

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

**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**



**Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques**

**Département de Biologie**

**MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE**

**En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Sciences biologiques**

**Spécialité : Biologie et Physiologie de la Reproduction**

**THÈME**

**Expression et importance des protéines du cytosquelette subcortical dans les structures histologiques du testicule et épидидyme du rat "Wistar" traité au thiaméthoxame.**

**Réaliser par :**

- Melle **BOUZEGGANE Samia.**
- Melle **IRIDA Dehbia.**

**Soutenu devant le jury composé de :**

<b>Présidente</b>	<b>Mme CHERFAOUI DJ.</b>	<b>Maître de conférences B</b>	<b>FSBSA-UMMTO</b>
<b>Promotrice</b>	<b>Mme BENABDESSELAM R.</b>	<b>Professeure</b>	<b>FSBSA-UMMTO</b>
<b>Co-Promotrice</b>	<b>Mme TOUNSI F.</b>	<b>Doctorante</b>	<b>FSB-USTHB</b>
<b>Examinatrice</b>	<b>Mme GUENDOUIZI S.</b>	<b>Maître assistante A</b>	<b>FSBSA-UMMTO</b>

**2022 - 2023**

# *Remerciement*

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui nous ont aidées lors de la rédaction de ce mémoire.

En préambule, nous aimerions exprimer toute notre gratitude à notre promotrice **Mme BENABDESSELAM R**, Professeure à l'université de Tizi-Ouzou, qui a su nous faire bénéficier de son expérience et de sa compétence, qui a encouragé nos aspirations scientifiques et qui nous a conseillé tout au long de la réalisation de ce projet. Nous vous remercions d'avoir accepté de nous encadrer et de diriger notre travail avec rigueur scientifique et pragmatisme, malgré vos multiples occupations. Vos qualités humaines suscitent respect et admiration.

Nous souhaitons tout particulièrement remercier notre Co-promotrice **Mme TOUNSI F**, pour sa disponibilité et son aide et le temps qu'elle nous a consacré tout au long de notre travail.

Nous tenons à remercier plus particulièrement **Mme GUENDOUI S**, Maitre assistante (A) à l'UMMTO, pour sa précieuse contribution à notre encadrement et son immense générosité de nous avoir fourni le kit des solutions de révélation du marquage d'immunohistochimiques. Son soutien et son aide tout au long de notre parcours ont été inestimables et nous sommes très reconnaissants d'avoir l'opportunité de bénéficier de ses connaissances et de son expertise.

Nous tenons également à remercier **Mme CHERFAOUI DJ**, Maitre de conférences (B) à l'UMMTO qui nous fait un grand honneur en acceptant de présider ce jury.

Nous remercions s'orientent ensuite vers **Mme GUENDOUI S**, Maitre assistante (A) à l'UMMTO qui nous fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous remercions enfin tous ceux et celles que nous n'avons pas mentionnées, mais qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

# *Dédicaces*

À mon très cher père KAMEL

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je tiens à te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucun mot ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours pour toi.

Je t'aime Vava.

À ma très chère mère DJAMILA

Source inépuisable de tendresse, de patience. Je tiens à te remercier pour tous les sacrifices que t'ont faits pour moi et de m'avoir aidé de mieux que tu peux pour que je puisse réussir... Tes prières et ta bénédiction m'ont été de grands secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne saurai point te remercier comme il se doit.

Je t'aime Yema.

Je remercie Dieu de m'avoir donné les meilleurs parents au monde, que Dieu vous protège et vous accorde santé, longue vie et bonheur mes chers parents.

À mon très cher frère LYES

Merci pour ta présence, ton affection et la complicité qui nous lie depuis que nous sommes tout petits. Je te souhaite du bonheur, de la santé, de la réussite et de succès, que Dieu te protège et te garde.

Je t'aime à Gema.

À mes très chers oncles SOFIANE, DJAMEL, KARIM, FARID

Merci pour votre présence, vous m'avez encouragée et soutenue dans tout ce que je voulais faire durant toutes ces années. Ce travail est aussi le vôtre. Je vous aime.

À mes très chères grands-mères Ouardia

À tous ceux que j'aime, de ma chère famille paternelle et maternelle ....

À toutes mes amies pour les beaux moments vécus tout au long de notre cursus et à toutes les personnes qui comptent pour moi pour l'aide, l'encouragement, le soutien et la bienveillance.

À ma binôme DEHBIA pour tous ses efforts, sa persévérance qui on permet de réaliser ce travail, merci pour tout.

Et enfin à tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer.

*B. SAMIA*

# *Dédicaces*

Je remercie en premier lieu « Allah » le miséricordieux de m'avoir donnée la force, volonté, et la patience durant toutes mes années d'études.

*À ma très chère Maman et mon très cher papa*

À vous et à vous seuls, je m'incline avec tout le respect et l'amour, pour vous dire merci et je remercie Dieu de m'avoir donné les meilleurs parents au monde.

À celle qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi, qui s'est toujours dévouée et sacrifiée pour moi, celle qui m'a aidée du mieux qu'elle pouvait pour réussir, celle qui a toujours été là dans mes moments de détresse, ma très chère mère  
*OUIZA.*

À celui qui m'a toujours encouragé et soutenu moralement dans tout ce que j'ai entrepris, à celui qui est toujours à mes côtés dans le malheur et le bonheur, mon très cher père  
*MOHAMMED.*

Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

Je vous aime beaucoup.

