

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique
Université de Ghardaïa
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : SEBA Aicha

HADJ AISSA Farida

Thème



**La neurotoxicité de pesticide methomyl sur l'équilibre et la
coordination motrice. Etude comportementale, histologique**

Devant le jury :

Melle. KEBILI Z	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Présidente
M. KHENE M A	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Encadreur
Melle. BELABBASSI O	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examinatrice

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

Nous tenons à remercier en quelques lignes tous ceux qui, de près ou de loin ont contribué à ce travail et qui nous ont aidés lors de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions en premier lieu ALLAH le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour l'accomplissement de ce travail, et nous l'implorons de rester toujours à nos côtés pour réussir dans l'avenir dans la réalisation de tout bon travail .

Nous voudrions dans un premier temps remercier, notre directeur de mémoire Monsieur KHENE M.A pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils .

Nous adressent aussi nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs conseils et leurs critiques ont guidés nos réflexions et ont répondu à nos questions durant notre recherches .

Nos respects et reconnaissance sont adressés à Melle. KEBILI Z maître assistante A à l'université de Ghardaïa, qui nous fait l'honneur de présider le jury de soutenance .

Nous exprimons aussi nos remerciements à Melle. BELABBASSI O professeur à l'université de Ghardaïa, qui nous fait l'honneur de participer au jury de ce mémoire en tant qu'examinatrice .

Nous remercions nos très chers parents, qui ont toujours été là, pour leurs soutiens constants ,
Nous remercions aussi nos sœurs et frères, pour leurs encouragements .

En fin, nous voudrions exprimer nos reconnaissances envers les amies et collègues qui nous ont apporté, leur soutien inconditionnel et leurs encouragements tout au long de notre démarche .

Dédicaces 1

Je dédie ce projet de fin d'étude

À mon cher père, mon précieux offre de dieu, l'homme qui me doit ma vie, ma réussite et tout mon respect. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce qu'il mérite pour tous les sacrifices qu'il n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

À ma chère mère, quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point l'a remercié comme il se doit. Son affection me couvre, sa bienveillance me guide et sa présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

À vous deux chères perles, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme parents.

À toutes mes chères sœurs et mon petit frère, je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

À tous les membres de ma famille, petits et grands, mes amies, veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

Aicha

Dédicaces 2

Je dédie ce projet de fin d'études à quelqu'un qui m'a appris l'alphabet de l'être et m'a soutenu tout au long de ma carrière académique auprès des meilleures personnes de ma vie et des plus grands soutiens de moi ...

Le printemps de la tendresse et ma chère maman "Mama"

Et le meilleur homme du monde est mon père "Bilal".

Ma famille: mon grand-père, ma grand-mère, mes oncles, mes tantes, mes oncles et mon kha, à qui je dois respect et appréciation

Ma gratitude pour tout l'amour du monde, sans eux je ne pourrais pas atteindre mon rêve La vie s'éclaire grâce à la présence d'amis, ceux qui m'aident toujours en les soutenant Les prières les encouragent.

Mes salutations sincères à ceux, Ceux qui ont aidé de près ou de loin pour finir

Cela fonctionne jusqu'à la touche finale.

Merci beaucoup

Farida

Résumé

Les pesticides sont des produits utilisés pour lutter contre les organismes nuisibles pour l'agriculture. Ils ont été utilisés en grande quantité au cours des dernières décennies et leur terrible propagation menace l'environnement et la santé, en particulier le système nerveux.

Dans ce travail nous allons étudier l'effet de methomyl (MET) sur l'équilibre et la coordination motrice et sur le cervelet et la réactivité des astrocytes après une exposition sub-chronique .

Dix rats Wistar adultes mâles reçoivent par gavage une dose de 1/16 de dose Létale 50 (DL50) du MET dissout dans l'eau distillée et 10 rats témoins reçoivent de l'eau distillée, pendant 28 jours. À la fin de l'expérience, les statistiques de test de l'équilibre et la coordination motrice des rats ont été analysés. Puis les rats ont été sacrifiés et leurs cervelets prélevés. La morphologie des cellules de Purkinje au niveau de cervelet des rats a été examinée par coloration de Nissl et la réactivité des astrocytes au niveau de de cervelet a été aussi étudiée .

Nos résultats ont montrés que l'exposition au MET provoque une diminution très significative dans l'équilibre et la coordination motrice des rats intoxiqué par rapport aux rats témoins, des altérations morphologique au niveau des cellules de Purkinje de cervelet et une augmentation de l'expression du GFAP (la protéine acide fibrillaire gliale) par les cellules astrocytaires.

Mots clés : Methomyl, cervelet, équilibre motrice, GFAB, les astrocytes.

Liste des abréviations

ACH	Acétylcholine
AchE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CL50	Concentration Létale 50
DDT	Dichloro Diphényl Trichloroéthane
DL50	Dose Létale 50
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
IHC	Immuno Histo Chimie
MET	Methomyl
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
SNC	Système Nerveux Centrale
SNP	Système Nerveux Périphérique

Liste des tableaux

Tableau 1: les différentes familles des pesticides organiques.....	4
Tableau 2: Description et propriétés physicochimiques de methomyl.....	8
Tableau 03: Les différentes étapes de coloration de Nissl.....	22
Tableau 04: Les différentes étapes de l'immunohistochimie.....	23

Liste des figures

Figure 01 : Structure chimique du méthomyl.....	9
Figure 02: Le système nerveux central.....	11
Figure 03: Organisation anatomique de cervelet.....	12
Figure 04: Cortex cérébelleux.....	13
Figure 05: Structure du neurone.....	15
Figure 06: Différents types des cellules gliales.....	16
Figure 07: Schéma représente les différentes étapes de protocole expérimental.....	21
Figure 08 : Schéma de la barre horizontale pour évaluer l'équilibre motrice.....	22
Figure 09: Histogramme représente l'effet de MET sur l'équilibre et la coordination motrice chez les rats	26
Figure 10: Photographies montrant les différents traitements (Coloration de Nissl) sur les cellules de Purkinje au niveau du cervelet pendant 28 jours chez les rats.....	27
Figure 11: L'effet de MET sur la réactivité des astrocytes révéler par immunomarquage de la GFAP.....	27

Remerciements.....	
Dédicaces 1.....	
Dédicaces 2.....	
Résumé.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des tableaux et Figures.....	
Introduction générale	1

Chapitre I: Etude Bibliographique

I.1. Généralités sur les pesticides.....	3
I.1.1. Définition des pesticides.....	3
I.1.2. Classification des pesticides.....	3
I.1.2.1. Classification des pesticides selon la structure chimique.....	3
I.1.2.2. Classification des pesticides selon leur cible.....	4
I.1.3. L'effet des pesticides sur la santé.....	5
I.1.3.1. Toxicité des pesticides.....	5
I.1.3.1.1. Toxicité aigüe.....	6
I.1.3.1.2. Toxicité chronique.....	7
I.2. Pesticide Methomyl.....	8
I.2.1. Définition du methomyl.....	8
I.2.2. Description et identité physicochimiques du méthomyl.....	8
I.2.3. Mode d'action du méthomyl.....	9
I.2.4. Effets toxicologiques du methomyl.....	9

I.3. Système nerveux.....	10
I.3.1. Définition de Système nerveux.....	10
I.3.1.1. Système nerveux central.....	10
I.3.1.1.1. Cervelet.....	11
I.3.2. Les éléments cellulaires du système nerveux.....	14
I.3.2.1. Les neurones.....	14
I.3.2.2. Les cellules gliales.....	15
I.3.2.3. Les astrocytes.....	16
I.3.2.3.1. Classification des astrocytes.....	17
I.3.2.3.2. Fonctions des astrocytes.....	18
I.3.3. Barrière hématoencéphalique (BHE).....	18

Chapitre II: Matériel et Méthode

II.1. Matériel biologique.....	20
II.2. Conditions de l'expérience.....	20
II.3. Traitement des rats.....	20
II.4. Test de barre horizontale.....	20
II.4.1. Analyse statistique.....	21
II.5. Sacrifice et extraction du cervelet	21
II.6. Méthodes histologiques.....	22
II.6.1. Coloration de Nissl.....	22
II.6.1.1. Mode opératoire.....	23
II.6.2. Immunohistochimie.....	24
II.6.2.1. Mode opératoire.....	24

Chapitre III: Résultats et Discussion

III.1. Résultats.....26

III.1.1. Résultats de test Barre horizontale.....26

III.1.2. Résultats de la coloration de Nissl.....26

III.1.3. Résultats de l'immunohistochimie.....27

III.2. Discussion.....28

Conclusion.....31

.....ملخص

Abstract.....

Bibliographie.....

Introduction générale

Les pesticides sont des substances utilisées pour prévenir, détruire, repousser ou atténuer les ravageurs, destinés contre les insectes, rongeurs, les mauvaises herbes et une foule d'autres organismes indésirables. Idéalement, l'action préjudiciable des pesticides serait très spécifique contre des espèces indésirables; cependant, la plupart des pesticides ne sont pas très sélectifs et sont généralement toxiques pour de nombreuses espèces non ciblées, y compris les humains. Les effets néfastes des pesticides sur la santé des humains couvrent une variété de domaines; certains composés peuvent seulement exercer certains effets irritants légers de la peau, tandis que d'autres peuvent affecter les fonctions hépatiques ou pulmonaires. Certains sont cancérigènes, d'autres peuvent causer une toxicité pour la reproduction ou ont des propriétés de perturbation endocrinienne. Plusieurs pesticides sont neurotoxiques. Les insecticides, en particulier ceux qui tuent les insectes en perturbant leur système nerveux, exercent également des effets neurotoxiques chez l'homme tels que les carbamates insecticides (**Costa et al, 2008**).

Les insecticides de la famille des carbamates sont utilisés en agriculture depuis les années 1950. Ils agissent par une inhibition rapide des cholinestérases des insectes. Ceci constitue également leur mode d'action toxique principal chez les mammifères. La toxicité des carbamates est principalement due à l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme impliquée dans la régulation de la neuro transmission, par hydrolyse du neurotransmetteur l'acétylcholine (**Pierre-Gérard, 1977**).

Le méthomyl est un insecticide carbamate utilisé partout dans le monde sur toutes sortes de cultures. Toutefois, l'utilisation intensive de ce composé a entraîné de graves problèmes environnementaux et des risques pour la santé humaine vue leur hydro-solubilité et leur toxicité élevée (**Mortensen et Serey, 2014**).

Notre objectif était de contribuer à la connaissance de l'effet de ce pesticide après une exposition sub-chronique sur l'équilibre et la coordination motrice, les cellules de Purkinje et la réactivité des astrocytes au niveau de cervelet chez le rat Wistar.

Cette présente étude est subdivisée en deux parties principales, la première partie présente les données bibliographiques réparties dans un chapitre présentant des généralités sur les pesticides et une définition sur le méthomyl et leur toxicité, ainsi que des généralités sur le système nerveux tels que le cervelet. La deuxième partie expérimentale, où un test d'équilibre sur la barre horizontale a été réalisé et des méthodes histologiques sont appliqués

Introduction générale

au niveau du cervelet afin d'atteindre l'objectif de cette étude, en commençant par la coloration de Nissl en suite une étude immunohistochimie sur les astrocytes par immunomarquage de GFAP .

