 120/1 (>3,67) مغ/كغ/يوم.

كلمات المفتاح : إيميداكلوبريد ; سمية عن طريق التجريع الفموي ; إناث الجرذان البالغة ; الجرعة ذات التأثير الغير الظاهر

Abstract

The searching for the toxicity of imidacloprid insecticide at the mammalian was the subject of many experimental studies. The objective of our study is to evaluate the effect of 30 days oral imidacloprid toxicity at 1/85 LD50 and 1/120 LD50 mg/kg/d on the spleen and adrenal gland and plasmic cortisol concentration on wistar female rats.

Our experiment is done on 22 female rats distributed on three groups: group control (n=5), a group treated at 1/85 LD50 (5,18) mg/kg/d (n=10) and another group treated at 1/120 LD50 (3,67) mg/kg/d (n=7) of imidacloprid. After decapitation, the blood collected is used to the cortisol dosage. The adrenal gland and the spleen are fixed in buin liquid in order to conduct an histopathological investigation.

We notice a non significant increase of the plasma cortisol concentration of the group treated at 1/85 LD50 of imidacloprid. The histological study of spleen and adrenal gland show alterations at both treated groups: hyperplasia of white pulp and lymphocyte depletion which is accentuated in the highest dose treated group, also the presence of blood congestions, cellular infiltrations and dilated capillaries of reticular zone and medulla. Based on the histological alterations revealed by the imidacloprid treatment, we suggest that its oral toxicity is dose-dependent and the no observable adverse effect level is lower to 1/120 LD50 (<3,67) mg/kg/d.

Keywords: Imidacloprid ; Adult female wistar rats ; oral toxicity ; no observable adverse effect level

GLOSSAIRE

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

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

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

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

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

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

Emamectine benzoate : insecticide apparenté à la famille des avermectines. Il a la propriété de fixer les récepteurs GABA et induire une paralysie ainsi qu'une décontraction irréversible des muscles.

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

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

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> :	Propriétés physicochimiques de l'imidaclopride	Annexe 1
<u>Tableau II</u> :	Composition des bouchons alimentaires	
<u>Tableau III</u> :	Répartition des lots de rats au cours de l'expérimentation	11
<u>Tableau IV</u> :	Valeurs des poids corporels (g) des rats femelles adultes témoins et traités avant et après l'expérimentation	Annexe 2
<u>Tableau V</u> :	Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) des rates des rats femelles adultes témoins et traités à l'imidaclopride	Annexe 2
<u>Tableau VI</u> :	Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) des surrénales droites des rats femelles adultes témoins et traités à l'imidaclopride	Annexe 2
<u>Tableau VII</u> :	Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) des surrénales gauches des rats femelles adultes témoins et traités à l'imidaclopride	Annexe 2
<u>Tableau VIII</u> :	Taux moyens du cortisol plasmatique en pmol/l chez les rats témoins et traités et leurs significations	Annexe 2
<u>Tableau IX</u> :	Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) des rats femelles adultes témoins et traités et leurs significations	
<u>Tableau X</u> :	Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) des rates des rats femelles adultes témoins et traités et leurs significations	Annexe 2
<u>Tableau XI</u> :	Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) des surrénales droites des rats femelles adultes témoins et traités et leurs significations	Annexe 2
<u>Tableau XII</u> :	Valeurs moyennes des poids absolus (g) et relatifs (g%) des surrénales gauches des rats femelles adultes témoins et leurs significations	Annexe 2

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Principe du test de compétition	12
<u>Figure 2</u> :	Evolution du poids corporel chez les rats témoins et traités à l'imidaclopride	17
<u>Figure 3</u> :	Valeurs moyennes des poids absolu (g) et relatif (%) des rates chez les rats femelles témoins et traités à l'imidaclopride	18
<u>Figure 4.A</u> :	Valeurs moyennes des poids absolu (g) et relatif (%) des surrénales droites chez les rats témoins et traités à l'imidaclopride	19
<u>Figure 4.B</u> :	Valeurs moyennes des poids absolu (g) et relatif (%) des surrénales gauches chez les rats témoins et traités à l'imidaclopride	19
<u>Figure 5</u> :	Valeurs moyennes de la concentration plasmatique du cortisol chez les rats femelles témoins et traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride.	20
<u>Figure 6</u> :	Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins. Coloration : TM(a), He (b,c et d); Gr: x100 (a,b) et x400 (c,d).	22
<u>Figure 7</u> :	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles témoins. Coloration : AH ; Gr: x100.	23
<u>Figure 8</u> :	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traités à l'IMI. Coloration : HE ; Gr: x100	24
<u>Figure 9</u> :	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traités à l'IMI et témoins. Coloration : HE ; Gr: x400	25
<u>Figure 10</u> :	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles témoins. Coloration : AH ; Gr: x100 et x400	26
<u>Figure 11</u> :	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traités à l'IMI. Coloration : AH ; Gr: x100	27
<u>Figure 12</u> :	Structure du parenchyme splénique chez les rats femelles traités à l'IMI. Coloration : AH ; Gr: x400	28
<u>Figure 13</u> :	Structure générale de la glande surrénale chez les rats femelles témoins. Coloration : HE ; Gr: x100.	

Figure 14 : Organisation structurale générale de la glande surrénale chez les rats femelles témoins (a) et traités à raison de 1/85 DL50 (b) et 1/120 DL50. Coloration : HE ; Gr: x100. 31

Figure 15 : Structure des zones glomérulée et la fasciculée corticosurrénaliennes chez les rats femelles témoins et traités. Coloration : HE ; Gr: x400. 32

LISTE DES ABBREVIATIONS

AH	Azan de Heidenhain
CS	Capillaire sinusoïde
C	Cortex
Cap	Capsule
CAS	Chemical Abstracts Service
ddl	Degré de liberté
DJA	Dose Journalière admissible
DL50	Dose létale médiane
HE	Hematoxyline-éosine
HENRY	Constante de la loi de Henry
IL	Interleukine
IMI	Imidaclopride
	Récepteurs de l'acétylcholine
nAChR	
NOAEL	Dose sans effet toxique
NOEL	Dose sans effet
p	Pourcentage de risque
PB	Pulpe blanche
PR	Pulpe rouge
pmol	pico mol
TNF- α	Tumor necrosis factor α
tc	t tabulé
tt	t calculé

SOMMAIRE

INTRODUCTON	1
CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
I.1. GENERALITES SUR L'IMIDACLOPRIDE	3
I.1.1. Mode d'action	3
I.1.1. Devenir de l'imidaclopride dans l'environnement	4
I.2. PROFIL TOXICOLOGIQUE	4
I.2.1. Pharmacocinétique	4
I.2.2. Toxicité aiguë	5
I.2.3. Toxicité subchronique	5
I.2.4. Toxicité chronique	6
I.2.5. Génotoxicité et Oncotoxicité	6
I.2.6. Toxicité sur la reproduction	6
I.2.7. Immunotoxicité développementale	7
I.2.8. Neurotoxicité	7
I.2.9. Ecotoxicité	7
I.3. ETUDES RECENTES SUR LES EFFETS DE L'IMIDACLOPRIDE	
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	
II.1. MATERIEL	9
II.1.1. Animaux et régime	9
II.1.2. Insecticide	9
II.2. METHODES	11
II.2.1. Expérimentation	11
II.2.2. Sacrifice des animaux	11
II.2.3. Prélèvement des échantillons	12
II.2.4. Détermination du taux de cortisol	12
II.2.5. Etude histologique	12
II.2.7. Calculs statistiques	16
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	
III.1. RESULTATS	17
III.1.1. Evolution pondérale	17
III.1.2. Profil hormonale	
III.1.3. Histopathologie	21
III.1.3.1. Rate	
III.1.3.2. Glandes surrénales	29

III.2. DISCUSSION

35

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

38

INTRODUCTION

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

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

En Europe, cet insecticide a causé beaucoup de controverses ces dernières années. Plusieurs études ont été réalisées afin de vérifier les dommages induits chez les colonies d'abeilles (Laramée, 2007). De ce fait, l'utilisation de l'imidaclopride en France a été bannie en 1999 pour les cultures de tournesol et en 2004 pour les cultures de maïs. Mais ce n'est qu'en 2008 que l'Allemagne a suspendu l'utilisation de l'IMI dans le traitement de semences. Par la suite, l'Italie a adopté cette restriction en 2009 par mesure de précaution. Alors qu'aux Etats Unies, son utilisation a été simplement limitée aux agrumes en 2011 (Watts, 2011). Par ailleurs, la commission Européenne a lancé la restriction de son utilisation pour le traitement des semences, l'application au sol (en granulés) et le traitement foliaire des végétaux, y compris les céréales. Ceci à compter du premier décembre 2013 (INRAA, 2013).

Plusieurs études expérimentales ont confirmées l'implication de l'IMI dans l'apparition des lésions tissulaires, des irritations gastro-intestinales, des symptômes neurologiques et même la mort de l'animal (Bhardwaj et al., 2010 ; Yeh et al., 2010 ; Kapoor et al., 2011). Ainsi, le groupe de Bhardwaj en 2010, a considéré les 10 mg/kg/jour d'IMI comme une dose sans effet observable chez les rates albinos.

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

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

I.1. GENERALITES SUR L'IMIDACLOPRIDE

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

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

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

I.1.1. Mode d'action

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

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

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

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

I.2. PROFIL TOXICOLOGIQUE DE L'IMIDACLOPRIDE

I.2.1. Pharmacocinétique

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

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

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

L'injection par voie intraveineuse de 20 mg/kg d'IMI marqué au C¹⁴ a aussi mis en évidence une augmentation de la radioactivité dans le foie, les reins, les muscles, les glandes (surrénales, thyroïde et salivaire) et le tissu conjonctif de la peau et la moelle épinière (Klein, 1987). La radioactivité a également été dosée dans le système nerveux central, ce qui indique que l'imidaclopride et ses métabolites ont pénétré la barrière hémato-encéphalique (Klein, 1987).

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

I.2.2. Toxicité aiguë

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

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

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

I.2.3. Toxicité subchronique

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

I.2.4. Toxicité chronique

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

Chez le chien, La consommation alimentaire a diminué de 9-14% chez les femelles traitées accompagnée d'une élévation du taux de cholestérol plasmatique et une augmentation du poids relatif du foie et du cerveau. Des tremblements violents et des changements morphologiques du foie et de la thyroïde ont aussi été rapportés (Allen et *al.*, 1989).

I.2.5. Génotoxicité et oncotoxicité

L'imidaclopride semble induire d'éventuelles oncotoxicité et tératogénicité chez le rat (CDPR, 2011). L'étude de l'exposition subchronique de l'IMI à faibles doses sur des lapins a révélé son effet génotoxique sur les lymphocytes mais aucune différence significative n'a été observée sur la fréquence des micronoyaux (Polychronis et *al.*, 2012).

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

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

I.2.6. Toxicité sur la reproduction

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

I.2.7. Immunotoxicité développementale

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

I.2.8. Neurotoxicité

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

I.2.9. Ecotoxicité

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

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

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

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

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

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

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

A une dose plus importante (à raison de 20 mg/kg/j pendant 90 jours), l'imidaclopride a induit une augmentation des poids du foie, des reins, des surrénales, une diminution du poids des ovaires, une nécrose des cellules de Purkinji, des hépatocytes, une dégénérescence des glomérules rénaux et des modifications morpho-pathologiques au niveau des follicules ovariens (Bhardwaj et *al.*, 2010 ; Kapoor et *al.*, 2011).

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

Najafi et *al.* (2010) ont également mentionné une atrophie des tubules séminifères, une réduction de la mobilité des spermatozoïdes et même un arrêt de la spermatogénèse à des doses de 7 et 14mg/kg/j.

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

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

II.1. MATERIEL

II.1.1. Animaux et régime

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

II.1.2. Insecticide

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

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

II.1.2.1. Première dose

A partir de la DL50 qui est de 440 mg/Kg/jour chez le rat Wistar (LARAMEE, 2007), nous avons calculé la première dose, qui est de 1/85 DL50 d'IMI :

$$\begin{array}{l} \text{DL50} \longrightarrow 440 \text{ mg/Kg} \\ 1/85 \text{ DL50} \longrightarrow X_1 \end{array} \quad X_1 = \frac{440}{85} = 5,176 \text{ mg/kg}$$

$$X_1 = 1/85 \text{ DL50 IMI} = 5,176 \text{ mg/Kg}$$

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

$$\begin{array}{l} 200 \text{ mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 5,176 \text{ mg} \longrightarrow X_1' \end{array} \quad X_1' = \frac{5,176 \times 1}{200} = 0,02588 \text{ ml}$$

$$X_1' = \text{volume de } 1/85 \text{ DL50 IMI} = 0,02588 \text{ ml}$$

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

Exemple : Si le poids corporel est de 182g la dose administrée sera par conséquent :

$$\begin{array}{l} 0,02588 \text{ ml} \longrightarrow 1000 \text{ g} \\ X_1'' \longrightarrow 182 \text{ g} \end{array} \quad X_1'' = \frac{182 \times 0,02588}{1000} = 0,0117 \text{ ml}$$

$$X_1'' = \text{volume } 1/85 \text{ DL50 IMI administré} = 0,00471 \text{ ml}$$

II.1.2.2. Deuxième dose

La deuxième dose est de 1/120 DL50 IMI :

$$\begin{array}{l} \text{DL50} \longrightarrow 440 \text{ mg/Kg} \\ \text{1/120 DL50} \longrightarrow X_2 \end{array} \qquad X_2 = \frac{440 \times 1}{120} = 3,666 \text{ mg/Kg}$$

$$X_2 = 1/120 \text{ DL50 IMI} = 3,666 \text{ mg/Kg}$$

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

$$\begin{array}{l} 200\text{mg} \longrightarrow 1 \text{ ml} \\ 3,666 \text{ mg} \longrightarrow X_1' \end{array} \qquad X_1' = \frac{3,666 \times 1}{200} = 0,01833 \text{ ml}$$

$$X_2 = \text{volume } 1/120 \text{ DL50 IMI} = 0,01833 \text{ ml}$$

II.1.3. Appareillage et réactifs (annexe 1)

II.2. METHODES

II.2.1. Expérimentation

La répartition des rats utilisés au cours de l'expérimentation est illustrée dans le tableau suivant :

Tableau II : Répartition des lots de rats au cours de l'expérimentation

Lots	Effectif	Dose	Administration	Durée	Alimentation
n°1	5	Eau distillée			Eau et
n°2	10	1/85 DL50 d'IMI	Voie orale (gavage)	30 jours	nourriture "ad libitum"
n°3	7	1/120 DL50 d'IMI			

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

II.2.2. Sacrifice des animaux

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

II.2.3. Prélèvement des échantillons

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

La rate et les glandes surrénales sont rapidement prélevées, dégraissées, pesées et placées dans un liquide fixateur « le Bouin aqueux » afin de chercher ultérieurement les altérations structurales.