*À ma seule sœur*

Mon soutien dans la vie qui n'a jamais cessé de me conseiller, encouragé. Sans votre écoute et amour, je ne serai pas arrivé au bout, ma sœur *FARIDA.*

*À mes chers frères HAMZA, MASSI, RAYANE.*

Merci pour votre présence, votre affection et la complicité qui nous lie depuis que nous sommes tout petits. Je vous souhaite du bonheur, de la santé, de la réussite et de succès, que Dieu vous protège et vous garde.

*À mes très chers oncles AHMED, ALI.*

Aux petits-enfants de la famille *SIRINE, AYLANE, AKCEL.*

À ma famille, mes tantes et leurs belles-familles

Mes cousines et cousins.

À tous mes amis et à toutes les personnes qui comptent pour moi.

À ma binôme SAMIA pour tous ses efforts, sa persévérance qui ont permis de réaliser ce travail merci pour tout.

Enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je vous dis merci.

*I. DEHBIA*

# Sommaire

---

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
1. Néonicotinoïdes et Thiaméthoxame.....	4
1.1. Pesticides.....	4
1.1.1. Définition.....	4
1.1.2. Composition.....	4
1.1.3. Classification.....	4
1.2. Néonicotinoïdes.....	6
1.2.1. Définition.....	6
1.2.2. Famille des néonicotinoïdes.....	6
1.2.3. Utilisation des néonicotinoïdes.....	7
1.2.4. Mode d'action.....	7
1.3. Thiaméthoxame.....	8
1.3.1. Découverte.....	8
1.3.2. Définition.....	9
1.3.3. Utilisation et propriétés.....	10
1.3.4. Propriétés physico-chimiques du thiaméthoxame.....	10
1.3.5. Mécanisme d'action.....	12
1.3.6. Effet toxicologique.....	12
1.3.6.1. Informations toxicologiques.....	12
1.3.6.2. Toxicité aiguë.....	13
1.3.6.3. Toxicité chronique.....	13
1.3.6.4. Toxicité de la reproduction.....	13
2. Rappels anatomo-structuro-fonctionnels du testicule et de l'épididyme.....	14
2.1. Généralités sur l'appareil reproducteur mâle.....	14
2.2. Testicules et enveloppes testiculaires.....	15
2.1.1. Anatomie.....	15
2.2.2. Histologie du testicule.....	16
2.2.2.1. Tubes séminifères.....	16
2.2.2.2. Les cellules de la lignée germinale.....	17
2.2.2.3. Cellule de sertoli.....	19
2.2.2.4. Tissu interstitiel et cellule de Leydig.....	19
2.2.3. Fonction de testicule.....	20
2.2.3.1. Fonction exocrine des testicules : la spermatogenèse.....	20
2.2.3.2. Fonctions endocrine des testicules.....	21
2.3. Epididyme.....	22
2.3.1. Anatomie.....	22
2.3.2. Histologie.....	23
2.3.3. Fonctions physiologiques de l'épididyme.....	24
3. Dystrophines et protéines associés.....	25
3.1. Définition.....	25
3.2. Gène de la dystrophine.....	26
3.3. Structure de la dystrophine.....	26

## Sommaire

---

3.4. Les protéines associées à la dystrophine.....	27
3.4.1. Les protéines de structure.....	27
3.4.2. Les protéines de signalisation.....	27

## CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

<b>I. Matériels et Méthodes</b> .....	31
1.1.1. Matériel biologique.....	31
1.2. Méthodes.....	32
1.2.1. Traitement des animaux.....	32
1.2.2. Perfusion intra cardiaque et prélèvement des organes.....	32
1.3. Technique histologique.....	33
1.3.1. Post fixation.....	33
1.3.2. Lavage.....	33
1.3.3. Déshydratation et éclaircissement.....	33
1.3.4. Imprégnation.....	34
1.3.5. Inclusion.....	34
1.3.6. Confection des coupes et étalement.....	34
1.4. Technique immunohistochimique.....	36
1.4.1. Son principe.....	36
1.4.2. L'IHC à la peroxydase avec amplification.....	36
1.4.3. Etapes de l'IHC en pratique.....	37
1.4.3.1. Déparaffinage.....	37
1.4.3.2. Réhydratation.....	37
1.4.3.3. Démasquage des sites antigéniques et préincubation.....	37
1.4.3.4. Blocage des sites spécifique.....	38
1.4.3.5. Incubation avec l'anticorps primaire.....	38
1.4.3.6. Révélation de signal.....	38
1.4.3.6.1. Incubation avec l'anticorps secondaire et Streptavidine peroxydase.....	38
1.4.3.6.2. Chromogène.....	39
1.4.3.6.3. Contre coloration.....	39
1.4.3.7. Montage des lames.....	39
1.4.3.7.1. Le rinçage et déshydratation.....	39
1.4.3.7.2. Le montage.....	39
1.5. Observation microscopique.....	40
1.6. Analyse morphométriques.....	40
1.7. Etude statistique.....	40
2. Quantification du marquage.....	41
<b>II. RESULTATS</b> .....	43
<b>III. DISCUSSION</b> .....	57
<b>IV. CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES</b> .....	64