Et enfin, nous discuterons l'ensemble de résultats obtenus, et on suggère quelques perspectives à ce travail de recherche.

I.1. Généralités sur les pesticides

I.1.1. Définition des pesticides

Le mot **pesticide** est un terme générique dérivé des termes latins "**pestis**" qui signifie fléaux, et "**caedere**" qui signifie tuer (**Baldi et al, 2013**) On l'appelle aussi produit phytosanitaire, produit phytopharmaceutique (**Ouali & Gagaoua, 2012**). C'est toute substance ou produit utilisé dans l'agriculture pour combattre les organismes nuisibles aux cultures et aux produits récoltés (**Gasmi, 2018**), et ainsi utiliser pour réguler la croissance des végétaux, protéger les produits de culture au cours du stockage ou du transport (**Baldi et al, 2013**).

La diffusion de ces composés chimiques dans l'environnement par l'air, le sol, l'eau et les produits alimentaires entraîne un risque d'empoisonnement des organismes vivants, ce qui peut entraîner diverses maladies (**Gasmi, 2018**).

I.1.2. Classification des pesticides

Les pesticides ont une classification complexe, retour à la multiplicité de structures chimiques et de groupes fonctionnels. La plupart des auteurs classent les pesticides selon deux systèmes de classification, soit en fonction de la structure chimique, soit selon leur cible (**Louchahi, 2015**).

I.1.2.1. Classification des pesticides selon la structure chimique: On peut distinguer quatre catégories des pesticides :

- a. Les pesticides inorganiques:** tels que le plomb, l'arsenic. Sont des éléments chimiques qui ne se dégradent pas. Leur utilisation provoque des effets toxiques graves sur l'environnement par l'accumulation sur le sol (**Ayad-Mokhtari, 2012**).
- b. Les pesticides organométallique:** sont principalement des fongicides dont la molécule est constituée d'un complexe entre un métal, tels que le zinc ou le manganèse, et un composé carboné. Exemples: le manco benzène, manébe (**Fillatre, 2011**).
- c. Les bio pesticides:** peuvent être des substances dérivées de plantes ou d'animaux et peuvent être des micro-organismes vivants (moisissures, bactéries, virus, nématodes, ...etc.) (**Ayad-Mokhtari, 2012**).

Chapitre I: Etude Bibliographique

d. **Les pesticides organiques:** Constitué principalement de carbone, hydrogène et d'autres éléments tels que oxygène, nitrogène, phosphore, hydrogène, désulfite (Calvet et al, 2005). Ils sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques. Actuellement il existe plus de 80 familles (Tomlin, 2006) dont les plus connues sont dans le tableau suivant:

Tableau 1: les différentes familles des pesticides organiques (Ayad-Mokhtari, 2012 ; Ait Mohammed et Imadouchene, 2017)

La famille	Les exemples
Organochlorés: comportant au moins un atome de chlore	Aldrine, Lindane, DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane)
Organophosphorés: comportant au moins un atome de phosphore lié directement à un carbone	Malathion, Glyphosate
Carbamates: contenant une fonction R-NH-COO-R	Aldicarbe, Methomyl
Pyréthrinoïdes: alternative aux molécules insecticides plus anciennes de type organochlorés, organophosphorés, ou carbamates	Cyperméthrine
Triazines: structure de base s-triazine composée d'un hétérocycle aromatique de six atomes, trois atomes de carbone et trois atomes d'azote.	Atrazine
Urées	Diuron, Linuron

I.1.2.2. Classification des pesticides selon leur cible: Selon les organismes vivants ciblé, les pesticides sont divisés en plusieurs catégories dont les principales sont :

- a. **Les Herbicides:** ils permettent de tuer les herbes nuisibles par l'inhibition de photosynthèse ou les réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse des lipides et des acides aminés (Ouali & Gagaoua, 2012) .
- b. **Les insecticides:** leur mode d'action est de détruire le système nerveux des insectes nuisibles et inhibent les fonctions vitales telles que la transmission de l'influx nerveux et la respiration (Ouali & Gagaoua, 2012).

- c. **Les fongicides:** sont les pesticides qui combattent les champignons qui causent les maladies cryptogamiques, provoquent des graves dommages aux végétaux cultivés, leur mode d'action est l'inhibition de biosynthèse des acides aminés et des stérols et ainsi affectent le système respiratoire et la division cellulaire (**Ouali & Gagaoua, 2012**).

En plus de ces trois groupes principaux, on trouve aussi: Acaricides, Nématocides, Rodenticides. Molluscicides, Algicides, Corvicides et Corvifuges (**Ayad-Mokhtari, 2012**).

I.1.3. L'effet des pesticides sur la santé.

L'être humain peut se contaminer par Les pesticides par différentes voies telle que orale (produits alimentaire, l'eau), cutanée, nasale (**Ayad-Mokhtari, 2012**).

Les pesticides majoritairement sont des substances bioactifs et donc toxique pour l'homme. Ces produits se transforment en différents métabolites susceptibles d'engendrer des répercutions sur l'organisme humain (**Ait Mohammed & Imadouchene, 2017**).

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les facteurs importants qui influent sur la toxicité des pesticides pour l'être humain sont les suivants: la dose, les voies de l'exposition, le degré d'absorption, la nature des effets de la substance active et de ses métabolites, l'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme, et ainsi l'état de santé de l'individu exposé (**Ouali & Gagaoua, 2012**).

Les enfants sont plus exposés et plus sensibles aux effets nuisibles de pesticides que les adultes, car leur comportement et leur système est en développement, ce qui engendre plus de risque d'intoxication (**Ouali & Gagaoua, 2012**).

Certains produits qui présentent une toxicité aigüe importante peuvent être éliminés facilement par l'organisme. A l'inverse, d'autres substances de toxicité moindre sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme et d'induire des effets à plus long terme qui sont difficilement quantifiables. Par ailleurs ces produits sont transformés parallèlement en différents métabolites susceptibles d'engendrer d'autres répercutions sur l'organisme humain (**Ayad-Mokhtari, 2012**).

I.1.3.1.Toxicité des pesticides

Le risque d'intoxication pour l'homme résulte à la fois du danger lié à la toxicité de la substance active (toxicité aiguë et chronique), et de l'exposition au pesticide (dose journalière absorbée) (**Ait Mohammed & Imadouchene, 2017**).

I.1.3.1.1. Toxicité aigüe

Les effets nuisibles aigüe des pesticides généralement peuvent se manifesté immédiatement ou peu de temps (quelque minutes, heures ou jours) après une courte durée de l'exposition d'une quantité importante de pesticides (selon la voie de pénétration et la dose du produit) (**Ouali & Gagaoua, 2012 ; Ayad-Mokhtari, 2012 ; Louchahi, 2015**)

Les différents symptômes d'une toxicité aigüe peuvent être légères qui retiennent principalement :

- ◆ **Des signes généraux:** la fatigue, la fièvre...etc.
- ◆ **Des signes cutanés:** brulure, rougeur...etc.
- ◆ **Des signes oculaire:** troubles visuels, rougeur oculaire, démangeaison...etc.
- ◆ **Des signes neurologique:** céphalées, vertiges, tremblement, convulsions généralisées, perte de connaissance...etc.
- ◆ **Des signes digestifs:** nausées, vomissement, diarrhées, douleurs abdominales...etc.
- ◆ **Des signes respiratoires:** toux, gêne respiratoire, douleurs thoraciques...etc.

Comme ils peuvent être graves telles que les convulsions, le coma et la mort, rythme respiratoire accéléré, secousses musculaires, perte de conscience (**; Ouali et Gagaoua, 2012; Louchahi, 2015**).

La connaissance de ces effets permet d'appréhender le degré de dangerosité des pesticides et les risques encourus en cas d'exposition accidentelle.

Auparavant, des essais de toxicité étaient réalisés sur l'animal afin de déterminer la toxicité aigüe d'un produit : il s'agissait de la toxicité induite par l'administration unique et massive d'un produit à l'animal, pour déterminer la Dose Létale 50 (DL50) ou de Concentration Létale 50 (CL50), par inhalation. La DL50 est définie comme étant la dose de produit administrée en une seule fois par ingestion, inhalation, ou voie cutanée , entraînant la mort de 50% de la population animale testée. Elle s'exprime en mg de matière active par kg d'animal, et en mg/L d'air pour la CL50. Plus ce chiffre est petit, plus la substance est toxique. Ces atteintes reproduisent les voies possibles d'intoxication pour les personnes manipulant ces produits (**Batsch, 2011**).

I.1.3.1.2. Toxicité chronique

Les effets néfastes chroniques des pesticides se développent avec l'apparition d'une maladie qui peut être difficile à reconnaître après des accumulations et d'exposition dans l'organisme à long terme (quelques mois à quelques années voir dizaines d'années plus tard) pour des doses faibles de substance toxique. Et peuvent être aussi le résultat d'intoxications aiguës répétées (**Batsch, 2011; Louchahi, 2015; Ait mohammed et Imadouchene, 2017**).

Les principaux effets d'une toxicité chronique sont :

- ◆ **Les effets cancérigènes:** tels que les cancers des lèvres, cerveau, l'estomac, prostate, reins et/ou le système hématopoïétique (leucémie, myélomes multiples et surtout les lymphomes non hodgkiniens). La plupart des pesticides sont à l'origine de cancer.
- ◆ **Les effets sur le système endocrine:** Certains pesticides peuvent entraîner des troubles de la reproduction, et notamment des problèmes de stérilité, problèmes d'avortements spontanés, de mortalités ou malformation fœtales ou d'infertilité masculine.
- ◆ **Les effets neurologiques et neurocomportementaux:** Plusieurs pesticides peuvent être responsables d'effets sur le système nerveux, Les symptômes chroniques les plus souvent observés, à la suite d'une exposition sont la léthargie, la fatigue, une paralysie partielle et transitoire ou une faiblesse des muscles périphériques des mains et des pieds. la nervosité, la dépression, les difficultés d'élocution, la perte de concentration et une diminution de l'efficacité cognitive. D'autres maladies neurologiques, notamment la maladie de Parkinson semble aussi avoir une fréquence plus élevée en milieu rural.
- ◆ **Les effets sur le système immunitaire:** Certaines études indiquent la probabilité d'une relation entre les pesticides et l'augmentation des risques de maladies infectieuses. La chute de production d'anticorps et les réactions d'hypersensibilité.
- ◆ **Les Effets sur le système endocrinien:** Certains pesticides provoquent des perturbations endocriniens pourraient aussi être associés au développement du cancer du sein, à une réduction de la fertilité mâle, à des dommages aux glandes thyroïde et pituitaire. ainsi l'obésité, la décalcification des os et le diabète (**Louchahi, 2015**).

I.2. Pesticide Methomyl

I.2.1. Définition du methomyl

Le méthomyl est un insecticide de famille carbamate anti cholinestérase systémique à large spectre homologué pour une utilisation sur une variété de cultures et de plantes ornementales. Il s'agit d'un outil important pour éliminer un certain nombre d'insectes ravageurs dans divers contextes de culture et non agricoles. Il fut introduit en 1966 (Mortensen & Serex, 2014).