II.2.4. Détermination du taux de Cortisol

- Principe

200 µl du plasma ont servi au dosage du cortisol pour chaque rat. Le dosage est effectué par une méthode radio-immunologique à l'aide des kits CIS, CORT-RIACT.

Le dosage quantitatif de cette hormone est basé sur le principe de la compétition. L'hormone est marquée à l'iode 125. L'anticorps est préalablement fixé à la paroi des tubes. L'hormone à doser (échantillon ou standard) et l'hormone marquée (traceur) sont ajoutées simultanément aux tubes renfermant les anticorps. Après homogénéisation et incubation, la fraction libre est séparée par aspiration. La fraction liée attachée à la paroi des tubes est mesurée à l'aide d'un compteur gamma relié à un ordinateur. Elle est inversement proportionnelle aux taux de l'hormone ajoutée (échantillon ou standard). La concentration en hormone de l'échantillon est donnée directement en pg/ml (Figure 1).

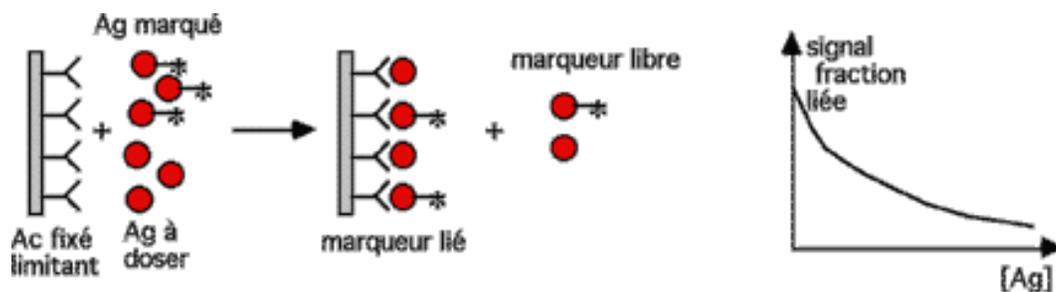


Figure 1: Principe du test de compétition (Jaussaud, 1996).

II.2.5. Etude histologique (GABE, 1961)

II.2.5.1. Fixation et rinçage

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

II.2.5.2. Déshydratation et éclaircissement

Les pièces sont imprégnées dans sept bains d'alcool éthylique à concentration croissante :

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

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

II.2.5.3. Imprégnation

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

II.2.5.4. Inclusion et mise en bloc

L'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :

- Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques.
- Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine.
- Placement des cassettes, sur lesquelles est inscrit l'état de l'organe de l'animal et son sexe.
- Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 7 minutes.

II.2.5.5. Confection des coupes

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

II.2.5.6. Collage des rubans des coupes et leur séchage

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

II.2.5.7. Déparaffinage et hydratation

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer. Les coupes sont passées dans deux bains de xylène pendant 2 minutes chacun. L'hydratation a pour objet de retirer le xylène du tissu et le remplacer par l'eau. Les pièces sont passées dans quatre bains d'éthanol décroissant : 100° ; 96° ; 70° ; 50° d'une durée de quelques secondes chacun. Elles sont enfin lavées à l'eau courante.

II.2.5.8. Coloration

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

- La coloration à hématoxyline-éosine est réalisée selon les étapes suivantes :
 - Coloration à l'hémalum de Hansen pendant 3 minutes.
 - Rinçage à l'eau courante.
 - Un bain d'éosine pendant 30 secondes.
 - Rinçage à l'eau courante.
 - Différencier successivement dans les alcools jusqu'à l'alcool absolu.
 - Passer dans deux bains de xylène.

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

- La coloration au Trichrome de Masson selon Goldner est réalisée comme suit :
 - Coloration par l'hématoxyline de Groat pendant 2 minutes ;
 - Lavage à l'eau courante 5 minutes ;
 - Colorer par le mélange fushine-ponceau 5 secondes ;
 - Rinçage à l'eau acétifiée ;
 - Traitement par l'orange G-acide phosphomolybdique pendant 5 minutes ;
 - Rinçage à l'eau acétifiée ;
 - Coloration par le bleu d'aniline pendant 5 minutes ;
 - Déshydratation par l'alcool absolu, éclaircissement et montage.

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

➤ La coloration à l'azan de Heinenhain :

- Coloration par la solution aqueuse saturée d'azocarmin G préalablement portée à 60° pendant 1 heure;
- Rinçage à l'eau distillée ;
- Différenciation, sous le contrôle du microscope, par l'alcool aniliné;
- Faire séjourner dans l'alcool acétique de 30 secondes à 1 minutes;
- Traitement par l'acide phosphotungstique ;
- Rinçage à l'eau distillée ;
- Traitement par la solution diluée de bleu de Heidenhain de 30 à 60 minutes ;
- Déshydratation par l'alcool absolu, éclaircissement et montage.

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

II.2.5.9. Montage et observation

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

II.2.7. Calculs statistiques

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

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

Le poids relatif des organes est déterminé comme suit :

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

III.1. RESULTATS

La recherche des aspects de la toxicité orale de l'imidaclopride chez les rats femelles adultes de souche Wistar suite à une exposition de 30 jours aux doses de 1/85 DL50 = 5,17 mg/kg et de 1/120 DL50 = 3,66 mg/kg d'imidaclopride a donné les résultats suivants :

III.1.1. Evolution pondérale

III.1.1.1. Poids corporel

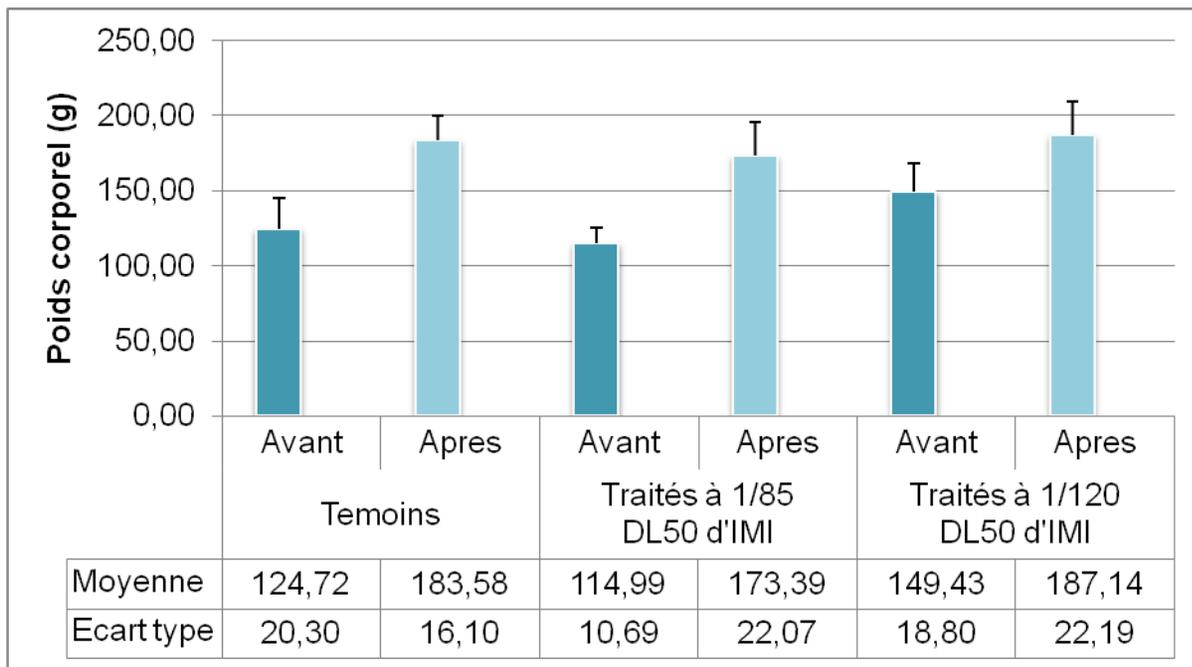


Figure 2 : Evolution du poids corporel chez les rats témoins et traités à l'imidaclopride.

D'après les résultats présentés dans la figure 2 et les tableaux III et IX de l'annexe 2, nous notons une évolution pondérale chez tous les rats traités par rapport aux témoins mais qui reste statistiquement non significative (gain de poids : lot témoin : 47g ; lot 1/85 DL50 IMI : 50g ; lot 1/120 DL50 IMI : 25g).

III.1.1.2. Poids des rates :

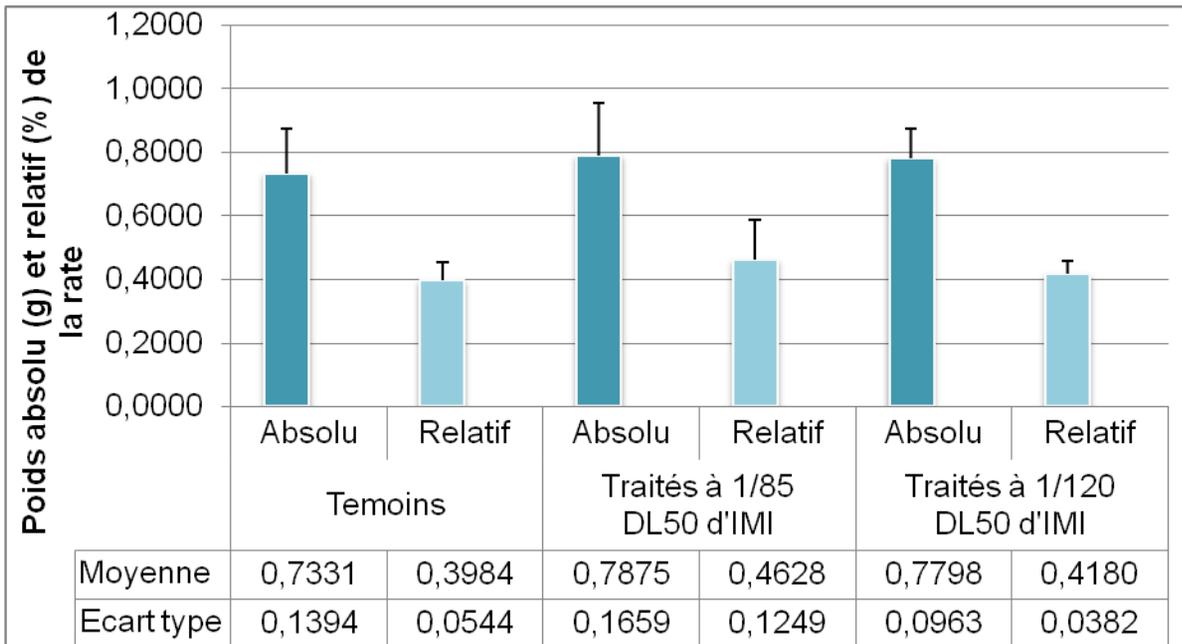


Figure 3 : Valeurs moyennes des poids absolu (g) et relatif (%) des rates chez les rats femelles témoins et traités à l'imidaclopride

Le poids absolu des rates semble connaître une augmentation chez les rats traités à l'IMI. Comparé aux poids des rates du lot témoin, cette élévation reste du point de vue statistique non significative (confirmée dans les tableaux V et XI de l'annexe 2).