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIES

## ANNEXES

## RESUME

## Liste des Figures et Tableaux

---

### Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Classification des pesticides (Nollet Leo ML et Rathore Hamire S, 2012). .....	5
<b>Figure 2</b> : Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones (Bodereau,2011). .....	8
<b>Figure 3</b> : Structure chimique du thiaméthoxame (Hamilton,2010). .....	10
<b>Figure 4</b> : Organisation anatomique de l'appareils uro-génitaux de rat mâle (Boutin et <i>al.</i> ,2015). .....	15
<b>Figure 5</b> : Schéma du testicule et de l'enveloppe testiculaire (Mieusset et Bujan, 1995).....	16
<b>Figure 6</b> : Coupe histologique du testicule de Souris vue au microscope optique (Heusser & Dupuy, 2015).....	16
<b>Figure 7</b> : Vue plus rapprochée au microscopie optique des tubes séminifères montrant les différentes cellules germinales d'un testicule de Souris (Heusser & Dupuy, 2015).....	17
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de la paroi d'un tube séminifère (Prudhomme, 2009). .....	18
<b>Figure 9</b> : Schéma de l'ultra structure de la cellule de Sertoli (Fawcett, 1975).....	19
<b>Figure 10</b> : Les étapes de la spermatogenèse (Marieb, 2006). .....	21
<b>Figure 11</b> : Anatomie et régionalisation de l'épididyme (Herme et Robaire, 2002 modifié). .....	22
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire (Girouard, 2009).....	23
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique de la dystrophine et des protéines et glycoprotéines associées au niveau d'une fibre musculaire (Rebecca et al.,2013). .....	25
<b>Figure 14</b> : Présentation de la position du gène DMD sur le chromosome X [Promoteurs (flèche) et exons (traits noirs)] (Muntoni et <i>al.</i> ,2003).....	26
<b>Figure 15</b> : Les domaines de la dystrophine et leurs protéines de liaison (Ben Yaou et <i>al.</i> , 2016). .....	26
<b>Figure 16</b> : Photographie de la série des bains de déshydratation (Originale 2023).....	34
<b>Figure 17</b> : Machine à enrobage (A) et Blocs réfrigéré (B) (Originale 2023). .....	35
<b>Figure 18</b> : Microtome (A), Bain marie et Plaque chauffante (B) (Originale 2023).....	35
<b>Figure 19</b> : Technique immuno- histochimique enzymatique indirecte par amplification (Garaud et Roussel .....	36
<b>Figure 20</b> : Photographie montrant l'étape de déparaffinage avec une Plaque chauffante, les bains de xylène et d'autres d'alcool (Originale 2023).....	37
<b>Figure 21</b> : Photographie montrant l'étape d'incubation avec les solutions de blocage (Originale 2023).....	38
<b>Figure 22</b> : Photographie montrant l'étape d'incubation avec de l'hématoxyline (Originale 2023).....	39
<b>Figure 23</b> : Photographie montrant l'étape du montage avec l'eukitt (Originale 2023). .....	39
<b>Figure 24</b> : Microscope avec caméra connecté à un ordinateur (Originale 2023). .....	40
<b>Figure 25</b> : Coupes histologiques du testicule chez les rats témoin (A et A') et traités pendant 10 semaines par le thiaméthoxame : DJA (B et B'), NOAEL (C et C'), NOAEL x 2 (D et D'). .....	44
<b>Figure 26</b> : Coupes histologique de l'épididyme chez les rats témoins (A, A') et traités pendant 10 semaines par le thiaméthoxame : DJA (B, B'), NOAEL (C, C') et NOAELx2 (D, D').....	46

## Liste des Figures et Tableaux

---

<b>Figure 27</b> : Présentation graphique du diamètre des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux rats témoins. ....	47
<b>Figure 28</b> : Présentation graphique de l'épaisseur de l'épithélium des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux témoins. ....	48
<b>Figure 29</b> : Présentation graphique de la surface moyenne des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux témoins. ....	48
<b>Figure 30</b> : Présentation graphique de la surface de tissu interstitiel chez les rats traité au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement au témoin.....	49
<b>Figure 31</b> : Présentation graphique de la lumière des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux témoins. ....	49
<b>Figure 32</b> : Présentation graphique de la surface moyenne des noyaux des spermatogonies des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins. ....	50
<b>Figure 33</b> : Présentation graphique de diamètre des canaux épидидymaire des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins. ....	51
<b>Figure 34</b> : Présentation graphique de diamètre de l'épithélium épидидymaire des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins. ....	51
<b>Figure 35</b> : Présentation graphique de la surface des canaux épидидymaires des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins. ....	52
<b>Figure 36</b> : Coupes histologiques montrent l'expression et la localisation des dystrophines dans les structures du testicule chez les rats témoins (A) et des rats traités au thiaméthoxame : DJA (B), Noel (C), Noel X 2 (D) au grossissement x400. ....	54
<b>Figure 37</b> : Coupes histologiques montrent l'expression et la localisation des dystrophines dans les structures de l'épididyme chez les rats témoins (A) et des rats traités au thiaméthoxame : DJA (B), Noel (C), Noel X 2 (D) au grossissement x400. ....	56

### Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> : Structure moléculaire des néonicotinoïdes (Paquet et Triffault-Bouchet,2020).....	6
<b>Tableau 2</b> : Propriété physico-chimiques du thiaméthoxame (A.R.L.A.S.C,2007). ....	11
<b>Tableau 3</b> : Propriétés de la préparation commerciale de l'insecticide Actara 25 WG (A.R.L.A.S.C,2007). ....	11
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques des lots de rats. ....	32
<b>Tableau 5</b> : Teneur approximative d'expression des dystrophines dans les structures histologiques du testicule chez le rat témoin et ceux traités (DJA, NOAEL et NOAEL x 2). ....	55
<b>Tableau 6</b> : Teneur approximative d'expression des dystrophines dans les structures histologiques du testicule chez le rat témoin et ceux traité (DJA, NOAEL et NOAEL x2) .....	57