I.2.2. Description et identité physicochimiques du méthomyl

Tableau 2: Description et les propriétés physicochimique de methomyl (Mercury, 1990).

Nom commun	Méthomyl
Classe chimique	Carbamates
Fonction	Insecticide
Nom chimique selon IUPAC	S-méthyle N-[(méthylcarbamoyle) oxy] thioacétimide
Nom chimique selon CAS	Méthyle N-[[[(méthyl-amino) carbonyle] oxy] éthanimidothioate
Numéro de registre CAS	16752-77-5
Propriétés chimiques	
Masse moléculaire	162,2 g/mol (C :37,02% ,H :6,21% , N:17,27%,O :19,73% ,S :19,77%)
Formule Moléculaire	C₅H₁₀N₂O₂S
Propriétés physiques	
Température de fusion	77–82 °C
Solubilité	57,9 g·l⁻¹ à 25 °C
Masse volumique	1,2946 g·cm⁻³ à 25 °C
Apparence	cristaux incolore avec une faible odeur de soufre

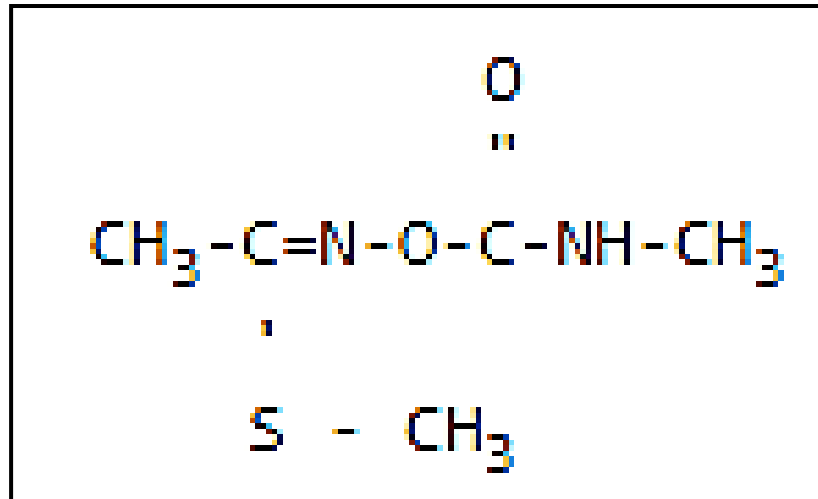


Figure 01 : Structure chimique du méthomyl (Mercury, 1990).

I.2.3. Mode d'action du méthomyl

Semblable à d'autres insecticides carbamates, le méthomyl inhibe l'acétylcholinestérase (AChE), qui est contenue dans les jonctions synaptiques entre les neurones. Lorsque l'AChE est inhibée, la désactivation hydrolytique de l'acétylcholine (ACh) est réduite, de sorte qu'elle continue à stimuler les récepteurs post-synaptiques pour éventuellement provoquer une défaillance nerveuse et / ou tissulaire. Chez les mammifères, de nombreuses fonctions vitales sont contrôlées par le système nerveux périphérique et toute inhibition de ces fonctions peut entraîner la mort. Le méthomyl est connu pour provoquer une toxicité par action systémique par contact direct ou ingestion (Mortensen & Serex, 2014).

I.2.4. Effets toxicologiques du methomyl

Le méthomyl est hautement toxique par voie orale, modérément toxique par inhalation et a une faible toxicité cutanée. Le principal symptôme de l'intoxication aiguë au méthomyl est de graves maux de tête, qui peuvent être accompagnés de symptômes moins graves tels que nausées, vomissements, salivation et douleurs abdominales. Les autres symptômes généraux sont les crampes, la diarrhée, la transpiration, la lassitude, la faiblesse, le nez qui coule, une oppression thoracique et une vision trouble ou obscure. Parfois, les effets d'une exposition aiguë aux méthomyl peuvent être durables. La dose orale létale probable chez l'homme est de 5 à 50 mg/ kg. Et chez le rat est de 17 à 24 mg/kg. La dose létale réelle de méthomyl dépend de la voie et du taux d'exposition et de l'agressivité du traitement utilisé (Seyler, 1994 ; Van Scoy, 2013).

I.4. Système nerveux

I.3.1. Définition du Système nerveux

Le système nerveux est un système complexe capable de récupérer et analyser les informations extérieures afin d'induire une réponse adaptée aux informations reçues. Il est formé de dizaines de milliards de neurones qui s'organisent et communiquent entre eux pour contrôler toutes les activités conscientes ou inconscientes de l'organisme. Le système nerveux est organisé en deux grandes parties (**Hautbois, 2014**).

Le système nerveux central (SNC) qui est composé du cerveau et de la moelle épinière.

Le système nerveux périphérique (SNP) qui est constitué des nerfs périphériques et des ganglions qui leur sont associés au cerveau et moelle épinière.

I.3.1. Système nerveux central

Le système nerveux central est composé de neurones et de cellules gliales qui sont les cellules de soutien, de protection et d'isolement des neurones. Il comprend la moelle épinière, incluse dans la colonne vertébrale et l'encéphale, partie du système nerveux contenue dans la boîte crânienne. L'encéphale dans le langage courant est l'équivalent du cerveau mais en fait il correspond au cerveau, constitué des deux hémisphères cérébraux, au tronc cérébral, prolongement de la moelle épinière, et au cervelet, responsable de l'équilibre, de la posture et de la coordination des mouvements grâce au contrôle du tonus musculaire (**Hautbois, 2014**) (figure 1).

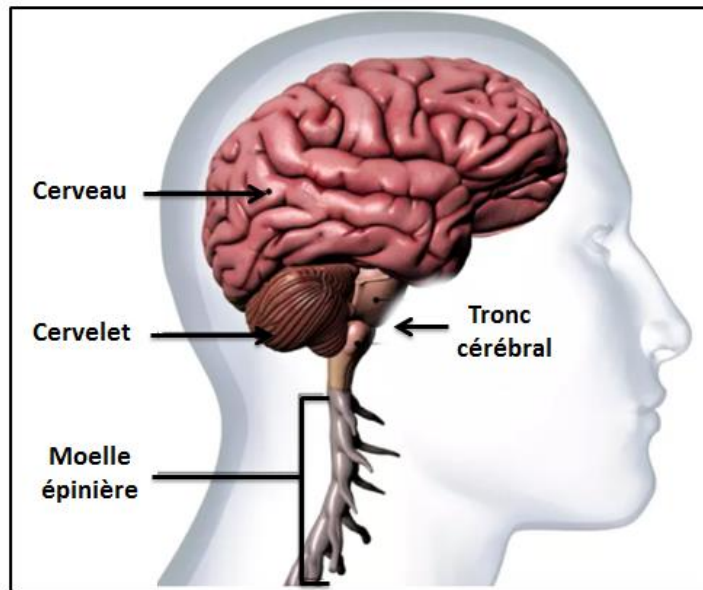


Figure 02: Le système nerveux central (Kendra, 2020).

I.3.1.1.1. Cervelet

Le cervelet qui signifie «petit cerveau» en latin, est un élément vital du cerveau humain. Il occupe la majeure partie de l'hémisphère cérébelleux latéral environ un dixième de la cavité crânienne, se situe dans la fosse crânienne postérieure, assis à califourchon sur le tronc cérébral (Mial, 2016; Kendra, 2020).

A. Organisation anatomique

Le cervelet est classiquement décrit comme constituée trois parties: le vermis, impaire et médiane, entouré de part et d'autre par deux hémisphères paires et symétriques. A sa surface, le cervelet est parcouru par des nombreuse fissures et sillons transversaux, plus ou moins profonds et concentriques (Mostefaoui & Benmira zitouni, 2018), se divise en trois lobe principaux: antérieure, postérieure et modulo-flocculaire, sépare entre eux par deux fissures (postéro-latérale et primaire) (Figure 03). Ces lobes se subdivisé en 10 lobules par des sillons secondaires qui sont les suivants: (Mial, 2016).

- **Dans le Lobe antérieur:** Lingula(I), lobe central (ventrale II et dorsale III), culmen (ventral IV et dorsal V).
- **Dans le lobe postérieur:** declive(VI), folium(VIIA), tuber(VIIB), pyramide(VIII), l'uvule(IX).
- **Dans le lobe flocculo-nodulaire:** nodule.

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 inférieure, supérieure et moyenne. (Mostefaoui et benmira zitouni, 2018).

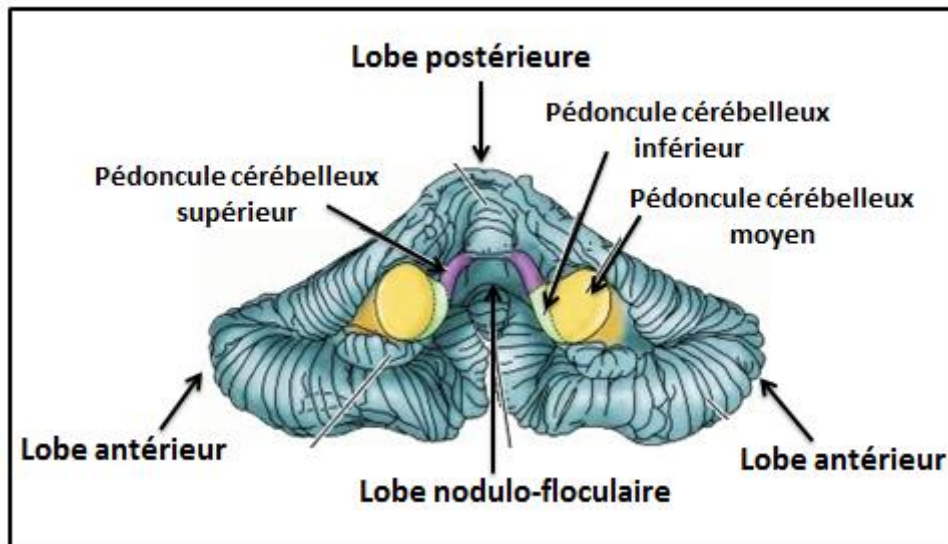


Figure 03: Organisation anatomique de cervelet

B. Organisation cellulaire

Le cortex cérébelleux est fait d'une mince couche de substance grise qui revêt la substance blanche ; celle-ci présente une disposition arborescente caractéristique avec une masse blanche centrale d'où partent des faisceaux qui constituent les axes des lobules et lamelles.

La substance grise du cortex cérébelleux montre trois couches (Figure 04) bien distinctes qui sont, de la périphérie vers la profondeur :

- **la couche moléculaire**, pauvre en cellules (cellules étoilées, cellules à corbeille) c'est une couche d'association entre axones et dendrites des différentes cellules du cortex ;
- **la couche des cellules de Purkinje**, cellules volumineuses, piriformes, munies d'un arbre dendritique étalé en espalier dans la couche moléculaire, dans un plan perpendiculaire à l'axe des lamelles
- **la couche des grains**, constituée de très nombreux neurones à corps cellulaire petit.