III.1.1.3. Poids des surrénales :

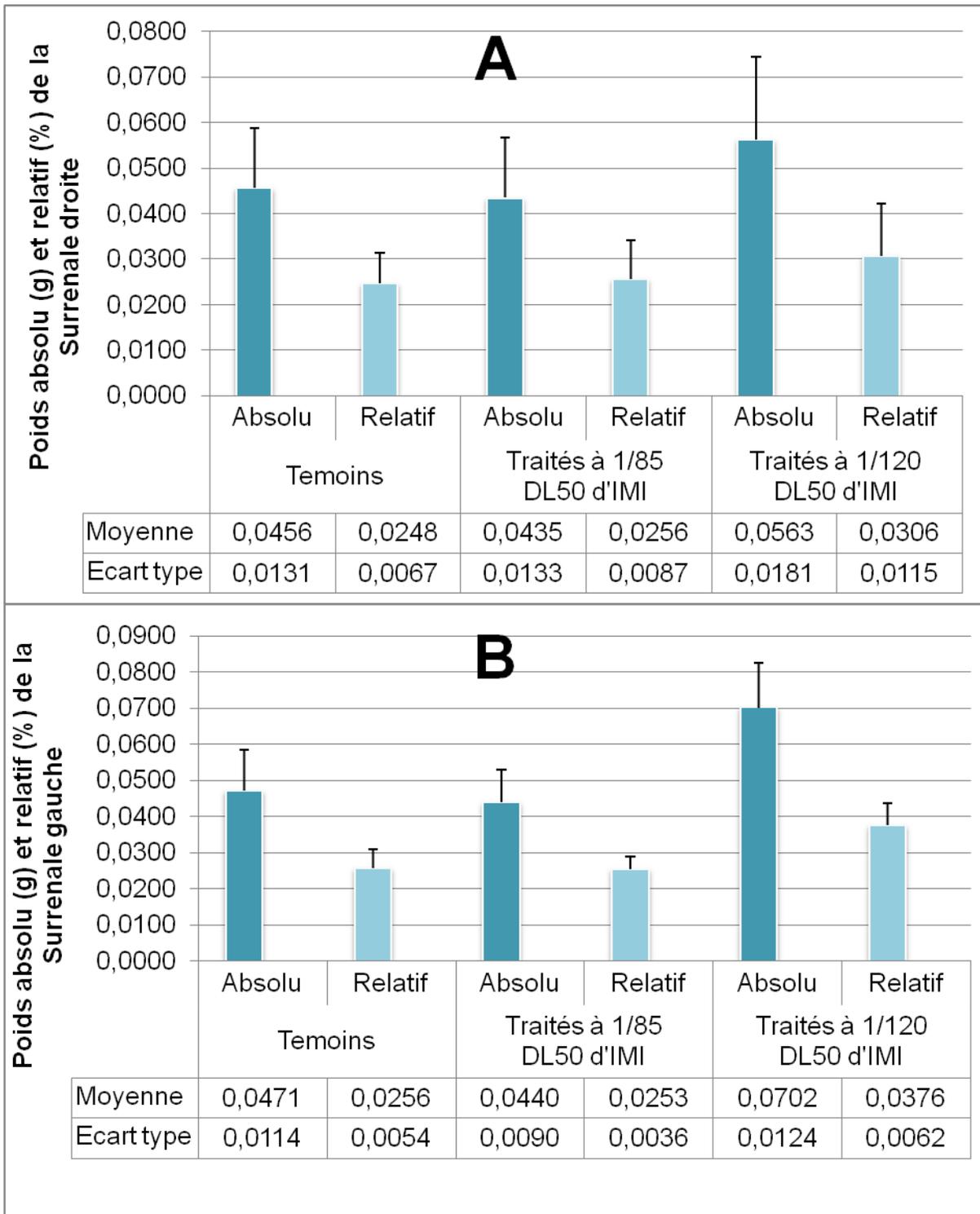


Figure 4 : Valeurs moyennes des poids absolu (g) et relatif (%) des surrénales droites (A) et des surrénales gauches (B) chez les rats témoins et traités à l'imidaclopride

Les résultats illustrés dans les tableaux VI, VII, XII et XIII de l'annexe 2 ainsi que la figure 4 montrent une régression des poids absolus et relatifs des surrénales droites (4.A) et gauches (4.B) chez les rats traités à 1/85 DL50 d'IMI. Cette diminution est jugée statistiquement non significative. Alors qu'un accroissement des poids absolus et relatifs est enregistré chez les lots traités par 1/120 DL50 d'IMI. Cette augmentation est du point de vue statistique non significative concernant la surrénales droites et très significative lorsqu'il s'agit des surrénales gauches (Tableaux VI, VII, XII et XIII de l'annexe 2).

III.1.2. Profil hormonal

Dosage du cortisol plasmatique

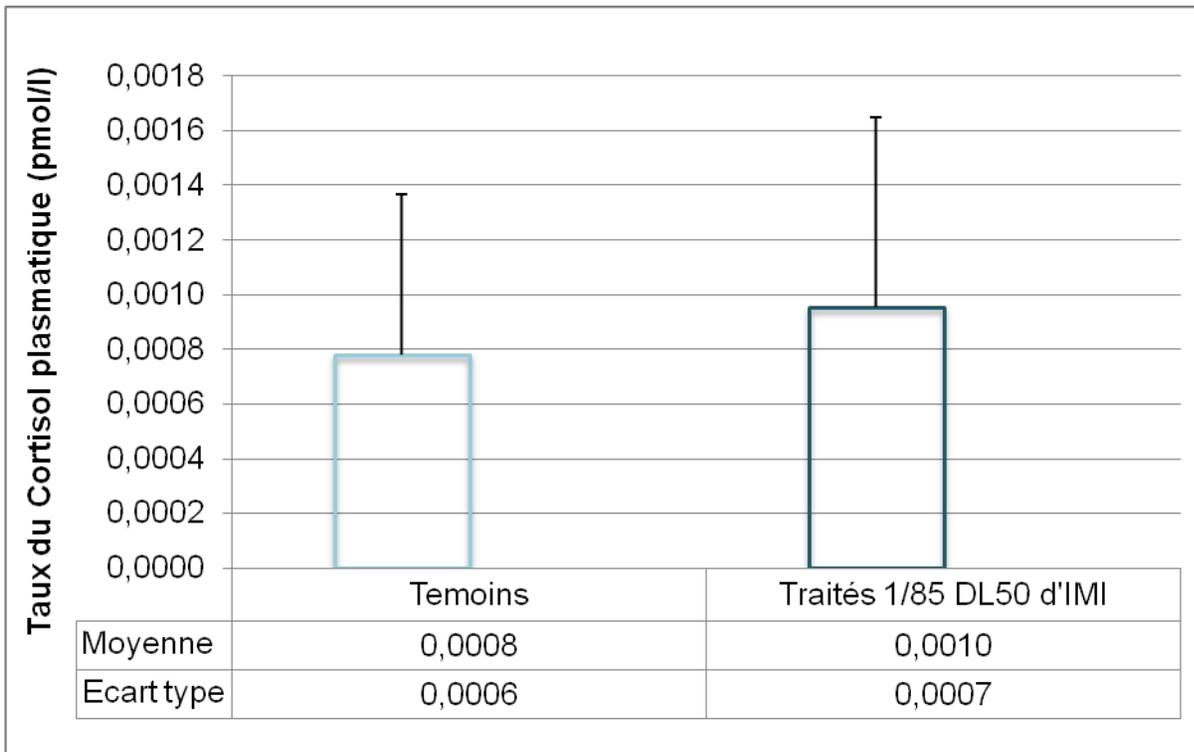


Figure 5 : Valeurs moyennes de la concentration plasmatique du cortisol chez les rats femelles témoins et traités par 1/85 DL50 d'imidaclopride.

Les résultats révèlent une augmentation de la concentration plasmatique du cortisol chez les rats traités à 1/85 DL50 d'IMI. Selon les tableaux VIII et IV de l'annexe 2, cette modification reste statistiquement non significative.

III.1.3. Histopathologie

III.1.3.1. Rate

III.1.3.1.A. Structure du parenchyme splénique chez les rats témoins

L'observation au microscope optique du parenchyme splénique des rats témoins montre les deux principaux constituants de cet organe que sont la pulpe rouge (PR) et la pulpe blanche (PB). Le tout est entouré d'une capsule (Cap) dense et épaisse à travers laquelle naissent des travées ramifiées qui s'infiltrèrent dans le parenchyme pulpeux (Figure 6a et 6b).

La pulpe rouge formée principalement de capillaires sinusoides (CS) (figure 7 a) constitue un filtre du sang. Alors que la pulpe blanche est représentée par les nodules spléniques ou les corpuscules de Malpighi (Figure 6b ; Figure 7b) et constitue le composant immuno-compétant de la rate.

Chaque nodule splénique (NS), est formée de quatre composants: l'artériole centrale (AC) ; le manchon lymphoïde péri-artériolaire (MLPA) ; une couronne de cellules B et de cellules présentant l'antigène (C) et d'un centre germinatif (CG).

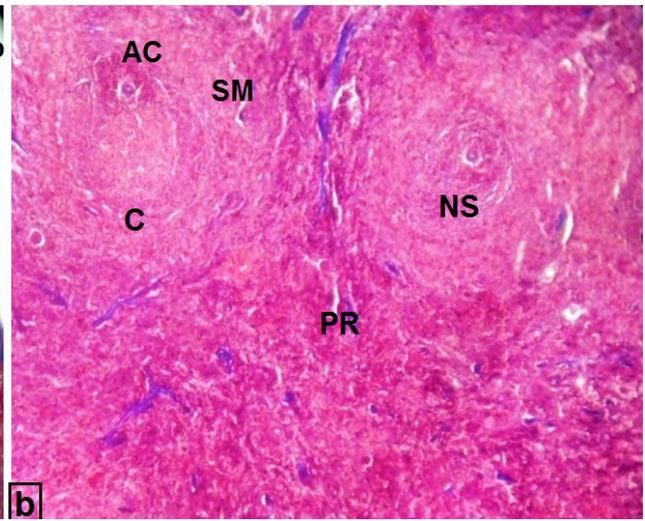
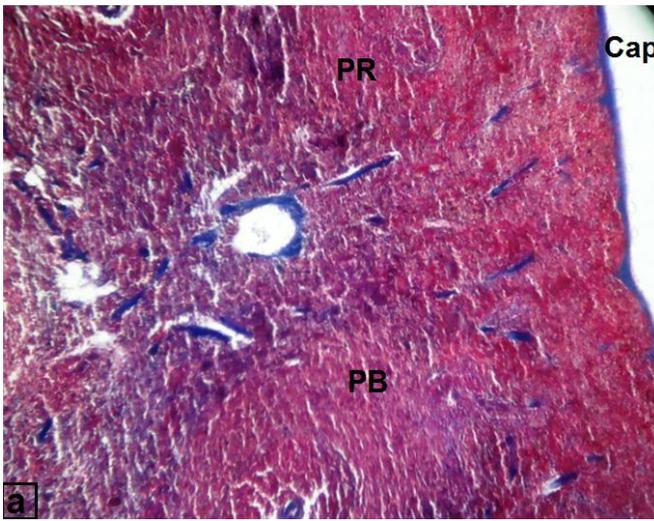
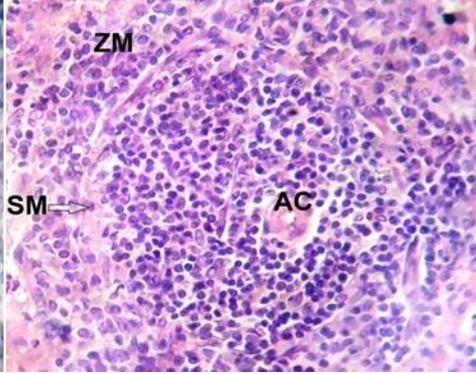
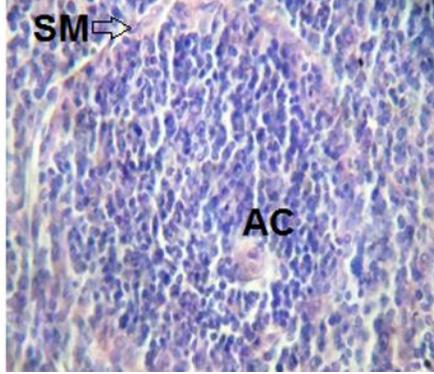
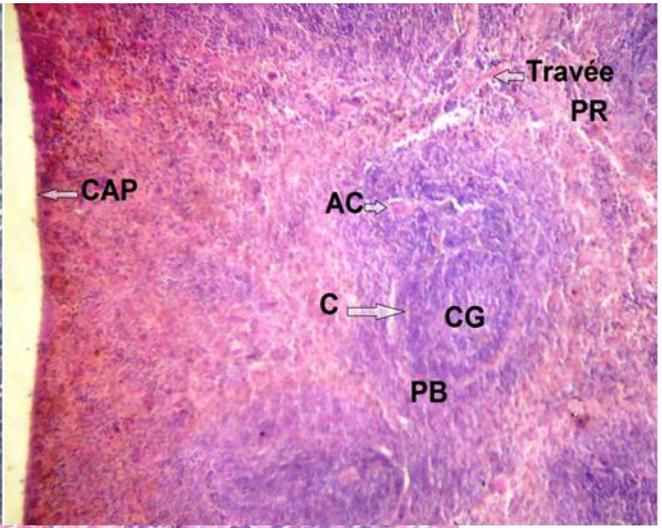
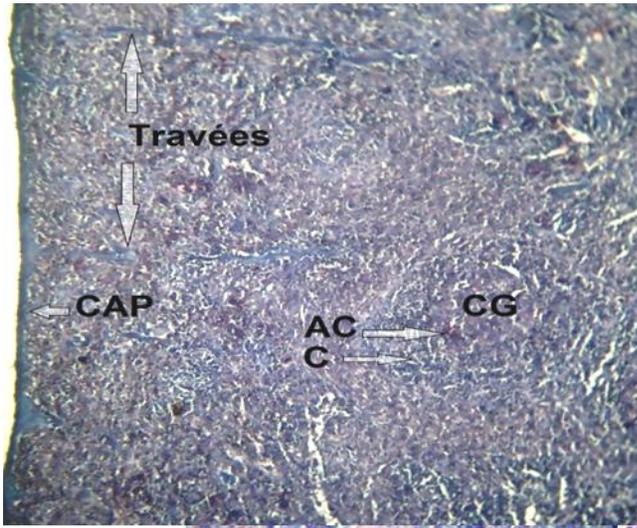
C'est à la zone marginale qu'interagissent la pulpe blanche et la pulpe rouge au niveau des sinus vasculaires (Figure 6c et 6d).