## Liste des Abréviations

---

<b>FAO</b>	: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
<b>nAChRs</b>	: Récepteurs cholinergiques
<b>ACh</b>	: Récepteur à l'acétylcholine
<b>PPSE</b>	: Potentiel post-synaptique excitateur
<b>mAChRs</b>	: Récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique
<b>AChE</b>	: Acétylcholinestérase
<b>TMX</b>	: Thiaméthoxame
<b>MADR</b>	: Ministère de l'agriculture et du développement rural
<b>TMX-dm</b>	: Thiaméthoxame - déméthylation
<b>ABD</b>	: Actin Binding Domain
<b>CRR</b>	: Cysteine rich repeats
<b>CH</b>	: Calponin homology domaine
<b>DAPC</b>	: Dystrophin-associated glycoprotéine complexe
<b>DB</b>	: Dystrobrevine
<b>DG</b>	: Dystroglycane
<b>DGC</b>	: Dystrophin-Glycoproteins Complex
<b>DMD</b>	: Dystrophie Musculaire de Duchenne
<b>DTN(A et B)</b>	: Le gène de dystrobrevine alpha et béta.
<b>SG</b>	: Sarcoglycanes
<b>SP</b>	: Spermatoocyte
<b>Syn</b>	: Syntrophines
<b>LH</b>	: Hormone lutéinisante
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>DJA</b>	: Dose journalière Admissible/tolérable
<b>Noël</b>	: Non observed adverse effect level « dose sans effet nocif observable
<b>Min</b>	: Minute
<b>µm</b>	: Micromètre
<b>Mg</b>	: Milligramme
<b>Dp</b>	: Dystrophine.
<b>L</b>	: Litre.
<b>H</b>	: Heure.
<b>Kg</b>	: Kilogramme.
<b>Mm</b>	: Millimètre.
<b>Ad</b>	: Dark.
<b>Ap</b>	: Pâle.
<b>KDa</b>	: Kilo-dalton.
<b>NOS</b>	: Oxyde nitrique synthase.
<b>°C</b>	: Degré Celsius.
<b>J</b>	: Jour.
<b>ml</b>	: Millilitre.
<b>IHC</b>	: Immuno-histo-chimie.
<b>DAB</b>	: Diaminobenzidine.
<b>H2O2</b>	: Le peroxyde d'hydrogène.
<b>PBS</b>	: Tampon phosphate salin.
<b>TC</b>	: Tissu conjonctif.
<b>CL</b>	: Cellules de Leydig.
<b>VS</b>	: Vaisseaux sanguins.

## Glossaire

---

- ∞ **Toxicité sub-chronique** : La toxicité sub-chronique (ou subaiguë) se produit lorsque des animaux de laboratoire sont exposés de manière répétée ou prolongée pendant des semaines (généralement 28 jours) à 3 mois (90 jours), ce qui est considéré comme une période de temps relativement courts par rapport à leur durée de vie normale (**Caleb, 2009**).
- ∞ **DJA (Dose Journalière Admissible)** : La dose journalière admissible (DJA) désigne la valeur toxicologique de référence pour les effets toxiques seuils lorsque l'exposition se fait par voie orale ou cutanée. La Dose Journalière Acceptable (DJA) est généralement exprimée en mg/kg. J (mg de substance chimique par kilogramme de poids corporel par jour). La dose journalière admissible (DJA) définit la quantité maximale théorique d'une substance toxique qui peut être administrée à un individu (qu'il appartienne ou non à un groupe sensible) sans causer d'effets néfastes sur sa santé.
- ∞ **NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)** : La concentration ou la quantité maximale d'une substance trouvée par expérience ou observation qui provoque des faibles changements détectables dans la morphologie, la capacité fonctionnelle, la croissance, le développement d'un organisme cible dans des conditions d'exposition spécifiées.
- ∞ **Reprotoxique** : Désigne une substance qui nuit à la reproduction d'un organisme et qui peut provoquer un changement de morphologie au cours du développement en augmentant la stérilité ou en augmentant le risque d'anomalies et de mutations (**Barouki, 2013**).
- ∞ **Neurotoxicité** : elle se réfère à la capacité d'une substance à causer des dommages dans le système nerveux, qui est composé du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP) (**Labie, 2007**).
- ∞ **Toxine** : est une substance chimique produite par un organisme vivant, tel qu'une bactérie, un champignon, une plante ou un animal, qui est capable de causer des effets nocifs sur d'autres organismes. Les toxines peuvent agir à différents niveaux, tels que le système nerveux, le système immunitaire, les organes internes ... etc (**Raynaud, 1973**).
- ∞ **L'hépatotoxicité** : elle désigne les dommages causés au foie par certaines substances, telles que des médicaments, des produits chimiques ou des toxines. Cela peut entraîner des problèmes de fonctionnement ou des lésions au foie (**Le Daré et al., 2021**).

## Résumé

---

Malgré les avertissements des spécialistes concernant les effets néfastes potentiels des pesticides sur la santé humaine et animale, leur utilisation à l'échelle mondiale continue d'augmenter. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact d'une exposition sub-chronique à un insecticide de synthèse de la famille des néonicotinoïdes, le thiaméthoxame (TMX), sur l'expression des dystrophines au niveau du testicule et de l'épididyme chez le rat mâle, en utilisant une étude immunohistochimique avec l'enzyme peroxydase.