Chapitre I: Etude Bibliographique

Cette couche contient aussi des cellules plus volumineuses, peu nombreuses, les cellules de Golgi, et les glomérules cérébelleux, formations synaptiques d'apparence éosinophile (Ouahioune, 2002).

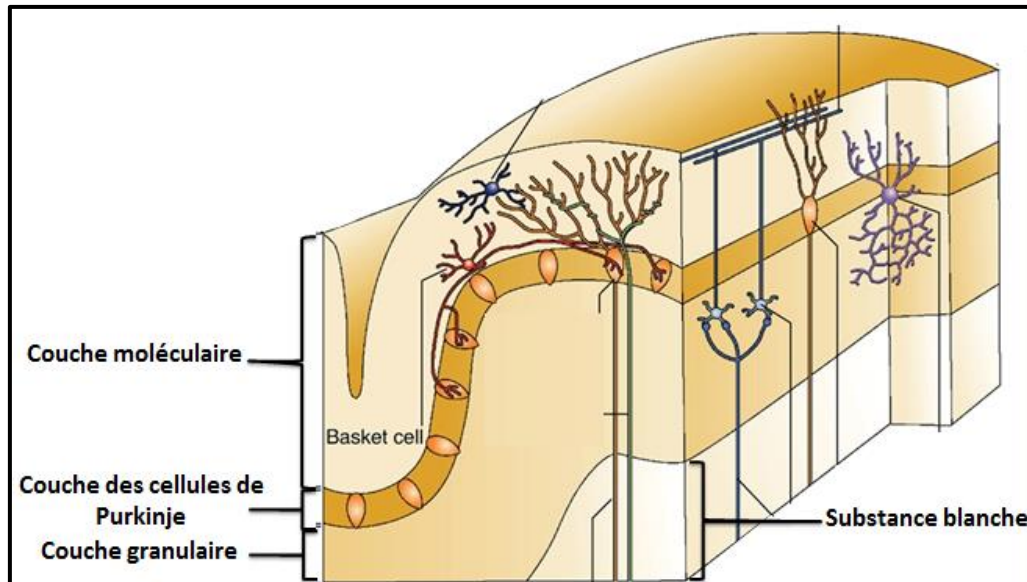


Figure 04: Cortex cérébelleux (Roux et Bossu, 2016)

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 (Mostefaoui & Benmira zitouni, 2018).

Au-dessous de ces trois couches s'étend la substance blanche cérébelleuse. Elle forme le centre médullaire du cervelet. Dans la substance blanche du cervelet se trouvent les noyaux profonds et passent les fibres afférentes, moussues et grimpantes et les fibres efférentes, c'est-à-dire les axones des cellules de Purkinje (Ouahioune, 2002).

L'ensemble de ces axones constitue des fibres d'association et des fibres de projection:

- les fibres d'association unissent deux territoires d'une même moitié de l'écorce ou bien relie l'écorce aux noyaux profonds du cervelet (axones des cellules de Purkinje).
- les fibres de projection unissent le cervelet aux organes voisins (moelle, cerveau, tronc cérébral). Les fibres efférentes proviennent des noyaux gris cérébelleux (eux-mêmes reliés à l'écorce) et empruntent les 3 paires de pédoncules cérébelleux inférieurs ou supérieurs. Les fibres afférentes arrivent au cervelet par les six pédoncules (notamment

les fibres moussues et les fibres grimpantes). Ces axones entourent les noyaux profonds cérébelleux (**Ouahioune, 2002**).

C. Fonctions du cervelet

Le cervelet est un véritable ordinateur central qui à chaque instant reçoit des informations, informe les centres nerveux, repère les erreurs, fait des comparaisons et corrige le programme moteur. Il assure la régulation, la coordination et la synchronisation des activités musculaires de mouvements volontaires tels que la marche ou la course. Permet également le contrôle des activités musculaires toniques de la posture et de l'équilibre, lors de déplacements ou lors d'activités moins dynamiques telles que la station debout ou la position accroupie par exemple. Ainsi que dans la parole et un certain nombre de processus mentaux importants (**Olivier, 2013**).

I.3.2. Les éléments cellulaires du système nerveux

Il existe deux types de cellules dans le tissu nerveux : les neurones et les cellules gliales.

I.3.2.1. Les neurones

Les neurones constituent l'unité fonctionnelle du tissu nerveux. Sont des cellules nerveuses hautement différenciées, anatomiquement et physiologiquement spécialisées dans la communication intercellulaire. Ils sont capables de recevoir, émettre et/ou transmettre de l'information sous forme de signaux électriques ou chimique. Chacun d'entre eux est intégré dans des réseaux multiples, ordonnés et hiérarchisés chargés de recevoir ou transmettre un signal ou de coordonner une fonction complexe. La transmission nerveuse se fait par l'intermédiaire de plusieurs neurones qui sont en rapport les uns avec les autres par leurs dendrites ou par l'articulation d'un axone avec les dendrites d'une ou de plusieurs cellules voisines. La jonction entre les éléments de deux cellules constitue une synapse (**Hautbois, 2014**).

Les neurones sont composés de:

- corps cellulaire qui constituent de noyau de la cellule et toute la machinerie métabolique pour la synthèse des neuromédiateurs, Le corps cellulaire ne mesure pas plus de 10 à 20 μm .
- L'axone qui constitue la voie de sortie de l'information: c'est un prolongement pouvant atteindre un mètre de longueur. Les axones peuvent être entourés d'une

gaine de myéline qui les isolent et les protègent ce qui améliore la vitesse de propagation de l'influx nerveux.

- Les terminaisons présynaptiques ou terminaisons neuronales ou terminaisons axonales: Ce sont des ramifications situées à l'extrémité de l'axone, Elles assurent le stockage des neuromédiateurs et le transfert de l'information aux autres neurones (Figure 05) (Hautbois, 2014).

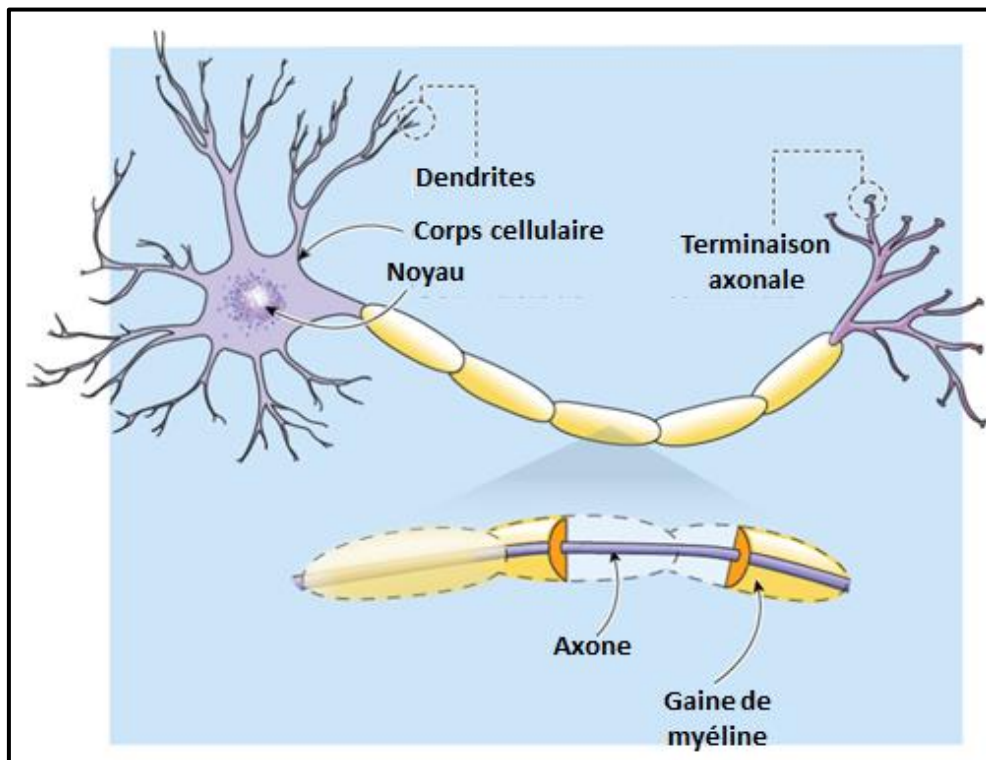


Figure 05: Structure de neurone (Zayia, et Tadi, 2020)

Les neurones peuvent être classés selon la forme et le nombre de prolongements qu'ils possèdent. Les dendrites qui se ramifient et forment un arbre autour du corps cellulaire, elles assurent la réception de l'information et sa transmission au corps cellulaire (Hautbois, 2014).

I.3.2.2. Les cellules gliales

Le tissu de soutien du système nerveux est formé par les cellules gliales. Elles assurent le lien avec les vaisseaux sanguins et apportent les nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du système nerveux. Contrairement aux cellules neuronales, les cellules gliales peuvent se multiplier, voire proliférer et devenir cancéreuses. Les cellules gliales existent dans le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP), certains types de cellules gliales peuvent même traverser la barrière entre le SNC et le SNP (Knapp, 2020). On

distingue plusieurs types de cellules gliales dans le SNC : les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie, et les cellules épendymaires (Figure07) (Castel, 2006).

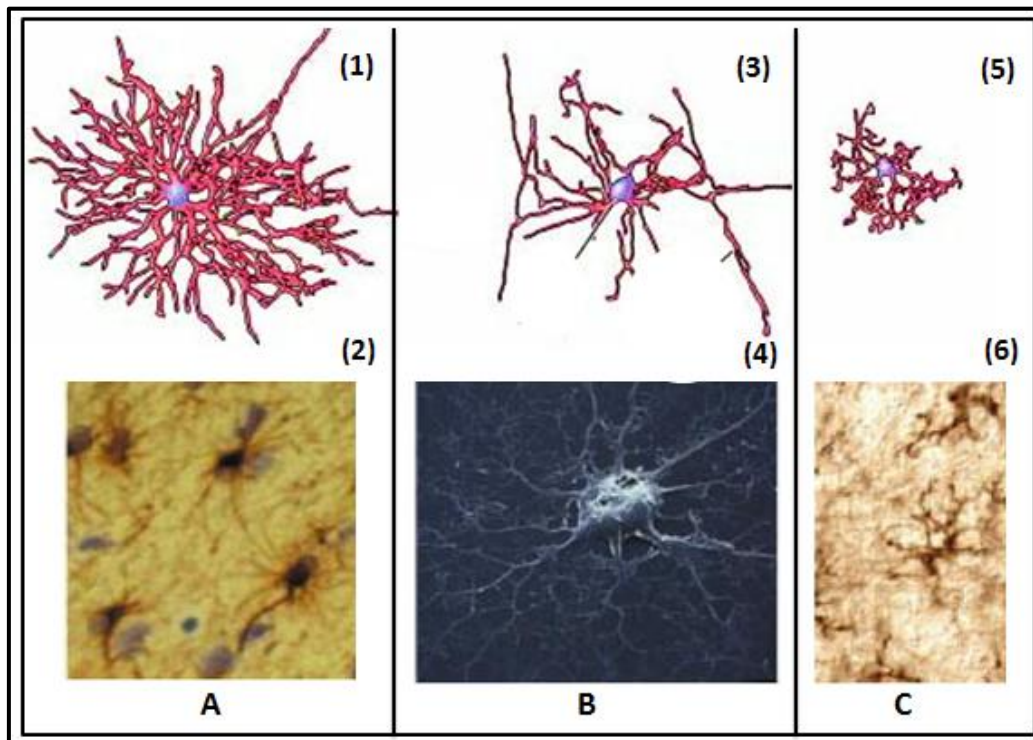


Figure 06: Différents types des cellules gliales. A: (1) schéma représente les astrocytes, (2) Astrocytes dans le cerveau marqués avec un anticorps contre la protéine spécifique des astrocytes (protéine acide fibrillaire gliale). B: (3) schéma représente cellule oligodendrogliale, (4) Une micrographie électronique à balayage d'une seule cellule oligodendrogliale imagée en culture tissulaire. C: (5): schéma représente cellule microgliale, (6): Une cellule microgliale de la moelle épinière, marquée avec un anticorps spécifique au type de cellule. (Purves et al, 2001).