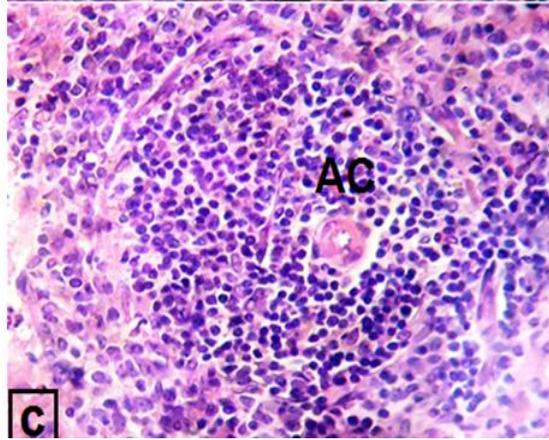
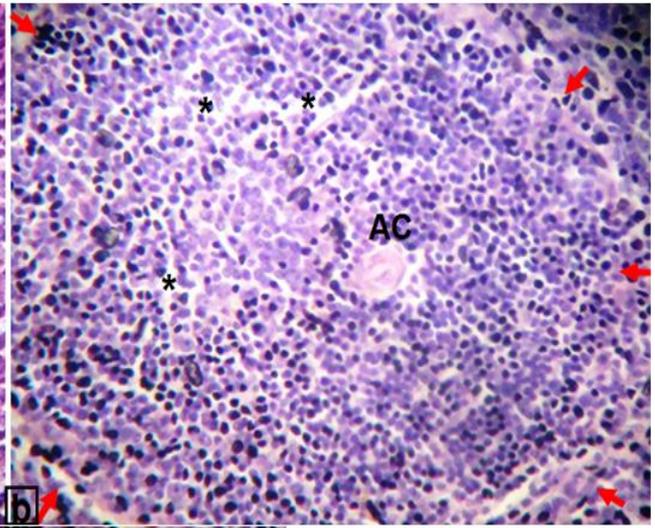
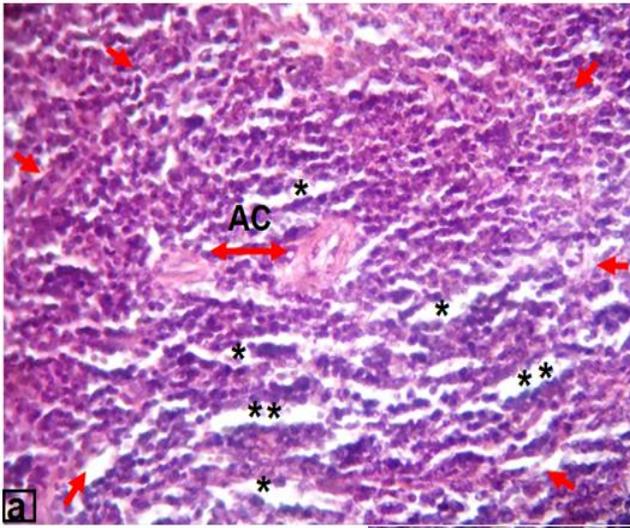
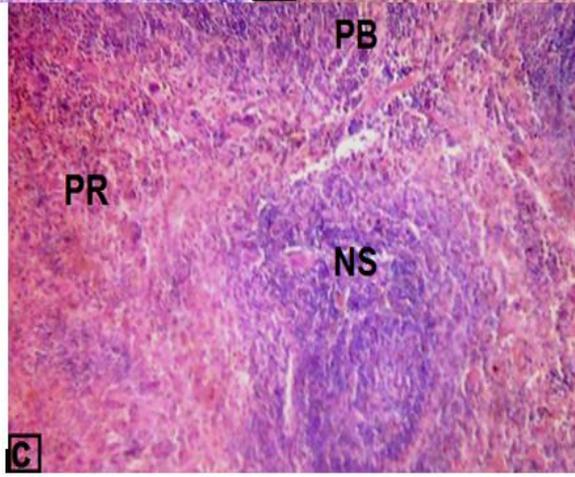
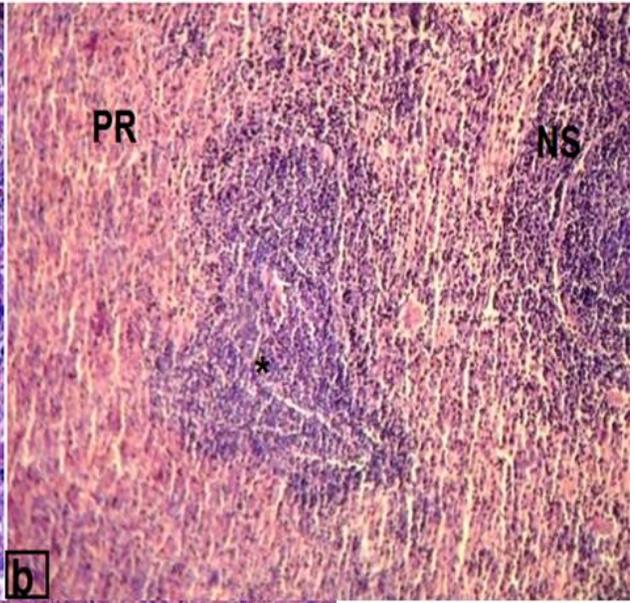
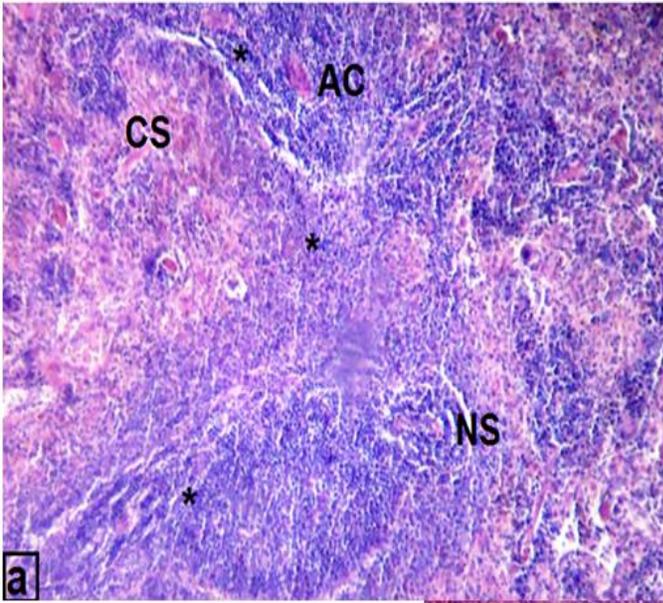
III.1.3.1.B. Structure du parenchyme splénique chez les rats traités

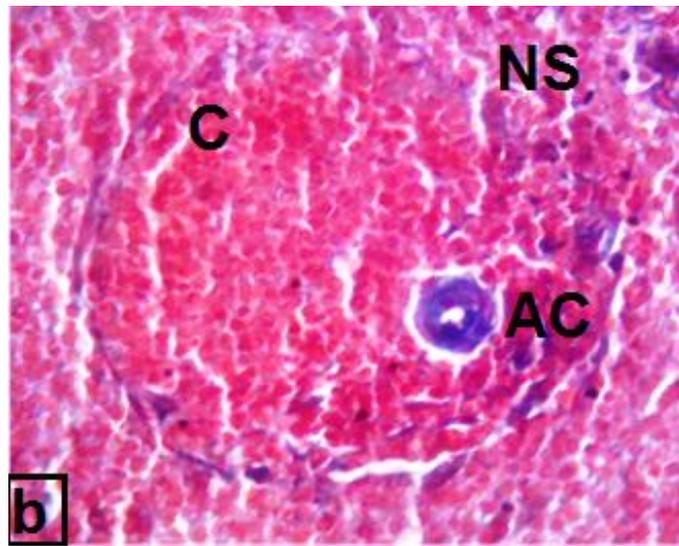
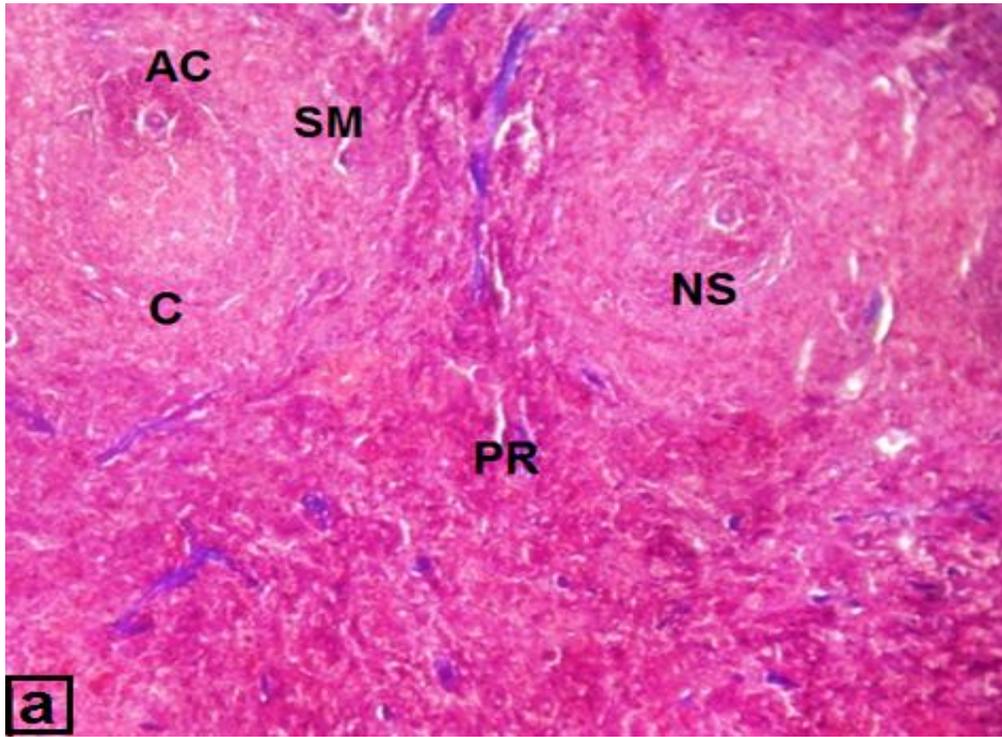
Chez tous les rats traités (1/85 et 1/120 DL50 IMI), les coupes histologiques montrent une hyperplasie de la pulpe blanche. Se manifestant par une augmentation du nombre et du volume des nodules spléniques. Nous notons aussi une fusion de ces follicules (Figure 6b ; Figure 8 ; Figure 10a et Figure 11a).