Notre étude porte sur 12 rats mâles adultes de souche Wistar, répartis de manière aléatoire en 4 groupes contenant chacun 3 rats. Le premier groupe est destiné aux rats témoins (1 ml d'eau/J), tandis que les trois autres groupes sont traités par voie orale avec le produit étudié, le thiaméthoxame, à des doses différentes (DJA : 0,026 mg/kg), (NOAEL : 2,6 mg/kg) et (NOAELx2 : 5,2 mg/kg). Les organes d'intérêt : le testicule et l'épididyme, ont été prélevés et fixés avec du paraformaldéhyde à 4 %. Après la préparation des coupes paraffinées, celles-ci ont été marquées avec un anticorps anti-dystrophine, puis des photos ont été prises et traitées à l'aide du logiciel Axio-Vision pour effectuer une étude histo-morphométrique.

Les résultats de cette étude ont montré que l'exposition au thiaméthoxame, en particulier à des doses élevées (NOAELx2), provoque des modifications au niveau des testicules et de l'épididyme. Sur le plan histologique, cet insecticide induit une variabilité microscopique importante, telle qu'une augmentation du diamètre des tubes séminifères, un rétrécissement de la surface des noyaux des spermatogonies dans le testicule, une réduction de la surface des canaux épидидymaires, ainsi que l'apparition d'une hyperplasie qui se traduit par une prolifération des cellules dans l'épididyme.

De plus, le marquage des dystrophines est détecté sur diverses structures épидидymaire et testiculaire. L'exposition au TMX entraîne des changements dans la distribution et la localisation des dystrophines des deux organes reproducteurs, à l'exception au niveau des spermatozoïdes et l'épithélium épидидymaire du pôle apical présente une forte intensité de marquage. Ces changements s'accompagnent d'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères ainsi que dans les canaux épидидymaires.

En conclut que le TMX provoque des effets néfastes sur la fonctionnalité et la santé reproductive.

**Mots clés :** Pesticide, Thiaméthoxame, sub-chronique, Testicule, Epididyme, dystrophines, Rat.

# **INTRODUCTION**

## Introduction

---

Les pesticides sont des composés chimiques utilisés notamment en agriculture pour lutter contre les organismes jugés nuisibles aux plantations. Ils sont regroupés en trois grandes familles, les herbicides, les insecticides, les fongicides et sont considérés comme la troisième cause de pollution dans le monde (**Multinger,2005**).

La toxicité d'un pesticide dépend de plusieurs facteurs, particulièrement sa nature chimique, les mécanismes d'action toxiques de ses constituants, son mode d'usage, la concentration et la durée d'exposition. De nombreuses études font apparaître un lien de causalité entre l'exposition à certains pesticides et des atteintes physiologiques comme des troubles nerveux, digestifs, respiratoires, cardiovasculaires, musculaires, de reproduction ainsi que des affections graves qui se manifestent en l'occurrence par des pathologies neurologiques (maladie de Parkinson), des cancers (lymphome, le cancer prostatique), malformations congénitales, infertilités (**Bouziari,2012**).

Parmi les pesticides, les néonicotinoïdes utilisés depuis longtemps comme insecticides pour la protection des fruits, des vignes, des légumes, des céréales, du soja, du coton et même des plantes ornementales. Ils sont également utilisés à l'intérieur des habitats pour lutter contre les mouches, les moustiques et les blattes (**Kilani-Morakchi et al.,2006 ; Messiad et al.,2015**). Les néonicotinoïdes sont des analogues synthétiques de la nicotine, ils sont neurotoxiques et leur cible est le récepteur nicotinique (nAChRs) de l'acétylcholine dont le blocage induit la paralysie et la mort de l'insecte (**Buckingham et al.,1997 ; Casida,2010 ; Schaafsma et al.,2015**).

Le thiaméthoxame est un insecticide organique synthétique appartenant à la deuxième génération de la famille des néonicotinoïdes et à la classe des thianicotynils. Il est récemment mis sur le marché algérien sous l'appellation commerciale d'Actara 25 WG. Les propriétés de ce pesticide sont conduites à son utilisation à grande échelle allant de la protection des plantes (cultures, légumes, fruits) contre les ravageurs à la santé animale (produits vétérinaires). À l'instar de l'ensemble des pesticides, l'utilisation intensive de thiaméthoxame peut avoir des répercussions négatives sur l'environnement, sur les organismes non ciblés, notamment sur la santé animale et humaine (**Merhi,2008 ; Goulson,2012**).

Le système reproducteur des mammifères peut en être une cible, il est composé de plusieurs organes : le testicule, l'épididyme, les vésicules séminales et la prostate. Ces derniers sont impliqués dans la production, le stockage et le transport des gamètes mâles contenus dans le sperme (**Setchell et Breed,2006**).

Ces différentes fonctions sont rendues possibles grâce au cytosquelette composé de trois catégories de polymères biologiques : les microfilaments d'actine, les microtubules et les

## **Introduction**

---

filaments intermédiaires. L'activité de chacun des trois polymères dépend de son interaction à d'autres protéines de cytosquelette appelées protéines associées ou accessoires qui se divisent en deux groupes : protéines intracellulaires et protéines sub-membranaires (**Millecamps,2008**). Parmi ces dernières, les dystrophines (DP), protéines associées aux microfilaments d'actine.