I.3.2.3. Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales spécialisées qui sont plus de cinq fois plus nombreuses que les neurones. Ils recouvrent l'ensemble du système nerveux central (SNC) de manière contiguë et exercent de nombreuses fonctions complexes essentielles dans le SNC sain. Les astrocytes répondent à toutes les formes d'insultes du SNC par un processus appelé astrogliose réactive, qui est devenue une caractéristique pathologique des lésions structurales du SNC (Sofroniew & Vinters, 2009).

Chapitre I: Etude Bibliographique

Les astrocytes sont de petites cellules étoilées dont le corps cellulaire à un diamètre d'environ 10 microns et dont les prolongements cellulaires s'étendent de façon radiée. Au plan ultra structural, les astrocytes présentent 3 principales caractéristiques :

- La présence des filaments intermédiaires particuliers, les gliofilaments. Ces filaments intermédiaires sont groupés en faisceaux et sont composés de protéine acide gliofibrillaire (GFAP) une protéine spécifique des astrocytes.
- La présence des grains de glycogène, disséminées dans le corps cellulaire, les prolongements cytoplasmique et plus particulièrement au niveau des extrémités distales de ces prolongements : les pieds astrocytaires.
- La présence des jonctions inter astrocytaires de type "gap" qui permettent la signalisation intercellulaire via des canaux jonctionnels constitués de molécules de connexine 43. Ces jonctions sont le support anatomique de réseaux fonctionnels astrocytaires qui viennent se superposer aux réseaux neuronaux (**Sofroniew et Vinters, 2009**).

Une des caractéristiques essentielles des astrocytes est la formation d'une glie, limitant autour de chaque vaisseau du système nerveux central et sur toute la surface du cerveau. Cette cellule gliale est constituée de pieds astrocytaires plus ou moins larges, formant une lame basale du côté des cellules endothéliales ou des cellules de la pie mère. Ils constituent, ainsi, une frontière vis à vis des vaisseaux sanguins et des méninges. Forment également une frontière entre le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Ces cellules interviennent aussi dans le maintien de l'intégrité du système nerveux central en formant avec des cellules endothéliales la barrière hémato-encéphalique (BHE) (**Sofroniew et Vinters, 2009**).

Dans des situations non physiologiques, les astrocytes ont également un rôle de neuroprotection et de détoxification. Elles sont capables de capter les toxiques, et plus particulièrement les métaux, par des récepteurs spécialisé (**Sofroniew et Vinters, 2009**).

I.3.2.3.1. Classification des astrocytes

- a. classification morphologique :** Les techniques histologiques classiques ont permis de diviser les astrocytes en deux catégories:
- **les astrocytes fibrillaires** (ou fibreux) présentent de longs prolongements radiaires, sont riches en gliofilaments et sont localisés préférentiellement au niveau de la substance blanche.

- **les astrocytes protoplasmiques** sont localisés préférentiellement au niveau de la substance grise du système nerveux central. Présentent des prolongements courts, contiennent peu de gliofilaments

Ce sont les principales morphologies adoptées par les astrocytes mais des sous-populations astrocytaires spécifiques de certaines régions du SNC peuvent adopter d'autres morphologies (**Sofroniew et Vinters, 2009**).

b. Classification fonctionnelle : On distingue :

- **les astrocytes de type 1:** Ils jouent un rôle de barrière et leurs pieds astrocytaires établissent des contacts soit avec la paroi des capillaires, soit avec les méninges.
- **les astrocytes de type 2:** jouent un rôle de soutien métabolique et trophique vis-à-vis des neurones et des oligodendrocytes. Leurs pieds astrocytaires établissent des contacts soit avec la synapse, soit avec l'axone, soit au niveau du corps cellulaire neuronal (**Sofroniew et Vinters, 2009**).

I.3.2.3.2. Fonctions des astrocytes

Les astrocytes jouent un rôle importants dans le système nerveux, ils ont plusieurs fonctions tels que: l'homéostasie des ions (Ca^{2+} , K^{+}) et de l'eau, la défense contre le stress oxydatif, le stockage d'énergie, la biogenèse des mitochondries, la formation de cicatrices, la réparation des tissus via l'angiogenèse et la neurogenèse, et la modulation des synapses. Après une lésion du SNC, les astrocytes communiquent avec les systèmes neuronaux et vasculaires environnants, conduisant à la clairance des agrégats de protéines spécifiques à la maladie, tels que l' α -amyloïde et la synucléine (**Kim et al, 2019**). Dans le même temps, les astrocytes peuvent participer à la réponse inflammatoire et jouer un rôle clé dans la progression des maladies neurodégénératives. Les astrocytes réactifs sont fortement induits par de nombreuses pathologies du SNC. La réactivité des astrocytes est initialement caractérisée par une hypertrophie du soma et des processus, déclenchée par différentes molécules (**Li et al, 2019**).

I.3.3. Barrière hématoencéphalique (BHE)

Les vaisseaux sanguins sont essentiels pour fournir de l'oxygène et des nutriments à tous les tissus et organes du corps. Les vaisseaux sanguins qui vascularisent le système nerveux central

Chapitre I: Etude Bibliographique

(SNC) possèdent des propriétés uniques, appelées barrière hémato-encéphalique, qui permettent à ces vaisseaux de réguler étroitement le mouvement des ions, des molécules et des cellules entre le sang et le cerveau. Ce contrôle précis de l'homéostasie du SNC permet une fonction neuronale appropriée et protège également le tissu neural des toxines et des agents pathogènes. (**Daneman & Prat, 2015**).

II.1. Matériel biologique

Nous avons exploité une partie des résultats des expériences précédentes réalisées par Monsieur KHENE et ces étudiants (les résultats exploités sont: les données brutes des tests de l'équilibre motrice, traitement d'image pour les lames d'histologie et d'immunohistochimie).

Rappel

L'étude a été réalisée sur un nombre de 20 rats blancs mâles Albino de souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur Kouba, Alger), ayant un poids corporel entre 150-200 g. Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de la recherche expérimentale, distribués sur deux lots (10 rats dans chaque lot) d'une façon aléatoire.

II.2. Conditions de l'expérience

Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de 10 jours environ, aux conditions d'animalerie, à une température voisine de 25°C et une photopériode 12/12h. Les rats sont élevés dans des cages en plastique dimension: 290x180x160mm qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les 02 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec des pains secs.

II.3. Traitement des rats

Les rats ont été disposés en deux, il s'agit de :

- **Lot 01:** 10 rats témoins ont reçu l'eau distillée administrée par voie orale (gavage).
- **Lot 02:** 10 rats ont été traités par le méthomyl soluté dans l'eau distillée administrée par voie orale (gavage) à raison de 1/16 de la DL50 de pesticide à 9h-11h pendant 28 jours.

II.4. Test de barre horizontale

C'est un test permettant d'évaluer l'équilibre et la coordination motrice. Les tests ont été réalisés chaque semaine (Figure 08) le matin (entre 10h00 et 11h00) dans une pièce spécifique dédiée à cet usage dont la luminosité a été contrôlée (Lampe blanche normale de 50 w (environ 10 lux)). Tous les tests ont été effectués dans des conditions non anxiogènes. Le rat est placé au centre de la poutre ronde et la distance parcourue (nombre de segments (chaque segment de 5 cm)) est mesurée durant 1 minute. La chute et la latence avant la chute sont notées. Entre chaque essai la poutre est nettoyée à l'eau afin de minimiser les odeurs.

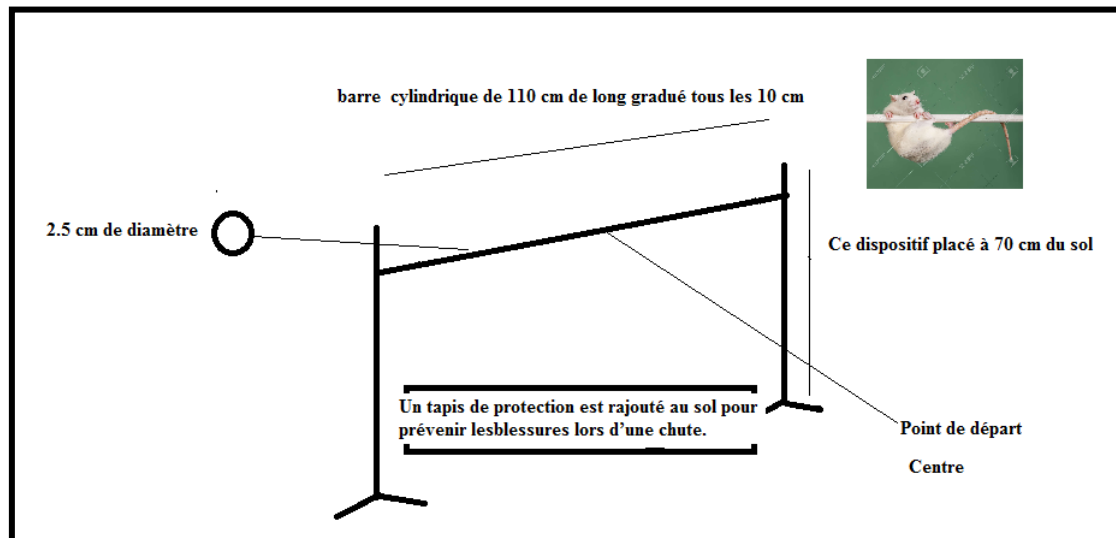


Figure 07 : Schéma de la barre horizontale pour évaluer l'équilibre motrice

II.4.1. Analyse statistique

Les données ont été exprimées en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Les données ont été analysées par analyse unidirectionnelle de la variance et les différences entre les groupes ont été évaluées à l'aide du test de Student - Newman - Keuls. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0.05$. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de l'Excel

II.5. Sacrifice et extraction du cervelet

Après les 28 jours de traitement les rats (témoins et traités) ont été sacrifiés "par décapitation". Les cervelets ont été rapidement prélevés, rincés avec l'eau distillée et conservés totalement dans le formol 10 % pour une étude histologique.