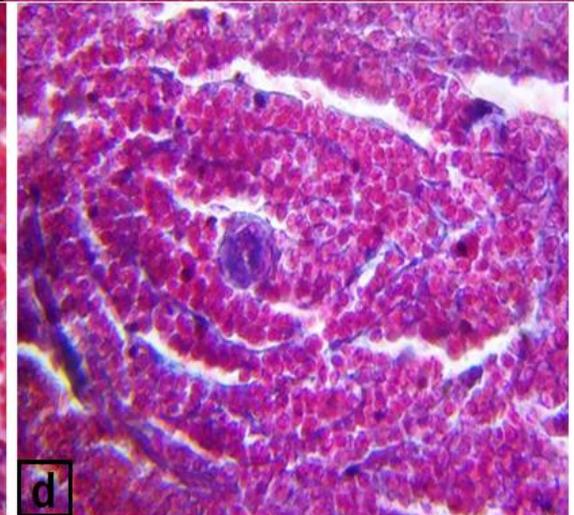
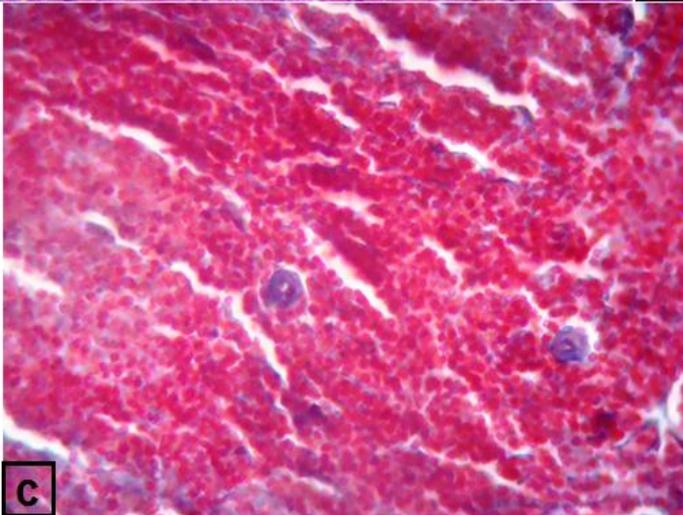
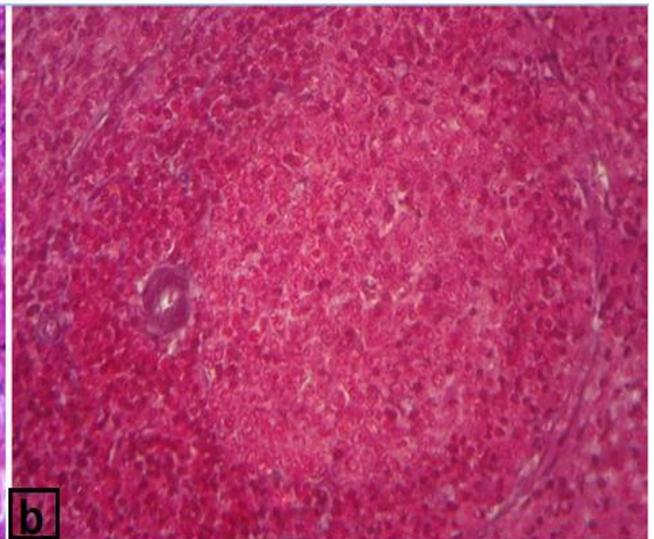
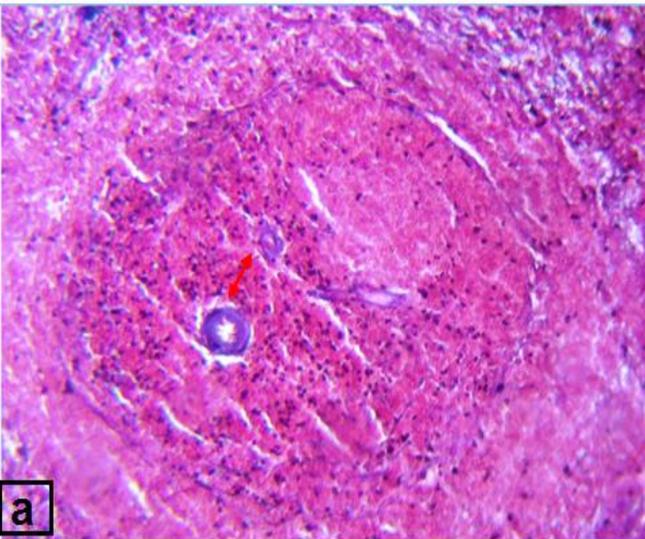
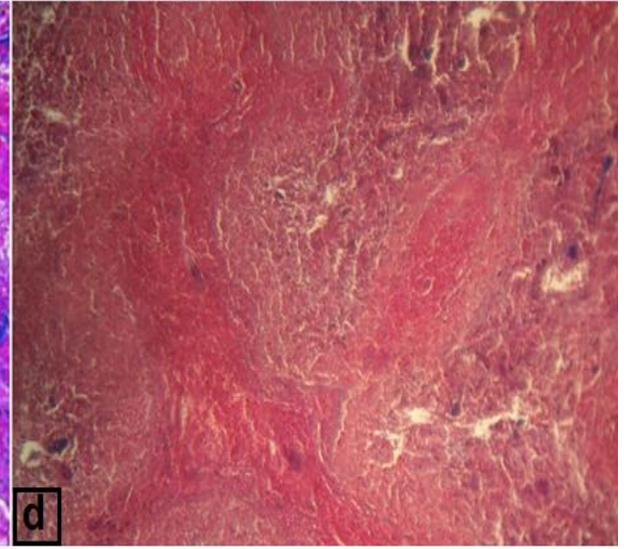
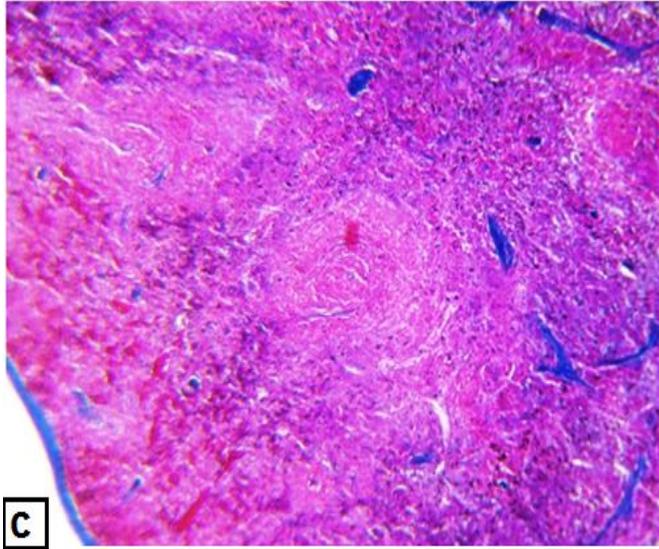
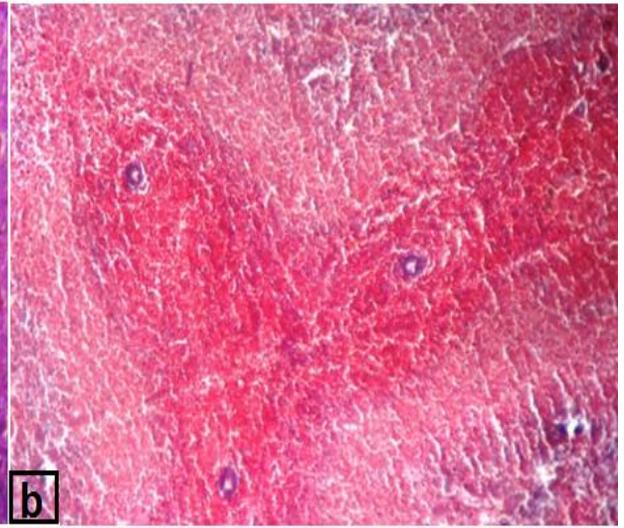
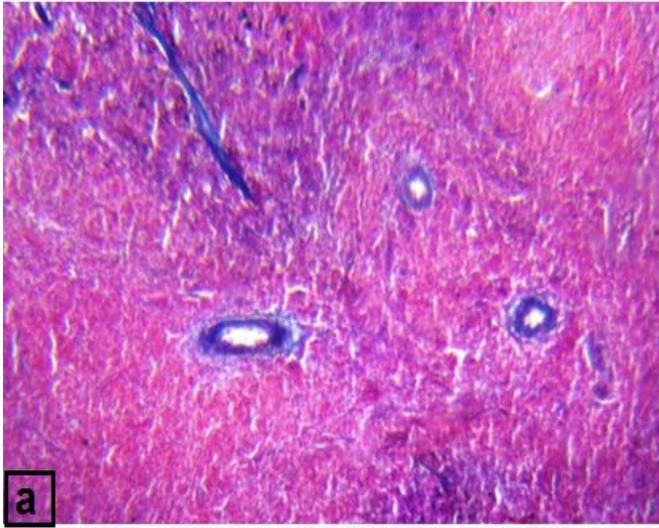
A fort grossissement, nous observons des follicules avec un manteau très épaissi chez les rats traités (Figure 12) comparé aux rats témoins (Figure 10b) ainsi qu'une déplétion lymphocytaire au niveau nodulaire qui semble être dose dépendante puisque celle-ci est plus prononcée chez les rats traités a forte dose (Figure 9 ; Figure12).

Chez les rats traités à 1/85 DL50 IMI on remarque dans certains follicules la présence de deux artérioles (Figure 12).









III.1.3.2. Glandes surrénales

III.1.3.2.A. Structure du parenchyme surrénalien chez des rats témoins

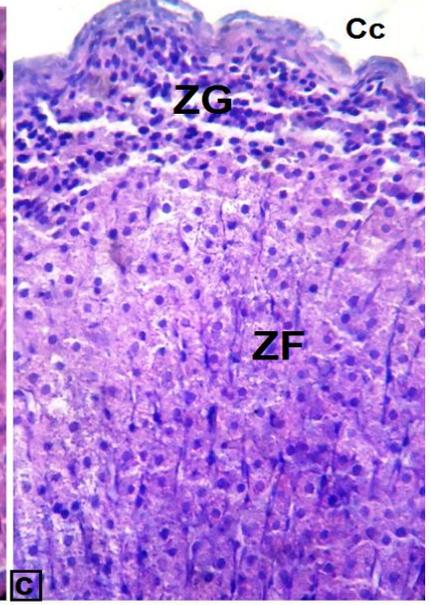
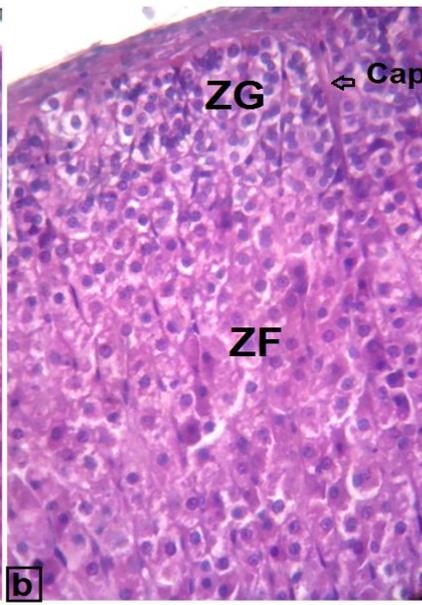
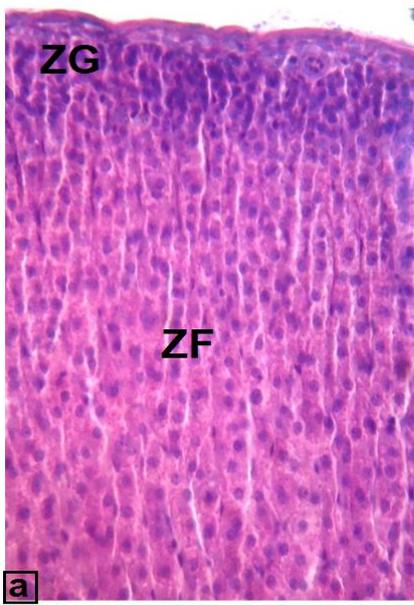
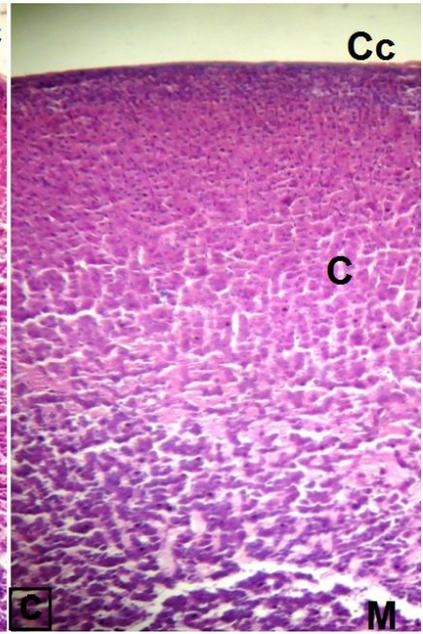
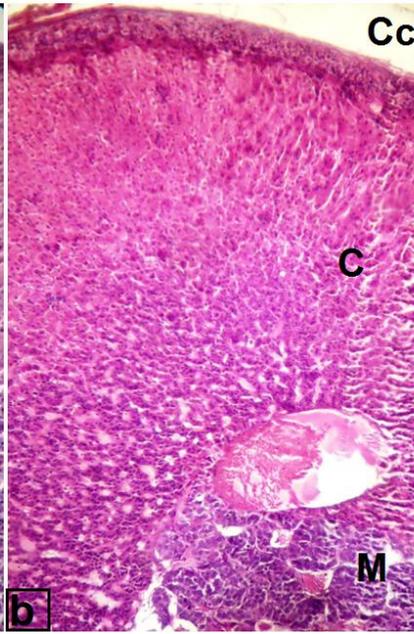
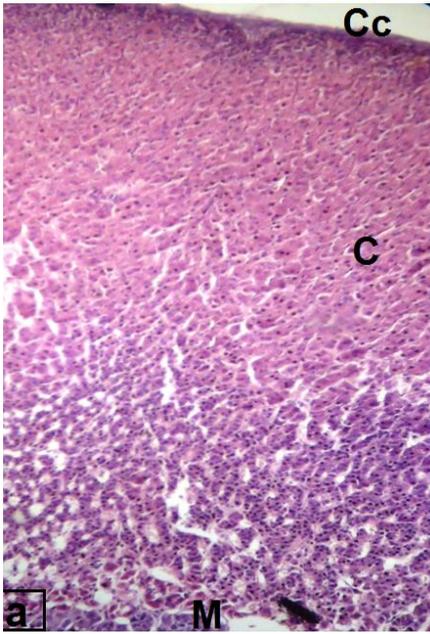
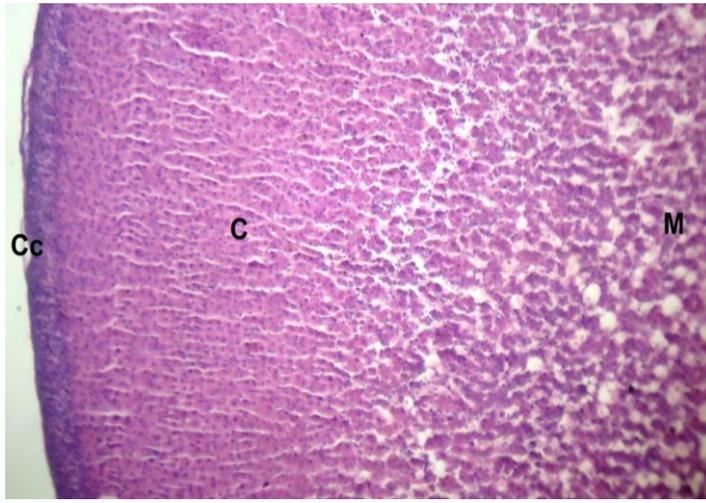
Chez des rats témoins, la glande surrénale apparaît, en microscopie photonique, divisée en un cortex externe et en médulla interne. Une fine capsule fibreuse recouvre la glande. Le cortex surrénalien est constitué de trois zones histologiques distinguées : **la zone glomérulée** (sous-jacente à la capsule), **la zone fasciculée** (médiane) **et la zone réticulée** (interne) (Figures 13 ; Figure 14a).