À sa découverte en 1987, la dystrophine a été identifiée pour la première fois dans le muscle squelettique, ensuite de nombreuses études ont permis de localiser cette protéine dans le muscle cardiaque ainsi que dans d'autres tissus. La dystrophine à localisation subcorticale constitue avec ses protéines et glycoprotéines associées (cytoplasmique et membranaires) une sorte d'échafaudage liant les microfilaments d'actine aux éléments de la matrice extracellulaire. Cette association forme un complexe nommé DAPC (Dystrophine-Associated-Protein-Complexe) (**Andoni Urtizberca,2009 ; Mornet et Rivier,2017**).

L'objectif de ce travail consiste à évaluer les effets d'une exposition sub-chronique au thiaméthoxame sur les dystrophines au niveau du testicule et de l'épididyme chez le rat de la souche *wistar*. L'étude a été abordée par une approche immunohistochimique utilisant un kit à la peroxydase.

Notre manuscrit est structuré en deux chapitres, le premier est une revue bibliographique exposant les éléments de la littérature en rapport avec le thème abordé et s'articule en trois sous chapitres : des données sur les pesticides, essentiellement le thiaméthoxame, des rappels anatomo-structuro-fonctionnels sur l'appareil reproducteur mâle et enfin la description des dystrophines et leurs protéines associées. Le deuxième chapitre consacré à l'étude expérimentale comprend la description du protocole expérimentale, la présentation des résultats et leurs discussions. Enfin une conclusion.

**CHAPITRE I :**  
**Rappels bibliographiques**

# Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

## 1. Néonicotinoïdes et thiaméthoxame

### 1.1.Pesticides

#### 1.1.1.Définition

Le mot « pesticide » terme générique dérivé du latins « *caedere* » tuer et « *pestis* » fléau, intégré à la langue anglaise dès les années 1940 puis à la langue française à la fin des années 1950, utilisé aussi bien dans le langage courant que scientifique (**Baldi et al.,2013**).

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a défini le pesticide comme toute substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance des plantes, défoliant, desséchant ou agent pour éclaircir les fruits ou prévenir la chute prématurée des fruits, aussi utilisé comme substances appliquées aux cultures avant ou après la récolte pour protéger le produit contre la détérioration pendant l'entreposage et le transport (**Drew., 2017**).

#### 1.1.2. Composition

Un pesticide est composé de deux types de substances (**Berkani et Bouzeghoul.,2011**) :

- Une ou plusieurs matières actives qui confèrent au produit l'effet poison désiré, par exemple le glyphosate dans la majorité des désherbants totaux, le métaldéhyde dans la plupart des anti-limaces et l'isoproturon dans des désherbantes de cultures céréaliennes...
- Un ou plusieurs additifs renforçant l'efficacité et la sécurité du produit, par exemple les répulsifs, vomitifs, épaississants, anti-moussants, solvants...

#### 1.1.3. Classification

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité ce qui rend leur classification complexe (figure 1). D'une manière générale, ils peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre, mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active majoritaire qui les compose (**Merihi,2008**).

# Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

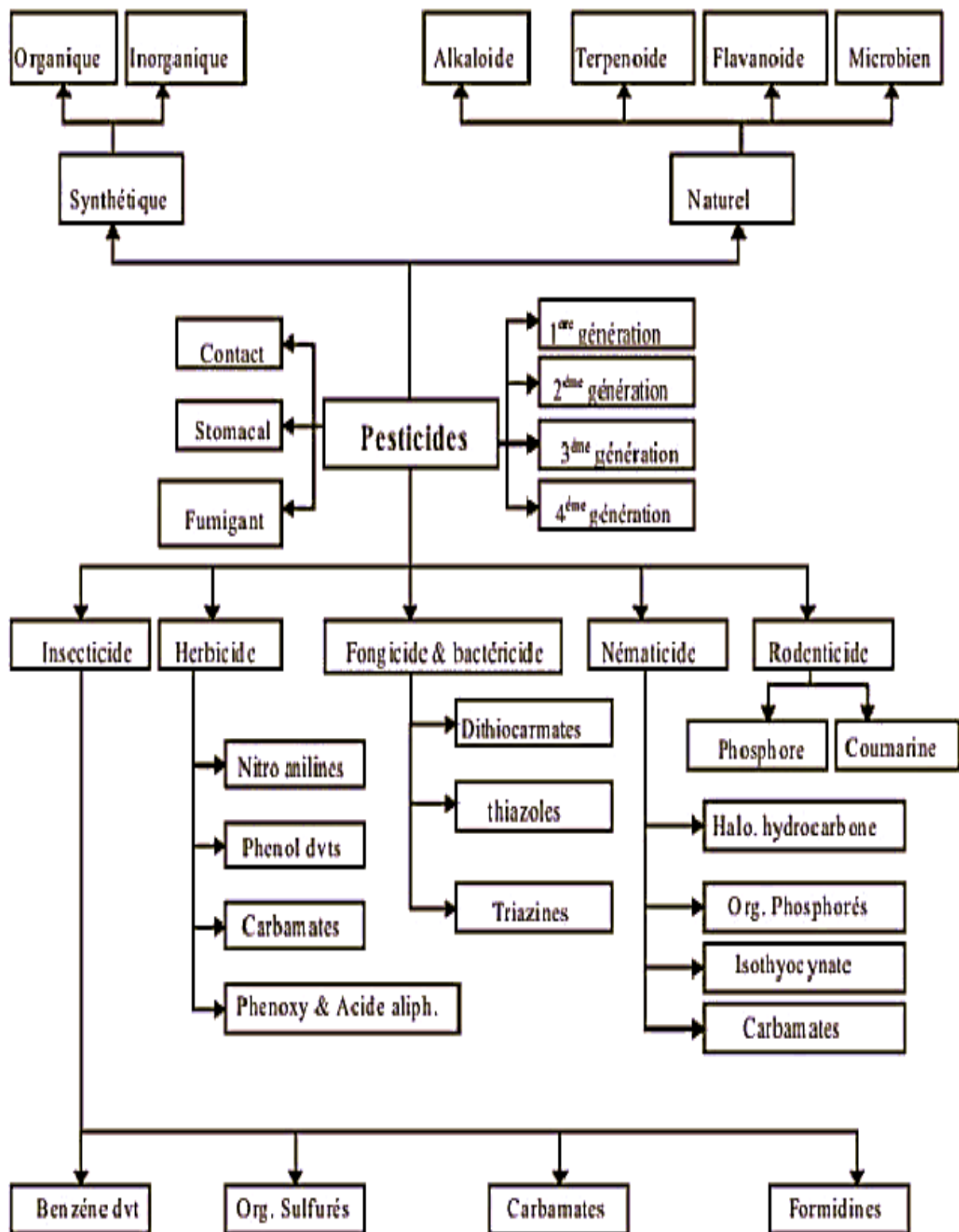


Figure 1 : Classification des pesticides (Nollet Leo ML et Rathore Hamire S, 2012).

# Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

## 1.2.Néonicotinoïdes

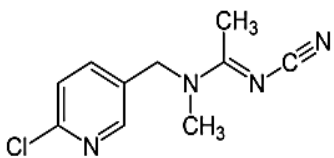
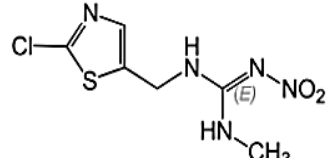
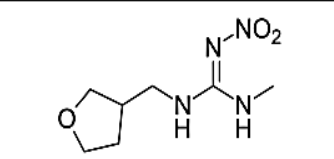
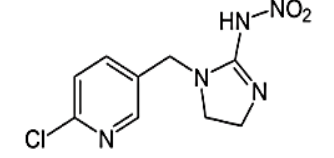
### 1.2.1. Définition

Les néonicotinoïdes, découverts dans les années 1980, ont été commercialisés dans les années 1990 et sont devenus la classe des insecticides la plus vendue dans le monde comportant plusieurs substances employées dans le domaine agricole et par les particuliers (**Elbert et al.,2008 ; Paquet et Triffault-Bouchet,2020 ; Aouimeur et al.,2020**), ils sont systémiques, c'est-à-dire qu'ils sont absorbés par les plantes et se propagent ensuite à travers leur système vasculaire, puis circulent dans son système vasculaire. Cette classe de pesticides a été créée en partie en réponse à l'augmentation de la résistance des ravageurs envers d'autres classes de pesticides précédemment utilisées, comme les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoides. De plus, leur développement a été influencé par des préoccupations grandissantes liant l'exposition à ces insecticides à des problèmes potentiels de développement neurologique chez les enfants (**Paquet et Triffault-Bouchet,2020**).

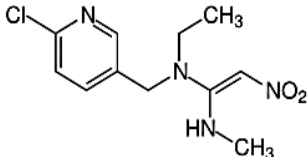
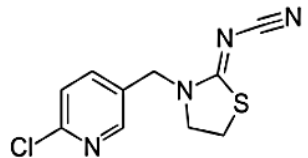
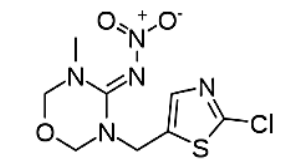
### 1.2.2. Familles des néonicotinoïdes

Aujourd'hui, parmi les insecticides néonicotinoïdes disponibles, on compte sept molécules autorisées : l'imidaclopride, le thiaméthoxame, le clothianidine, le thiaclopride, l'acétamipride, le dinotéfurane et le nitenpyrame (tableau 1). Toutes sont neurotoxiques en agissant sur le système nerveux central des insectes et des autres organismes vivants non ciblés (**Aebi et al.,2017**).

**Tableau 1:** Structure moléculaire des néonicotinoïdes (**Paquet et Triffault-Bouchet,2020**).

Nom usuel	CAS	Nom chimique	Formule chimique	Structure moléculaire
Acétamipride (ACT)	135410-20-7	(E)-N1-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N2-cyano-N1-méthylacetamidine	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	
Clothianidine (CLO)	210880-92-5	(E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-méthyl-2-nitroguanidine	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	
Dinotéfurane (DIN)	165252-70-0	2-méthyl-1-nitro-3-[(tetrahydro-3-furanyl)méthyl]guanidine	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	
Imidaclopride (IMI)	138261-41-3	(EZ)-1-(6-chloro-3-pyridylméthyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

Nitenpyrame (NIT)	150824-47-8	(E)-N-(6-Chloro-3-pyridylmethyl)- N-ethyl-N'-methyl-2-nitrovinylidenediamine	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	
Thiaclopride (THC)	111988-49-9	(Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidene cyanamide	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S	
Thiaméthoxame (THM)	153719-23-4	(EZ)-3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	

### 1.2.3. Utilisation des néonicotinoïdes

L'utilisation des néonicotinoïdes couvre quatre principaux domaines : la protection des plantes de cultures et ornementales contre les insectes herbivores et les acariens, la lutte antiparasitaire urbaine en ciblant les organismes nuisibles tels que les cafards, les fourmis, les termites, les guêpes, les mouches, les applications vétérinaires contre les poux, les puces, les tiques parasitant les animaux de compagnie ou d'élevage (**Aouimeur et al.,2022**).