Le diagramme suivant récapitule les différentes étapes du protocole expérimental utilisé.

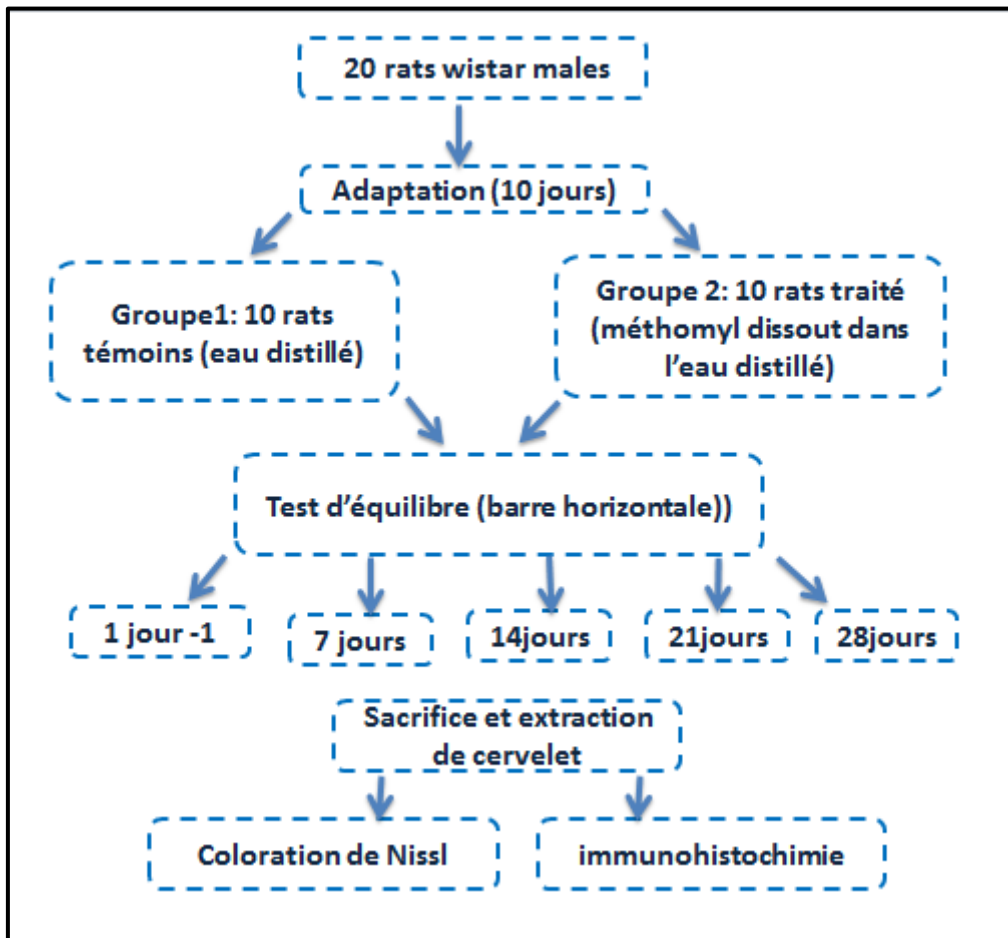


Figure 08: schéma représente les différentes étapes de protocole expérimental

II.6. Méthodes histologiques

Dans le but d'examiner la disposition cellulaire, structurale et moléculaire des tissus et organes, les chercheurs utilisent la méthode de coloration histologique. Dans cette technique, il a été utilisé des produits chimiques fixatifs pour préserver le tissu d'intérêt et ensuite sectionné, ou découpé en tranches très fines. Les techniques histologiques sont fréquemment appliquées pour visualiser et étudier les tissus du système nerveux.

II.6.1. Coloration de Nissl

La coloration de Nissl également appelée coloration au crésyl violet car elle colore les neurones qui contiennent la substance de Nissl. La substance de Nissl est une organisation en amas du réticulum endoplasmique rugueux. Le crésyl violet colore le noyau et les corps de Nissl, tout particulièrement les ribosomes du réticulum endoplasmique granulaire. Cette coloration est notamment utilisée en neurosciences pour compter les neurones et évaluer la perte neuronale dans des cas pathologiques

II.6.1.1. Mode opératoire

Tableau 03: les différentes étapes de coloration de Nissl.

	Solution/appareil	Bains	Température	Temps
Fixation	PFA 10% (Paraformaldéhyde)	-	-	-
Rinçage	Eau de robinet	-	-	2h
Déshydratation	Ethanol 50%	1	-	10 min
	70%	1	-	10 min
	90%	1	-	10 min
	100%	1	-	10 min
Eclaircissement	Toluène 100%	1	-	10 min
Imprégnation	Paraffine / Etuve	1	57 ⁰ C	2h
Confection de block	Moule inox	-	-	3h
	plaque chauffante	-	-	
Coupe	Microtome 0.5 µm	-	-	-
Etallement	Plaque chauffante	-	37 ⁰ C	10 min
Déparaffinage	Toluène	-	37 ⁰ C	-
Hydratation	Ethanol 100%	1	-	10 min
	90%	1	-	10 min
	70%	1	-	10 min
	50%	1	-	10 min
Coloration	Violet de crésyl à 0.1%	1	-	20 min
Rinçage	Eau distillé	2	-	5 min
Déshydratation	Ethanol 50%	1	-	10 min
	70%	1	-	10 min
	90%	1	-	10 min
Eclaircissement	Toluène	1	-	10 min
Séchage	Etuve	-	37 ⁰ C	1 à 2 h
Montage	Colle + lamelle	-	-	-
Observation e	Microscope optique	-	-	-

II.6.2. Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode d'étude morphologique utilisée en histo- et cytopathologie depuis plus de vingt ans. Elle met en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'une réaction spécifique antigène-anticorps, le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré. L'immunohistochimie permet au pathologiste préciser son diagnostic au maximum, elle donne au clinicien la possibilité de choisir le traitement optimal pour son patient.

II.6.2.1. Mode opératoire

Tableau 04: les différentes étapes de l'immunohistochimie

	Solution/appareil	Bains	Température	Temps
Déparaffinage	Xylène	3	-	5 min
Lavage	Alcool benzylique			
	96%	-	-	5 min
	80%	-	-	5 min
	70%	-	-	5 min
Rinçage	Eau distillé	-	-	-
Incubant de tissu	Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) 3%	1	-	10 min
Rinçage	Eau distillé	1	-	-
Démasquage d'antigène	Tampon Tris - EDTA buffer pH9.0, 0.05 % Tween- 20	-	-	-
Incubation	Bain marie	-	95 ⁰ C	30 min
Refroidissement	Tampon Tris- EDTA buffer, pH 9.0	-	Température ambiante	15 min

Chapitre II: Matériel et méthode

Rinçage	Eau distillé	-	-	-
Lavage	Tampon Tris- Hcl 0.05 M (pH=7.6) avec 0.2% de Tween -20 (Tampon A)	1	-	5 min
Application d'anticorps primaire dilué anti GFAP	Anti corps dilué dans: Tampon Tris- Hcl 0.05 M (pH=7.6) avec 0.05% de Tween - 20 selon une dilution comprise entre 1/100 et 1/200	1	Chambre humide	1h
Lavage	Tampon A	2	-	5 min
Application d'anticorps secondaire	l'anticorps secondaire dilué dans 5% de sérum 0.3% Triton-X 100	-	-	30 min
Lavage	Tampon A	2	-	5 min
Ajout de chromogène (DAB)	DAB (3,3'- Diaminobenzidine)	-	-	10 min
Rinçage	Eau distillé	-	-	-
Coloration	L'hématoxyline	-	-	5 min
Lavage	Eau distillé	-	-	10 min
Déshydratation de tissu	Alcool benzylique à 96 %	2	-	5 min chacun
Lavage	xylène	2	-	2 min chacun
Montage	Colle + lamelle	-	-	-
Observation	Microscope optique	-	-	-

III.1.Résultats

III.1.1. Résultats de test Barre horizontale

Les résultats ci-dessous (Figure 09) ont montrés que l'exposition au MET pendant 28 jours provoque une diminution très significative $P < 0.01$ dans l'équilibre motrice des rats intoxiqué ($2,8 \pm 0,9$) par rapport aux rats témoins ($8,8 \pm 0,5$).

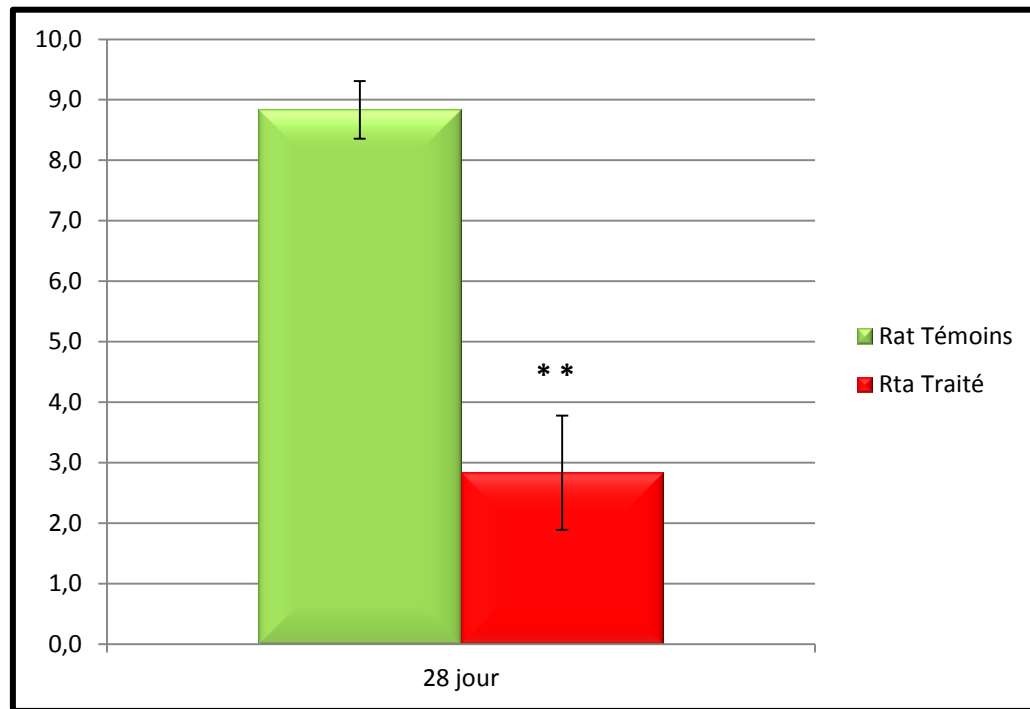


Figure 09: Histogramme représente l'effet de MET sur l'équilibre et la coordination motrice chez les rats

III.1.2. Résultats de la coloration de Nissl

La figure ci-dessous (Figure 11) illustre l'effet de MET sur les cellules de Purkinje au niveau de cervelet après 28 jours de traitement. Où a été observé les cellules de Purkinje qui ont un aspect morphologiques normales chez les rats témoins traités par l'eau distillé et chez les rats traités par le MET un aspect anormal.