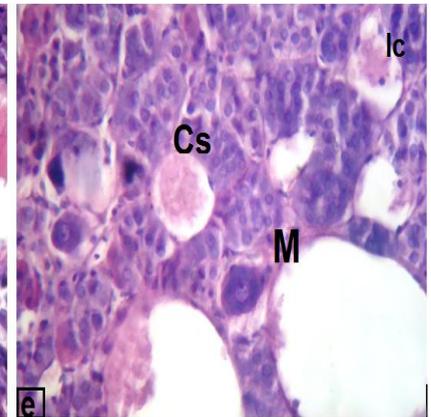
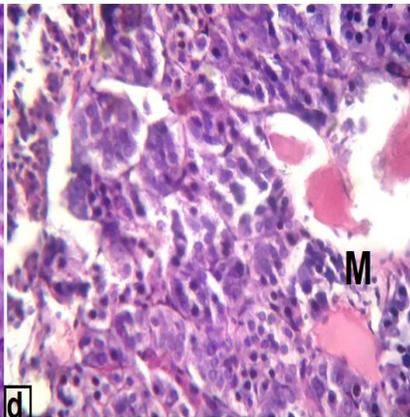
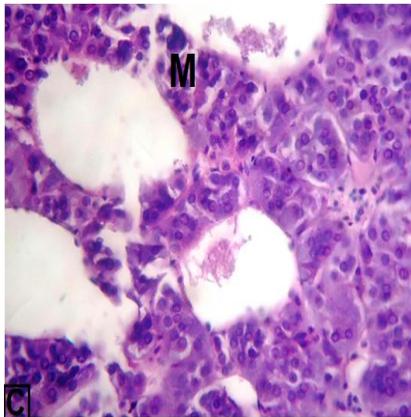
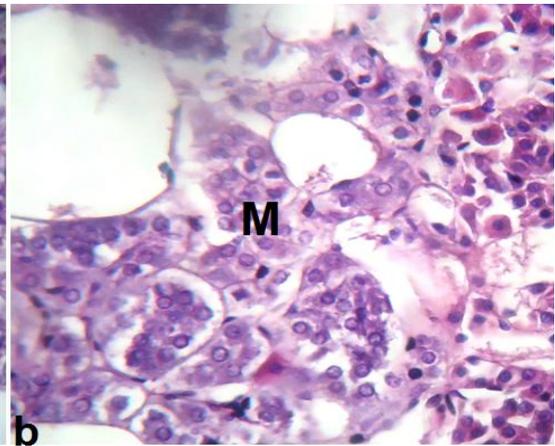
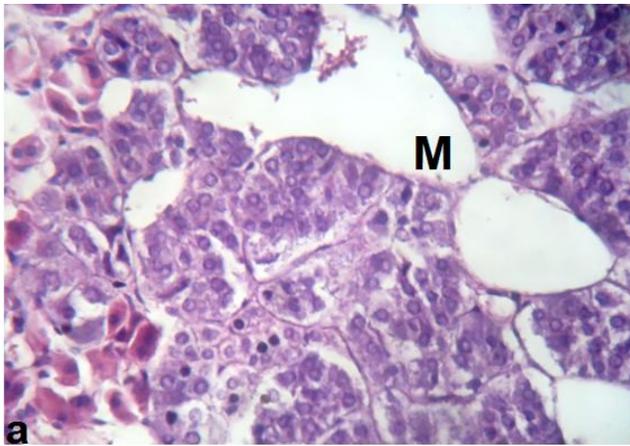
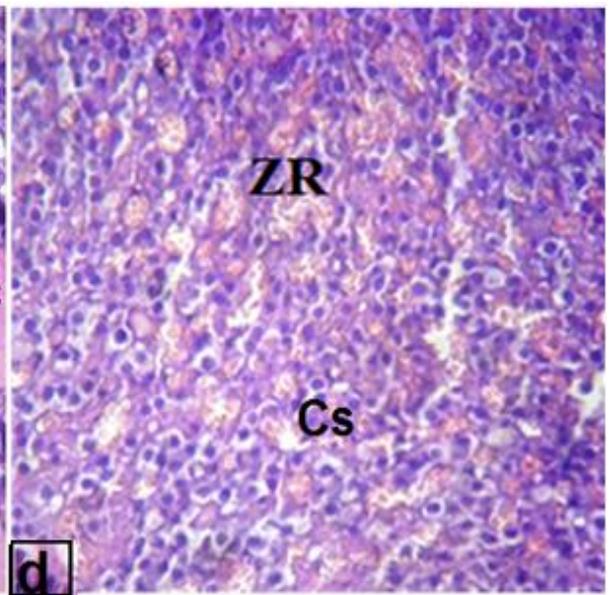
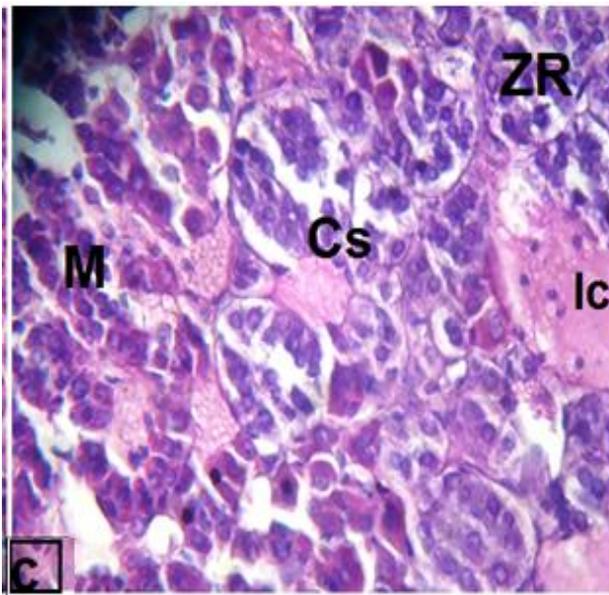
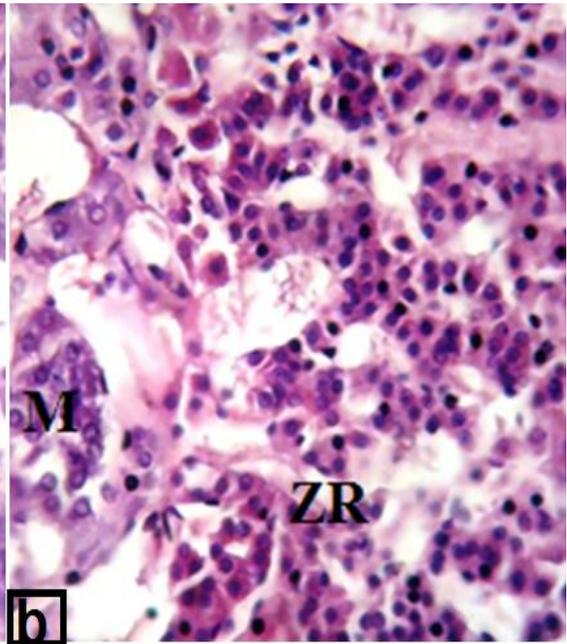
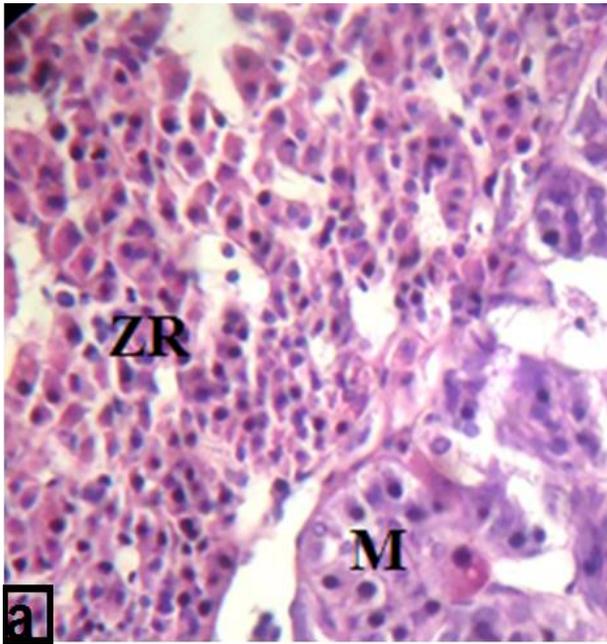
A plus fort grossissement, la zone fasciculée des rats est constituée de cellules polygonales bien délimitées disposées le long de cordons irréguliers et verticales ou en faisceaux parallèles et séparés par des capillaires sinusoïdes réduits. Les noyaux sont centraux de forme arrondie et de taille variables (Figure 16a; Figure 16a et 16b).

III.1.3.1.B. Structure du parenchyme surrénalien chez les rats traités à l'imidaclopride

A fort grossissement, il n'apparaît aucune perturbation de la structure générale de la zone glomérulée et fasciculée du cortex surrénalien chez les rats traités. En effet, les cellules de la zone glomérulée se disposent en amas irréguliers. Alors que les cellules de la zone fasciculée s'arrogent en cordon étroits séparés par de fines travées de tissu conjonctif contenant des capillaires sinusoïdes (Figure 15).

Une dilatation des capillaires sinusoïdes de la zone réticulée et des veines de la médulla ainsi qu'une congestion locale sont observés chez tous les rats traités à l'IMI. Nous notons aussi une légère infiltration cellulaire au niveau de médulla (Figure 16, Figure 17).





III.2.DISCUSSION

L'utilisation des néonicotinoïdes, tel que l'imidaclopride, est bien connue sur les insectes. Cet insecticide interagit d'une façon spécifique aux récepteurs de l'acétyl choline (nAChR) et devient ainsi neurotoxique (Yamamoto et Casida, 1999 ; Azevedo- Pereira et al., 2011). Plusieurs études toxicologiques ont mis en évidence des effets toxiques de l'imidaclopride chez les mammifères tels que les rats femelles. Sa toxicité perturbe certains paramètres biochimiques et cause des altérations morphofonctionnelles des organes vitaux comme le foie et les reins (Shadnia et Hassanina, 2008 ; Bhardwaj et al., 2010 ; ALOK et al., 2013 ; Kapoor et al., 2011).

La présente étude porte sur la recherche des effets de toxicité orale d'imidaclopride à 1/85 et 1/120 DL50 afin de rechercher la dose sans effets observables (NOEL) sur la rate et la glande surrénale chez les rates de souche wistar.

Les traitements appliqués ne présentent aucun signe de toxicité sur l'évolution pondérale des rates traitées. En effet, une augmentation statistiquement significative est enregistrée chez tous les groupes. Les mêmes résultats sont notés par Benmoussa et al. (2012), Boukersi (2012) et Boudegzdem (2012) qui indiquent une croissance normale des rats traités à 5, 10, 20 et 30 mg/kg/j d'insecticide pendant 30 et 85 jours. Cette croissance pondérale peut être en rapport avec la sédentarité et à la disponibilité de l'alimentation d'une façon *ad-libitum*.

Nos résultats n'indiquent aussi aucun changement significatif des poids absolu et relatif des rates. Cependant, En effet, le traitement à 1/85 DL50 d'IMI a induit une régression non significative des poids des surrénales droites et gauches. Bhardwaj et al. (2010) ont mis en évidence une perte des poids des surrénales, lors d'un traitement de 90 jours aux doses de 5, 10 et 20 mg/kg/j d'IMI chez les rates.

Au contraire, le traitement à 1/120 a induit une augmentation non significative des poids des surrénales droites et très significative des poids des surrénales gauche. Une augmentation significative de la masse relative des poumons est signalée chez des rates traitées par IMI à raison de 1/85 (Arkam, 2013). Plusieurs auteurs expliquent cette augmentation par une congestion sanguine des veines médullaire (Kara, 2008). Alors que Tuli et al., (1995), a expliqué l'augmentation du poids des surrénales au cours d'une situation de stress par la forte stimulation des glandes surrénales qui engendre une hypertrophie surrénalienne.

Notre étude a mis en évidence des altérations structurales plus ou moins importantes chez tous les rats traités. Au niveau de la rate, les altérations se manifestent par une hypertrophie de la pulpe blanche accompagnée d'une augmentation apparente du nombre et du volume des follicules spléniques. Nous avons aussi observé une fusion de plusieurs follicules spléniques en conséquence à l'hypertrophie de la pulpe blanche. Ainsi qu'une déplétion lymphocytaire qui apparaît plus importante chez les rats traités à 1/85. Cette déplétion a signalé chez des rats exposés pendant 30 jours à un traitement oral de 1/100 DL50 d'IMI (Mohany et al., 2011).

Mohany et *al.* (2011) et Balani et *al.* (2008) ont également observé la présence d'agrégats de cellules pycnotiques et une rupture des artéριοles centrales au sein de la pulpe blanche. Alors qu'au niveau de la pulpe rouge, une augmentation du nombre de macrophages et de neutrophiles est notée.

La glande surrénale est modérément affectée par le traitement à l'imidaclopride. Nous constatons une dilatation des capillaires sinusoides au niveau de la zone réticulée du cortex surrénalien et des veines de la médulla, des congestions sanguines ainsi que des légères infiltrations. Ces observations font signe d'une réaction inflammatoire. Des résultats similaires sont enregistrés par Mensour (2012).

Le dosage du cortisol chez le seul groupe traité à 1/85 DL50, a montré une légère augmentation qui reste statistiquement non significative. Contrairement à ce trouvé par Mensour (2012) qui explique la diminution significative des taux plasmatiques en cortisol par la déplétion vésiculaire au niveau des cellules fasciculées due à l'utilisation du cholestérol.