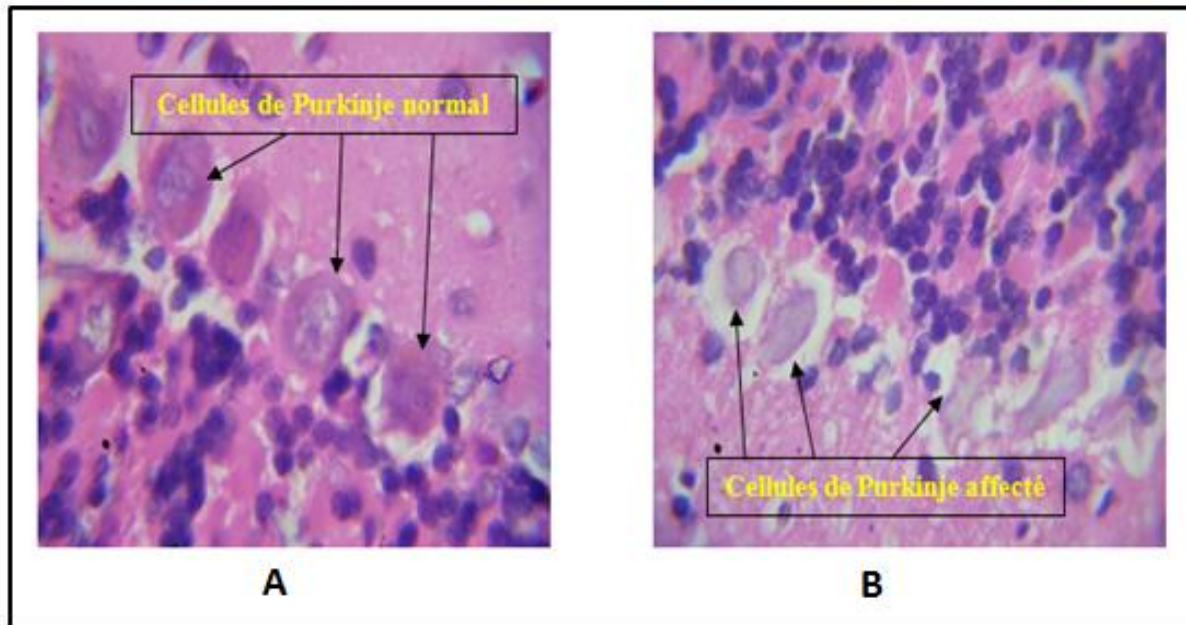


Figure 10: Photographies montrant les différents traitements (Coloration de Nissl) sur les cellules de Purkinje au niveau du cervelet pendant 28 jours chez les rats. (A): Cellules de Purkinje normale chez le groupe des témoins traité par l'eau distillé. (B): Cellules de Purkinje morphologiquement affecté présentent des lésions chez des rats exposé à l'insecticides MET, observés sous le microscope photonique (GX400).

III.1.3. Résultats de l'immunohistochimie

Figure ci- dessous (Figure 11) représente l'effet de MET après 28 jours sur l'expression de GFAP par la méthode de l'immunomarquage sur des coupes histologiques de cervelet des rats, où montre une augmentation de l'expression de GFAP aux rats traités par rapport aux rat témoins.

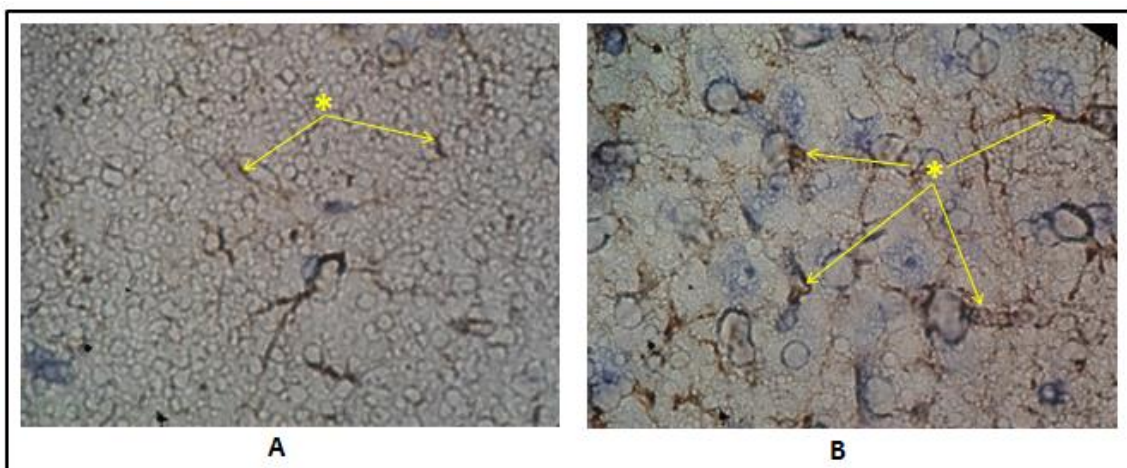


Figure 11: L'effet de MET sur la réactivité des astrocytes révéler par immunomarquage de la GFAP. (A): chez les rats témoins (eau distillé). (B): chez les rats intoxiqué par MET, observés sous le microscope photonique (GX400). (*): L'expression de GFAP

III.2. Discussion

De récentes études épidémiologiques suggèrent que les pesticides pourraient contribuer au développement de maladies neurodégénératives, comme les maladies de parkinson et d'Alzheimer. Au sein de la famille des pesticides, les insecticides sont souvent les plus incriminés pour leur caractère neurotoxique (**Thany et al 2013**).

Le MET est un insecticide de type carbamate peut être à l'origine de certains maladies neuropsychiatriques et neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (**Seleem, 2019**).

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent qu'après une exposition subchronique au MET, une diminution très significative ($P < 0.01$) dans l'équilibre et la coordination motrice pour les rats intoxiqué par le méthomyl par rapport aux rats témoins.

Ces résultats sont similaires à ceux d'autres études chez des rats traités par les insecticides suivants: Sumithion (**Lehotzky et al, 1989**), Chlorpyrifos (**Adedara et al, 2018**), Parastar (**Kada Sanda et al, 2020**). Ces études montrent que l'exposition subchronique de ces pesticides induit une diminution, des troubles dans l'équilibre et la coordination motrice chez les rats traités par rapport aux rats témoins.

Le cervelet est la région du cerveau la plus importante dans la coordination des séquences motrices. Il contrôle également l'équilibre et la posture, donc toute lésion cérébelleuse peut entraîner une perte de coordination et équilibre motrice (**Knierim, 2020**).

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent qu'après l'administration de methomyl par voie oral (gavage), est susceptible d'induire des effets neurotoxiques chez les rats traités pendant 28 jours. En particulier, des altérations de cellules de Purkinje au niveau de cervelet (rupture de la membrane plasmique, cytoplasme est condensé, accumulation anormale des macromolécules et Le noyau apparaît comme une région condensé).

Des résultats similaires sont retrouvés dans certaines études. Des lapins traités par l'insecticide Voliam Targo (**Mostefaoui et Benmira Zitouni, 2018**), l'examen histologique des tissus cérébelleux de ces lapins a révélé un espacement des cellules de Purkinje et un œdème interstitiel. L'observation microscopique des tissus cérébelleux des rats adultes intoxiqués par 3 pesticides pyréthrinoides (Allethrin, Imiprothrin, Phenothrin) a révélé une désorganisation légère a marquée, des structures cytoarchitecturales avec des multiples nécroses (**Igho et Afoke, 2014**).

Chapitre III: Résultats et Discussion

Des observations similaires ont été rapportées par **Ben Amara & al, (2014)** après exposition subaiguë des rats femelles au Fenthion (un insecticide organophosphoré), une réduction du nombre de cellules de Purkinje avec plus de cellules apoptotiques que les contrôles. 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 les rats a provoqué l'apparition des cellules Purkinje nécrosées avec perte de dendrites et de granules dans la couche granulaire de cervelet.

Les carbamates induisent un stress oxydatif cellulaire en affectant la fonction mitochondriale et perturbent donc l'état neuronal et hormonal du corps (**Karami-Mohajeri et Abdollahi, 2011**).

Plusieurs hypothèses suggèrent que les pesticides pourraient pénétrer dans les cellules directement au travers de la membrane ou grâce à des mécanismes de transport. Ainsi, ils pourraient agir directement sur l'équilibre NADH/NAD⁺ en augmentant les espèces réactives oxygénées qui perturberaient le fonctionnement mitochondrial, et ils pourraient également agir directement sur le complexe I de la chaîne respiratoire entraînant une augmentation des espèces réactives de l'oxygène, une induction des mécanismes apoptotiques par une libération du cytochrome et une activation des caspases, une altération de l'ADN nucléaire, ainsi qu'une oxydation et une agrégation des protéines, telles que l' α -synucléine (**Thany et al, 2013**).

Le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriale sont fréquemment affectés dans les maladies neurodégénératives. Le rôle crucial des mitochondries dans la physiologie neuronale en fait l'une des principales cibles des insecticides (**Thany et al, 2013**).

La barrière hémato-encéphalique joue un rôle très important dans la protection des neurones. Les perturbations du rôle protecteur de cette barrière induisent des complications de beaucoup de maladies neurodégénératives (**Daneman et Prat, 2015**). Elle est constituée d'une paroi vasculaire entourée par des astrocytes, Grâce à ces pieds astrocytaires, qui la couvrent, les échanges entre le sang et les neurones sont contrôlés (**Sofroniew et Vinters, 2009**). Ces astrocytes contrôlent aussi l'homéostasie cérébrale, les variations de concentration des neurotransmetteurs ou des neuro-hormones. Elles fournissent donc des conditions idéales au développement et à la survie des neurones (**Kim et al, 2019**). Si le SNC est endommagé par une substance toxique, les astrocytes réagissent rapidement (**Li et al, 2019**).

Chapitre III: Résultats et Discussion

La GFAP est une protéine très important dans les interactions des astrocytes avec d'autres cellules nerveuses (**Yang et Wang, 2015**). Dans ce contexte les résultats de l'immunomarquage de GFAP montrent que la présence de MET au niveau de cervelet conduit à une réactivité anormal des astrocytes. Cette réactivité anormale des astrocytes est caractérisée par une surexpression de la GFAP, pour combattre les substances toxiques et protéger les neurones.

Des études récentes ont également montré que dans l'apparition et le développement de maladies neurodégénératives, le niveau d'expression de la GFAP, dans les astrocytes est augmenté. Fait remarquable, pour la plupart des patients atteints d'une maladie neurodégénérative, les astrocytes réactifs sont omniprésents dans les tissus du SNC (**Kunyu & al, 2019**).

Donc d'après tous ces résultats de diminution de l'équilibre et la coordination motrice, l'altération des cellules de Purkinje et les signes de la réactivité des cellules astrocytaires au niveau du cervelet des rats traités par le methomyl, indiquent que le MET a un effet de toxicité sur le système nerveux et plus sur le cervelet ce qui peut être l'origine de plusieurs maladies.