Il est bien établi que l'hormone adrénocorticotrope exerce une action trophique vis-à-vis le cortex surrénalien et une activation prolongée au cours d'un stress entraînant une hypertrophie des glandes (Claire, 2006). Cela nous laisse suggérer que le traitement à l'IMI peut présenter un facteur de stress chez les rates.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude des effets de l'ingestion de l'imidaclopride durant 30 jours menée sur les rats femelles montrent clairement qu'il entraîne des modifications morphofonctionnelles de la rate et de la glande surrénale et ceci même à faible dose (1/85 et 1/120 DL50 d'IMI). En effet, nous avons observé :

- Une hypertrophie de la pulpe blanche splénique,
- Une augmentation de la taille des follicules spléniques
- Une dilatation des capillaires sinusoides de la zone réticulée et des veines de la médulla ainsi qu'une congestion aux mêmes niveaux.
- Une augmentation non significative du taux de cortisol plasmatique.

Dans le but d'approfondir nos recherches, il serait constructif d'étudier les aspects cellulaire et moléculaire de l'inflammation induite par cet insecticide et d'explorer sa toxicité à long terme (>30jour) avec un effectif plus important, sur plusieurs générations et chez le rat male. Ceci permettrait de confirmer les résultats obtenus et d'explorer l'effet de l'imidaclopride sur l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroidien et hypophyso-surrénalien et gonadique.

Il serait judicieux d'aviser les autorités et les agriculteurs sur les effets toxiques de cet insecticide sur l'environnement et sur la santé humaine et animale. Cela afin de mettre en œuvre une stratégie de restriction et de contrôle de son utilisation et d'encourager l'utilisation de bio-insectides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGARWAL,R. and SRINIVAS,R. Severe neuropsychiatric manifestations and rhabdomyolysis in a patient with imidacloprid poisoning. *Am J Emerg Med.* 25. Pages :844–845.

AGOUD,D. 2013: Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique et chronique d'imidaclopride sur le foie chez les rats femelles de souche wistar. *Thèse de Magister, ENS., Kouba, Alger, 80p*

ALLEN, T.R., FREI, TH., LUETKEMEIER, H., VOGEL, O., BIEDERMANN, K. AND WILSON, J. 1989. 52-Week Oral Toxicity (Feeding) Study with NTN 33893 Technical in the Dog. RCC, Research and Consulting Company AG. Itingen, Switzerland. Study No. 100015. DPR Vol. 51950-0013 # 119478.

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

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

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

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

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

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

AZVEDO P.H., LEMONS M, and SOARES A.,2011. Effects of imidacloprid exposure on *chironomus riparius meigen* larvae. Linking acetylcholinesterase activity to behavior. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 74: 1210-1215.

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

BALANI,T. AGGARWAL, A.M.M. Thaker, Hematological and biochemical changes due to short term oral administration of imidacloprid, *Toxicol. Int.* 18 (1).Page: 2–4.

- BALANI et al,2008.** *Journal of Veterinary Pharmacology and Toxicology*.Vol.7.Issue 1-2. Pages: 27-30
- BENMOUSSA ,F., TEBEL, I.K. et BENHALFA, A. 2012.** Recherche des aspects de la toxicité orale d'imidaclopride sur la glande surrénale chez les rats femelles de souche wistar. *Memoire de fin d'étude*.ENS KOUBA
- BHARDWAJ,S. SRIVASTAVA,S.K, KAPOOR,U. ET SRIVASTAVA, L.P. 2010.** A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: Morphological, biochemical and histopathological evaluations.*Food and Chemical Toxicology* .48. Pages: 1185–1190.
- BOMANN, R. 1989a.** NTN 33893. Study for Acute Oral Toxicity to Mice. Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany. Study No. 100039. DPR Vol. 51950-0003 # 119462.
- BOMANN, R. 1989b.** Study for Acute Oral Toxicity to Rats. Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany. Study No. 100040.
- BOMHARD, E. AND RINKE, M. 1994.** Frequency of spontaneous tumours in Wistar rats in 2-year studies. *Exp. Toxicol. Pathol.* 46:17-29
- BOUDEGZDEM,N.2012.** Recherche des aspects de la toxicité orale subchronique et chronique d'imidaclopride sur la thyroïde des rats femelles de souche wistar. *Thèse de Magister, ENS., Kouba, Alger, 76p*
- BOUKENOU, K. ET MAHBOUBI, Y. 2010.,** Recherche des aspects de la toxicité orale d'une dose supplémentaire d'imidaclopride et l'effet de *Lavandula stoechas* chez les rats adultes de souche wistar. *Mémoire d'ingénieur, USDB*
- BOUKERSI, H. 2012.** Recherche d'indices d'inflammation subchronique et chronique chez les rats femelles de souche wistar traités à l'imidaclopride. *Thèse de Magister, ENS., Kouba, Alger, 80p.*
- BRUNET, J-L., MARESA, M., FANTINI, J. AND BELZUNCES, L. 2004.** Human Intestinal Absorption of Imidacloprid with Caco-2 cells as Enterocyte Model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194:1-9.
- BUCKINGHAM SD, LAPIED B, CORRONC HL, GROLLEAU F, SATTELLE DB.1997.** Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Exp Biol.* 200:2685–92.
- CLAIRE, A. et BRISVILLE, M. 2006.** Les marqueurs du stress chez les bovins issus de clonage somatique. Thèse de doctorat. École nationale vétérinaire d'Alfort, 40-63.
- CDPR.2011.** California Department of Pesticide Regulation. Database entry for Bayer Advanced LawnSeason-Long Grub Control Ready-to-Use,
- CHAO, S.L. et CASIDA, J.E. 1997 :** Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pest. Biochem. Physiol.*, **58** : 77-88.

CHEMHANDBOOK, 2002. Chemelcal handbook.Case reports.32. Page:12.

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

COSTA,C., SILVARI,V., MELCHINI,A., CATANIA,S., HEFFRON,J.J., TROVATO,A. ET DE PASQUALE,R. 2009. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat Res* 672(1). Pages :40-44.

DEMSIA, G. D.,VIASTOS, M.,GOUMENOU, D.P. 2007 :Mathopoulos, Assessment of thegenotoxicity of imidacloprid and metalaxy in culturedhuman lymphocytesand rat bonemarrow. *Mutat. Res.*, **634** :32–39.

DJOUBER,F. 2011. Contribution a l'étude des effets subletaux de l'imidaclopride sur la physiologie des ouvrieres et des reines de l'abeille domestique (*apis mellifera intermissa*). *These de magister.* Universite mouloud mammeri de tizi-ouzou

DUZGUNE,V. et ERDOGAN,S.2012. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 104 . Pages : 58–64

EIBEN, R. 1991. Chronic and Carcinogenicity Studies on Wistar Rats (Administration in Food Over 24 Months). Supplementary MTD Study for Two-Year Study T 1025699. Department of Toxicology. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany. Study No. 101931. DPR Vol. 119473. #51950-0010.

EL-GENDY KS, ALY NM, MAHMOUD FH, KENAWY A, EL-SEBAE AK.2010. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food chem. Toxicol.*, 48: 215-221. *Food and Chemical Toxicology.* 105 .Pages : 1–4

FRITZ, R. AND HELLPOINTER, E. 1991. Degradation of pesticides under anaerobic conditions in the system water/sediment: Imidacloprid, NTN 33893.

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

GAWADE,L., SHRUTA,S., DADARKAR,B., HUSAIN,R., GATNE.M. 2013. A detailed study of developmental immunotoxicity of imidacloprid in Wistar rats. *En vironmental toxicology and pharmacology.* 3 5.Pages: 408–418

HARMANDEEP,K.T, GURINDER,K.S and KULDEEP,S.K.2013. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats.

HERBOLD, B.A.1988b. NTN 33893. Test on *S. Cerevisiae* D7 to Evaluate for Induction of Mitotic Recombination. Institute of Toxicology. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany, Study No. 102653. DPR Vol. 51950-0020 # 119509.

HUANG,N.C, LIN,S.L., CHOU,C.H, HUNG,Y.M., CHUNG,H.M., HUANG,S.T. 2006. Fatal ventricular fibrillation in a patient with acute imidacloprid poisoning. *Am J Emerg Med* 24. Pages : 883–885

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

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

KARL, W., KLEIN, O. AND WEBER, H. 1991. [¹⁴C-methylene] Imidacloprid: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism in a Lactating Goat. Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany, Study No. 103819. DPR Vol. 51950-0080 # 120673.

KHALDOUN, N et KERKAR, N. 2010 : Contribution a la recherche des indices de la toxicite chronique d'un insecticide, imidaclopride, avec deux doses différentes chez le rat femelle adultes de souche Wistar. *Mémoire d'ingéniorat*, USDB

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

KLEIN, O. 1987. [¹⁴C]-NTN 33893: Biokinetic Part of the “General Metabolism Study” In the Rat. Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany, Study No. 87265. DPR Vol. 51950-0021 # 119512.

KLEIN, O. 1992. [Methylene-¹⁴C] Imidacloprid: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism in the Liver and Kidney of a Lactating Goat. Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany, Study No. 103819-I. DPR Vol. 51950-0081 # 120673

KLEIN, O. AND BRAUNER, A. 1990. [Methylene¹⁴C]-Imidacloprid: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism in Laying Hens. Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany, Study No. 102607. DPR Vol. 51950-0082 # 120675.

KLEIN, O. AND BRAUNER, A. 1991A. [Imidazolidine Methylene¹⁴C]-Imidacloprid: Investigation on the Biokinetic Behavior and Metabolism in the Rat. Bayer AG. Leverkusen-Bayerwerk, Germany, Study No. 102617. DPR Vol. 51950-0021 # 119513.

LARAMEE,S.2007 .L'abeille domestique comme bio-indicateur ecotoxicologique de polluant, le cas de l'insecticide imidaclopride . centre apicole de recherche et d'information, université catholique de louvain, louvain –la –neuve , Belgique .,15

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

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

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

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

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

MEISTER RT (1995). Farm chemicals handbook 95. Meister Publishing Company, Willoughby, OH, USA

MENCKE, N., JESCHKE, P. 2002 :Therapy and prevention of parasiticinsects in veterinarymedicineusingimidacloprid. *Curr. Top. Med. Chem.*,**2** : 701–715.

MENSOUR,S. 2012. Contribution a la recherche des effets de deux doses d'imidaclopride sur la structure des glandes surrenales chez des rats de souche wistar. *Thèse de Master.* USDB

MOHAMED,F., GAWARAMMANA,I., ROBERTSON,T.A., ROBERTS,MS., PALANGASINGHE,C. and ZAWAHIR,S. 2009.Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *journal.pone.0005127*

MOHANY,M., BADR,G., REFAAT,I. AND EL-FEKI,M.2011. Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* Page: 2106-2114.N°29 -Mai 20132013.

NAJAFI,G., RAZI,M., HOSHYAR,A., SHAHMOHAMADLOO,S. et FEYZI S. 2010. The Effect of Chronic Exposure with Imidacloprid Insecticide on Fertility in Mature Male Rats.Royan Institute.*International Journal of Fertility and Sterility.*Vol 4, No 1, Pages: 9-16 Ph.D.

PAULUHN, J. 1988a. Study for Acute Inhalation Toxicity in the Rat. *Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany.* Study No. 99806. DPR Vol. Pages: 51950-0002.

PAULUHN, J. 1988b. NTN 33893 Study for Irritant/Corrosive Potential on the Skin (Rabbit). Bayer AG. Fachbereich Toxikologie Wuppertal, Germany. Study No. 99804. DPR Vol. 51950-0002 # 119455.

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

POLYCHRONIS,R., EMPOULAKIS,A., ESTES,M., HEARN,D.H., BURRACK,H.J. and PIERSON,E.A. 2012. Prevalence of *Candidatus* Erwinia Dacicola in Wild and Laboratory Olive Fruit Fly Populations and Across Developmental Stages. *Environmental Entomology* **41**:2. Pages: 265-274

RAMAZAN, B., NAZIROĞLU, M., TÜRK, G., YILMAZ, O., KULOĞLU, T., ETEM, E ET BAYDAS, G. 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochem Funct* (2012). Publié dans Wiley Online Library. DOI: 10.1002/cbf.2826

SCHOLZ, K. 1992. Degradation of NTN 33893 in soil with ground cover. Miles Inc. (Mobay). Study No. 103202. DPR Vol. 51950-0028 # 119540

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

SHADNIA S, MOGHADDAM HH. 2008. Fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *Am J Emerg Med.* 26. Page: 634. Case report of fatal intoxication with imidacloprid insecticide. *America Journal of Emergency Mededine.* 26: 634.e1-634.e4

SHIMOMURA M IHARA M, MATSUDA K, OTAKE M, KUWAMURA M, KOMAI K, AKAMATSU M, RAYMOND V, AND SATTELLE DB. 2002. Diverse actions of neonicotinoids on chicken α_7 , $\alpha_4\beta_2$ and *Drosophila*-chicken SAD β_2 and ALS β_2 hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology* 45:133–144. Ihara M, Matsuda

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

TOMIZAWA M, CASIDA JE. 1999. Minor structural changes in nicotinic insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol.* 127(1):115–22.