Conclusion

Aujourd'hui les effets des pesticides sur la santé humaine constituent une préoccupation majeure. Ce travail nous a permis de contribuer à la connaissance des effets neurotoxique de pesticide méthomyl après une exposition sub-chroniques de 28 jours sur le cervelet et l'équilibre motrice chez les rats Wistar.

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que: le méthomyl affecte l'équilibre et la coordination motrice (une diminution très significative) des rats intoxiqué en raison de l'altération des cellules de Purkinje au niveau du cervelet. Ainsi une augmentation dans la réactivité des astrocyte ce qui confirme le rôle joué par les astrocytes pour protéger les neurones.

Il s'avère intéressant d'approfondir ces conclusions par :

- La reconnaissance de divers mécanismes moléculaires impliquée dans cette neurotoxicité au niveau de cervelet .
- La détermination de différents mécanismes de protection impliquée par les astrocyte lors de la toxicité par les pesticides

ملخص

المبيدات هي منتجات تستخدم لمكافحة آفات الزراعة والصناعات المختلفة و المنازل و الحدائق. لقد تم استخدامها بكميات كبيرة على مدى العقود الماضية وانتشارها الرهيب يهدد البيئة والصحة، و خاصة الجهاز العصبي.

في هذا العمل سوف ندرس تأثير الميثوميل على التوازن والتنسيق الحركي وعلى تفاعل المخيخ والخلايا النجمية بعد التعرض المزمن له.

تلقي عشرة فئران من ذكور ويستار جرعة مقدارها 16/1 من الجرعة الوسطى المميّنة من الميثوميل مذابة في الماء المقطر وحصلت عشرة فئران الشاهدة على الماء المقطر لمدة 28 يومًا. في نهاية التجربة تمت دراسة احصائيات توازن الفئران واختبار التنسيق الحركي. ثم تم التضحية بها و إزالة المخيخ. تم فحص مورفولوجيا خلايا بركنجي في مخيخ الفئران بواسطة تلطيخ نيسل و دُرس أيضًا تفاعل الخلايا النجمية في المخيخ.

أظهرت نتائجنا أن التعرض للميثوميل تسبب في انخفاض كبير جدًا في التوازن والتنسيق الحركي عند الفئران المسكرة مقارنة بالفئران الشاهدة ، و تغيرات مورفولوجية في خلايا بوركينجي المخيخية وزيادة التعبير عن البروتين الحمضي الليفي الدبقي بواسطة الخلايا النجمية.

الكلمات المفتاحية: ميثوميل ، المخيخ ، التوازن الحركي ، البروتين الحمضي الليفي الدبقي، الخلايا النجمية.

Abstract

Pesticides are products used to control pests in agriculture, various industries, homes and gardens. They have been used in large quantities in recent decades and their terrible spread threatens the environment and health, especially the nervous system.

In this work we will study the effect of methomyl (MET) on motor balance and coordination and on the cerebellum and reactivity of astrocytes after sub-chronic exposure.

Ten adult male Wistar rats are given 1/16 lethal dose 50 (LD50) by gavage of MET dissolved in distilled water and 10 control rats are given distilled water for 28 days. At the end of the experiment, the balance test statistic and the motor coordination of rats were studied. Then were sacrificed and the cerebellum is taken. The morphology of Purkinje cells at the cerebellum level of rats was examined by Nissl staining and the reactivity of astrocytes at the cerebellum level was also studied.

Our results showed that exposure to TEM causes a very significant decrease in balance and motor coordination in intoxicated rats compared to controls, morphological changes in cerebellum Purkinje cells and increased expression of GFAP (glial fibrillary acid protein) by astrocytic cells had also shown

Keywords: Methomyl, cerebellum, motor balance, GFAP, astrocytes.

Bibliographie

- Adedara, I. A., Owoeye, O., Awogbindin, I. O., Ajayi, B. O., Rocha, J. B., et Farombi, E. O. (2018). Diphenyl diselenide abrogates brain oxidative injury and neurobehavioural deficits associated with pesticide chlorpyrifos exposure in rats. *Chemico-biological interactions*, 296, 105-116.
- Ait Mohammed, K., et Imadouchene, S. (2017). *Contribution à l'étude de l'utilisation des pesticides dans les régions de Fréha et d'Azeffoun (Tizi-Ouzou)* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Amara, B., Sefi, M., Troudi, A., Soudani, N., Boudawara, T., & Zeghal, N. (2014). Fenthion, an organophosphorus pesticide, induces alterations in oxidant/antioxidant status and histopathological disorders in cerebrum and cerebellum of suckling rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 51(4), 293-301.
- Ayad-Mokhtari, N. (2012). Identification et dosage des pesticides dans l'Agriculture et les problèmes d'environnement liés. *Mémoire de Magister, Univ. d'Oran*, 87.
- Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., Elbaz, A., Gamet-Payrastre, L., Lebailly, P., ... et van Maele-Fabry, G. (2013). *Pesticides: effets sur la santé* (Doctoral dissertation, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM)).
- Batsch, D. (2011). *L'impact des pesticides sur la santé humaine* (Doctoral dissertation, UHP- Université Henri Poincaré).
- Calvet R, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, CharnayMP, Et Coquet Y. (2005): Les pesticides dans le sol : conséquences organiques et environnementales. Paris : Edition France agricole; 637 p.
- Castel, JP. Le système nerveux central, Site visité le 04/06/2021 [En ligne], URL: https://www.unilim.fr/campus-neurochirurgie/article.php3?id_article=162&artsuite=1
- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M., et Vitalone, A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci*, 13(4), 1240-1249.
- Daneman, R., et Prat, A. (2015). The blood–brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a020412.
- Djennas, N. (2017). Thiamethoxam Actara® induced alterations in kidney liver cerebellum and hippocampus of male rats. *Journal of xenobiotics*, 7(1), 25-30.
- Fillatre, Y. (2011). *Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem* (Doctoral dissertation, Université d'Angers).

- GASMI, S. (2018). La Neurotoxicité de deux Pesticides (Acétamipride et Deltaméthrine) et la prévention de cette toxicité par la Quercétine chez les rats (Doctoral dissertation, Université de Tébessa-Larbi Tébessi).
- Hautbois, A. L. (2014). *Le neuromarketing peut-il s'appliquer en santé publique?* (Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Igho, O. E., et Afoke, I. K. (2014). A histomorphologic analysis of pyrethroid pesticide on the cerebrum and cerebellum of adult albino rats. *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*, 13(2), 54.
- Kada Sanda, A., Nantia, A. E., Manfo, T. P., Toboh, R. T., Abende, R. E., Adaibum, S., ... et Kamtchouing, P. (2020). Subchronic administration of Parastar insecticide induced behavioral changes and impaired motor coordination in male Wistar rats. *Drug and chemical toxicology*, 1-9.
- Karami-Mohajeri, S., et Abdollahi, M. (2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human & experimental toxicology*, 30(9), 1119-1140.
- Kendra, C. What Is the Cerebellum?, Site visité le 14/05/2021 [En ligne], UR: <https://www.verywellmind.com/what-is-the-cerebellum-2794964>
- Mercury, M. (1990). International programme on chemical safety. Environmental health criteria, 118.
- Miall R.C. (2016) Cerebellum: Anatomy and Function. In: Pfaff D., Volkow N. (eds) Neuroscience in the 21st Century. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3474-4_38
- Khaldoun-Oularbi, H., Bouzid, N., Boukreta, S., Makhlof, C., Derriche, F., & Seleem, A. A. (2019). Teratogenicity and neurotoxicity effects induced by methomyl insecticide on the developmental stages of *Bufo arabicus*. *Neurotoxicology and teratology*, 72, 1-9.
- Kim, Y., Park, J., & Choi, Y. K. (2019). The role of astrocytes in the central nervous system focused on BK channel and heme oxygenase metabolites: A review. *Antioxidants*, 8(5), 121.
- Knapp, S. Glial Cells, Site visité le 06/06/2021 [En ligne], URL: <https://biologydictionary.net/glial-cells/>
- Knierim, J. Chapter 5: Cerebellum, Site visité le 20/04/2021 [En ligne], URL: <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s3/chapter05.html>
- Lanoue, V. (2012). Rôle du récepteur BAI3 dans le développement neuronal-Études in vitro et in vivo (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

- Lehotzky, K., Szeberenyi, M. J., et Kiss, A. (1989). Behavioral consequences of prenatal exposure to the organophosphate insecticide sumithion. *Neurotoxicology and teratology*, 11(3), 321-324.
- Li, K., Li, J., Zheng, J., et Qin, S. (2019). Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Aging and disease*, 10(3), 664
- Louchahi, M. R. (2015). *Enquête sur les conditions d'utilisation des pesticides en agriculture dans la région centre de l'algérois et la perception des agriculteurs des risques associés à leur utilisation* (Doctoral dissertation, INA).
- Morton, S. M., et Bastian, A. J. (2004). Cerebellar control of balance and locomotion. *The neuroscientist*, 10(3), 247-259.
- Mortensen, S. R., et Serex, T. L. (2014). Methomyl, 242-245
- Mostefaoui, A; et Benmira zitouni, K. (2018). Etude histologique et immunohistologique du cerveau et cervelet chez le lapin Traité par le Voliam Targo. *Mémoire de Master, Univ. Université de Blida 1*, 65.
- Olivier, G. Qu'est-ce que le cervelet ? Quel est son rôle ?, Site visité le 19/05/2021 [En ligne], URL: <https://www.csc.asso.fr/article/connaître/49/>
- Ouahioune, N. Le cervelet : organisation anatomique et fonctions, Site visité le 10/04/2021 [En ligne], URL: <http://acces.ens-lyon.fr/biotic/gpe/dossiers/mutcer/html/synthcerv.htm>
- Ouali, F., et Gagaoua, Y. (2012). Suivi de la variabilité de l'utilisation des pesticides dans le bassin versant de la Soummam. *Mémoire de Master, Univ. A. Mira de Bejaïa*, 61.
- Pierre-Gérard, P. Insecticides carbamates, Site visité le 21/05/2021 [En ligne], URL: <https://www.em-consulte.com/article/11996/insecticides-carbamates4>
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Katz, L., LaMantia, A., McNamara, J., & Williams, S. (2001). *Neuroscience 2nd edition*. Sunderland (ma) sinauer associates. Types of Eye Movements and Their Functions.
- Roux, S., & Bossu, J. L. (2016). Le cervelet: des troubles moteurs à l'autisme. *Revue de neuropsychologie*, 8(3), 182-191.
- Sofroniew, M. V., et Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7-35.
- Thany, S. H., Reynier, P., et Lenaers, G. (2013). Neurotoxicité des pesticides-Quel impact sur les maladies neurodégénératives?. *médecine/sciences*, 29(3), 273-278.

- Testud, F., et Grillet, J. P. (2007). Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. *Encycl med chir*, 16.
- Van Scoy, A. R., Yue, M., Deng, X., & Tjeerdema, R. S. (2013). Environmental fate and toxicology of methomyl. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 93-109.
- Yang, Z., et Wang, K. K. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in neurosciences*, 38(6), 364-374.
- Zayia, L. C., & Tadi, P. (2020). Neuroanatomy, Motor Neuron. StatPearls [Internet].