TOMIZAWA M, CASIDA JE. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:247–268

TOMIZAWA, M. 2001: Toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.*, 48 : 339-364

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

TOMLIN CDS. 2006. The pesticide manual, a world compendium. 14th ed. Surry, England: British Crop Protection Council, p.598–9

TULI J.S., SMITH, J.A. and MORTON D.B. 1995. Effects of acute and chronic restraint on the adrenal gland weight and serum corticosterone concentration of mice and their fecal output of oocyst after infection with *Eimeria apionodes*. *Res Vet Sci* 59: 82-86.

VAN VEEN, J. E. AND HAWLEY, R.S. 2003. Meiosis: when even two is a crowd. *Curr Biol.* Oct 28;13(21):R831-3.

WATANABE, M. 1990. NTN 33893. Rec Assays with Spores in the Bacterial System. Nihon Tokushu Noyaku Seizo K.K. Basic Research Division, Hino Institute.

Toxicological Research Laboratory, Japan. Study No. 101275. DPR Vol. 51950-0020 # 119507.

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

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

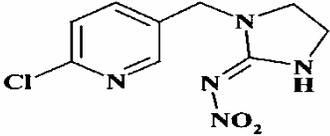
YAMAMOTO.I. et CASIDA,J.E.1999 : nicotinoide insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. *Springer-Verlag*. Tokyo. Page :300.

YEH, I.J., LIN, T.J., HWANG, D.Y. 2010 : Acute multiple organ failure with imidacloprid and alcohol ingestion. *Am. J. Emerg. Med.*,**28** : 255.e1–e3.

YOSHIDA, H. 1990. Photodegradation of NTN 33893 on soil. Miles Inc. (Mobay) Premise Termiticide. Study No. 100249. DPR Vol. 51950- 0027 # 119535.

ANNEXE 1: MATERIEL ET METHODES

Tableau I : Propriétés physicochimiques de l'imidaclopride

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

(LARAMEE, 2007 ; AL-SAYEDA, 2008)

Tableau II : Composition des bouchons alimentaires

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

1. Matériel et réactifs

Les cages à rats

Seringue et aiguille de gavage

L'insecticide : Imidaclopride

La Trousse à dissection

Tube EDTA

Liquide de fixation « Bouin »

Les cassettes en plastique

Les moules en métal (port-cassette).

Les lames porte-objet et lamelles

Les porte-lames

Graveur.

Boites de coloration

Alcool (100 °, 96°, 70° et 50°)

Xylène

La Gélatine à 4%

Liquide de montage (Eukitt)

Colorants topographiques

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

1. Kits de dosage

Dosage du cortisol

Les réactifs stockés à 2-8° C sont stables jusqu'à la date de péremption de la trousse.

- Tubes revêtus d'un anticorps monoclonal anti-cortisol : 2 x 50 tubes (prêts à l'emploi).
- Traceur cortisol marqué à l'iode 125: 1 flacon de 55 ml (prêt à l'emploi).
- Le flacon contient 185 kBq, en début de lot, de cortisol marqué à l'iode 125 dans un tampon contenant de l'albumine bovine sérique, de l'azide de sodium et un colorant vert.
- Calibrateurs : 5 flacons de 0,5 ml + 1 flacon «zéro» de 5 ml (prêts à l'emploi).

Les flacons de calibrateurs contiennent entre 0 à 2000 nM de cortisol dans un tampon contenant de l'albumine sérique bovine en présence d'azide de sodium. La concentration exacte est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon. Les calibrateurs ont été calibrés par rapport aux solutions de référence ERM®-DA193.

- Echantillon de contrôle : 1 flacon de 0,5 ml (prêt à l'emploi).

Le flacon contient du cortisol dans un tampon contenant de l'albumine bovine sérique et de l'azide de sodium.

2. Appareillage

Balance électronique

Balance de précision

Centrifugeuse

Micro pipette de 1000 µl, 100 µl et 10 µl

Etuve à 37°

Spectrophotomètre

Distributeur de paraffine de type « Leica »

Platine refroidissante de type « Leica »

Microtome de type « Leica »

Bain Marie de type « Firlabo »

Microscope photonique de type « Leica »

Batteries de coloration



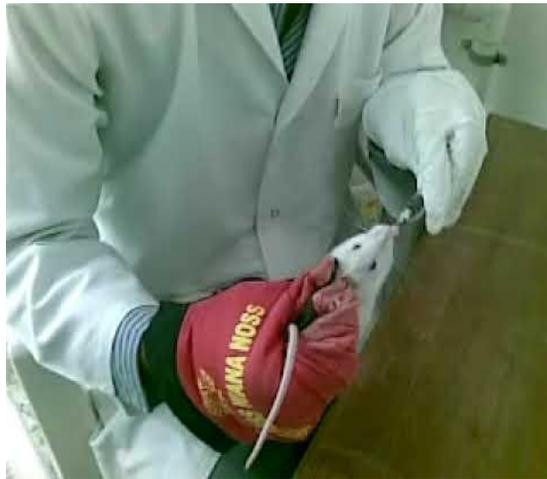
Balance électronique



Cage d'expérimentation



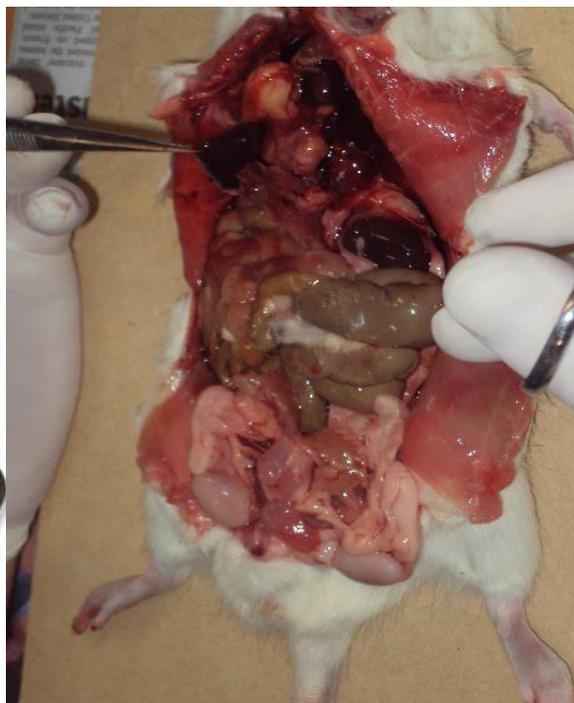
Aiguille de gavage



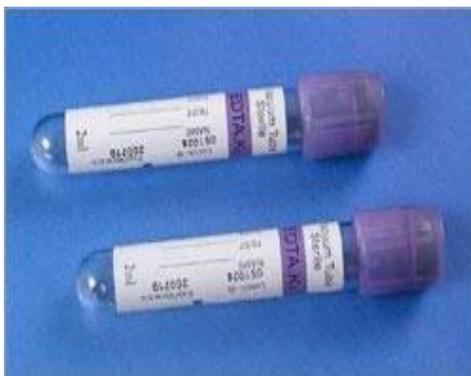
Gavage



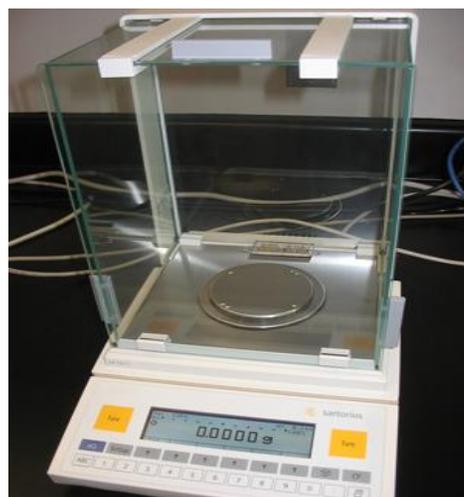
Trousse à dissection



Dissection et prélèvement des organes



Tubes EDTA



Balance de précision



Centrifugeuse



Micropipettes



Cassettes en plastique



Moules



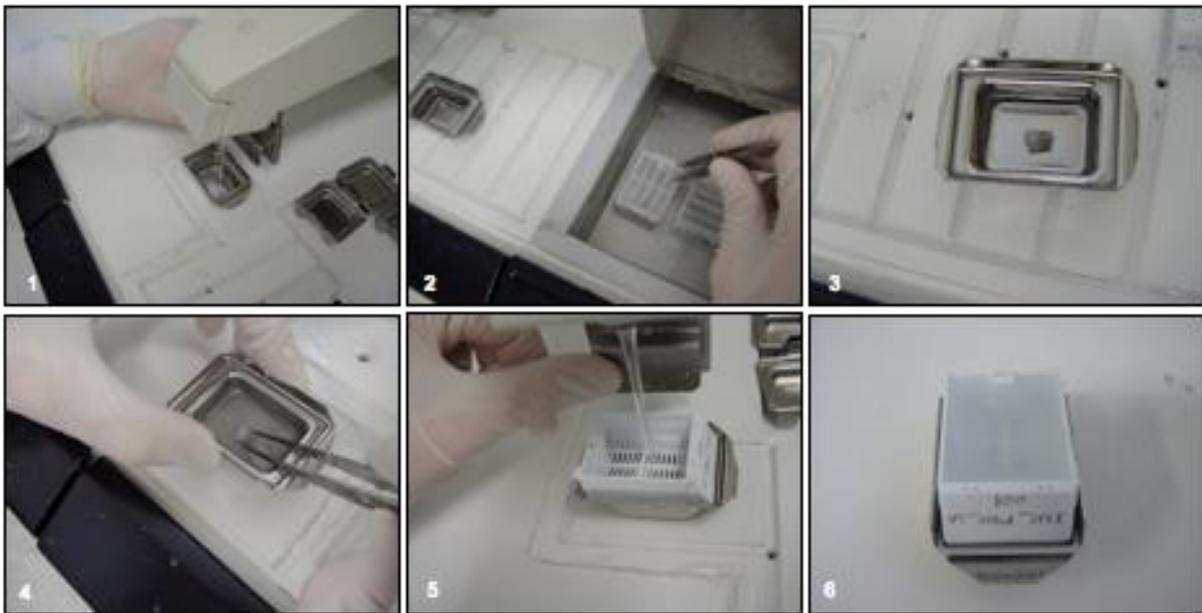
Boite de coloration et portoir



Bains d'alcools et de xylène
Déshydratation



Distributeur de paraffine avec platine refroidissante « Leica »

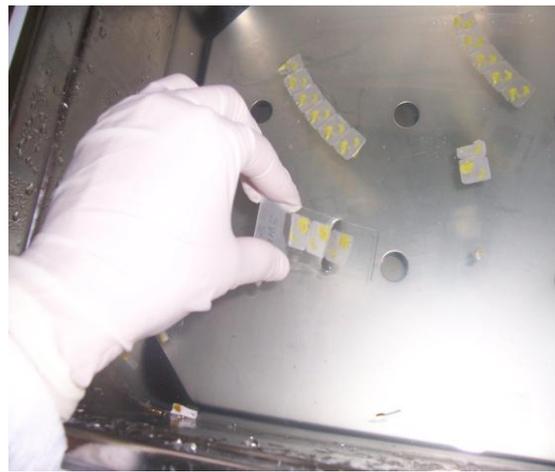


Confection des blocs de paraffine



Microtome « Leica »

Confection des rubans



Bain Marie

Mise en lames



Rubans collés sur des lames gélatinées



Séchage dans l'étuve à 37°C



Bains (xylène – Alcool – colorants)

Déparaffinage, réhydratation et coloration



Montage des lames colorées à l'Eukitt



Microscope photonique « Leica »

Observation

3. Fiches techniques :

3.1. Fiche technique N°1 : Fixation

Solution de Bouin (MARTOJA,1968)

Solution aqueuse saturée d'acide picrique 75 ml

Formol 20 ml

Acide acétique 5 ml

3.2. Fiche technique N°2 : Collage des rubans

Gélatine (MARTOJA,1968)

Gélatine en poudre 4 g

Eau distillée 100 ml

3.3. Fiche technique N°3 : Préparation des colorants (Gabe, 1968)

3.3.1. Hemalun de Hansen

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

3.3.2. Hematoxyline de Groat

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

3.3.3. Fuchsine-ponceau

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

3.3.4. Orange G- acide phosphomolybdique

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

3.3.5. Bleu d'aniline

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

3.3.6. Solution aqueuse saturée d'azocarmin G

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

3.3.7. Alcool aniliné

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

3.3.8. Alcool acétique

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

3.3.9. Solution aqueuse d'acide phosphotungstique

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

3.3.10. Bleu de Heidenhain

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

4. Calcul statistique

4.1. La moyenne

Soit $x_1, x_2, x_3, \dots, \dots, \dots, x_n$ une suite finie de nombre.

La moyenne arithmétique est le rapport :

$$m = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$

m : La moyenne arithmétique

n : L'effectif

x : Caractère quantitatif

4.2. L'écart type

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

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

δ : L'écart type

ν : La variance

4.3. La variance

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

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

ν : La variance

n : L'effectif

m : La moyenne arithmétique

x : Caractère quantitatif

4.4. Test d'homogénéité de deux échantillons

➤ $n < 30$: Loi de Student

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

On va calculer "la variance commune estimée" :

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

En suite "écart réduit" :

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

t : L'écart réduit.

m_1 : La moyenne arithmétique de l'échantillon 1

m_2 : La moyenne arithmétique de l'échantillon 2

S : La variance commune estimée

n_1 : Nombre d'échantillon 1

n_2 : Nombre d'échantillon 2

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

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

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

Tableau XVIII: Table de Student.

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

Tableau XIX: Dilution des alcools (d'après la table de GAY-LUSSAC).

Quantité d'eau en cm³ à ajouter à 100 cm³ d'alcool à diluer

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