### 1.2.4. Mode d'action

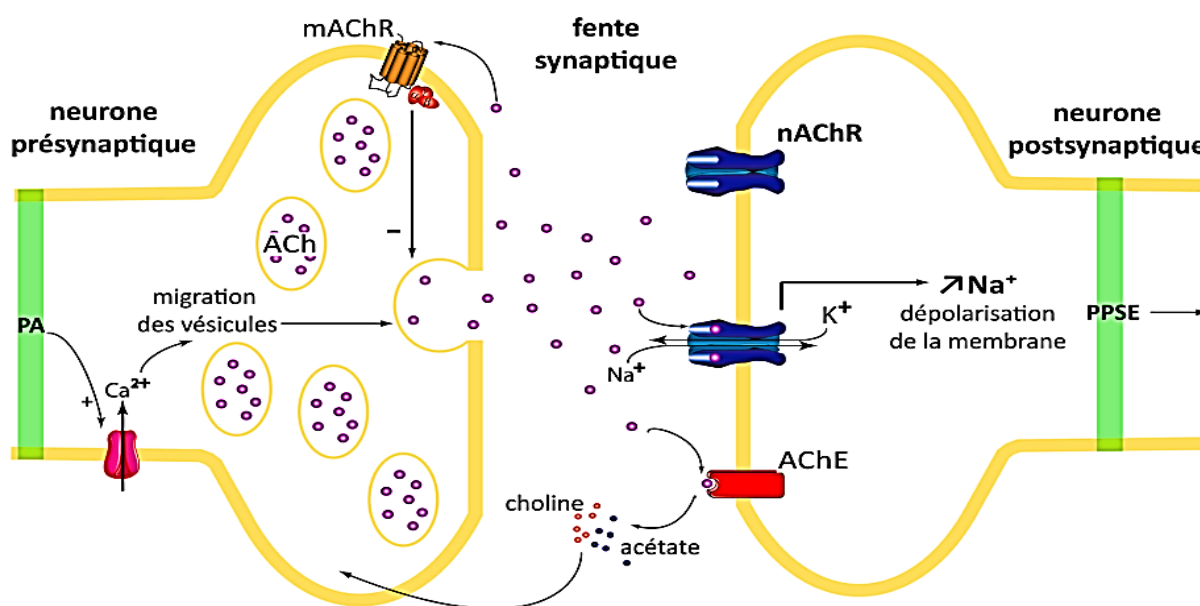
L'immense succès des néonicotinoïdes est attribuable à leur mécanisme d'action qui cible les récepteurs cholinergiques (nAChRs) (**Elbert et al.,2008**). Bien que ce type de récepteurs nerveux soit présent chez les vertébrés et les invertébrés, ils sont plus nombreux et possèdent une plus grande affinité pour les néonicotinoïdes chez les invertébrés notamment les insectes. Ce ciblage sélectif envers les arthropodes explique pourquoi les néonicotinoïdes sont considérés comme plus sûrs que les précédentes classes d'insecticides pour les organismes non ciblés, y compris l'humain (**Soumis,2018**).

Le système nerveux est composé d'un réseau de neurones interconnectés par le biais de jonctions spécifiques : les synapses. Le message véhiculé au niveau d'une synapse peut être de nature électrique ou de nature chimique (neurotransmetteurs). Cependant, quelle que soit la nature du signal la perception de l'information au niveau de la cellule post-synaptique induit l'activation ou l'inhibition de récepteurs ou de canaux ioniques membranaires (**Raymond-Delpech et al.,2005**).

Les néonicotinoïdes agissent au sein du système nerveux central (SNC) en interférant avec la transmission neuronale, un neurotransmetteur ayant un haut degré d'affinité pour les récepteurs nicotiques (nAChRs) situés dans le neurone post-synaptique. Le lien entre

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

l'acétylcholine et le récepteur assure la transmission rapide des signaux nerveux (**Jeschke et al.,2013**). À faible concentration, les néonicotinoïdes induisent une stimulation du SNC des insectes. Cependant, à forte concentration, ils entraînent une hyperactivité neuronale. Ce dysfonctionnement induit un blocage des récepteurs nAChRs et par conséquent une interruption de la transmission de l'influx nerveux qui conduit à l'accumulation d'acétylcholine dans l'espace inter synaptique (figure 2). Cette modification neuronale conduit incessamment à une paralysie de l'insecte visé, ultimement à sa mort. Ainsi, l'effet sur le SNC est semblable à celui de la nicotine. Les insectes y sont particulièrement sensibles puisque leur proportion de récepteurs nAChRs est beaucoup plus grande que chez d'autres organismes (**Paquet et Triffault-Bouchet,2020**). b



**Figure 2 :** Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones (**Bodereau,2011**).

L'activation de l'élément présynaptique se caractérise par un potentiel d'action qui en se propageant au niveau du bouton synaptique, permet l'activation de canaux calciques volage-dépendants et la migration de vésicules d'acétylcholine (ACh) vers la fente synaptique. La libération de l'ACh par le neurone présynaptique active les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) postsynaptiques. L'activation de ces derniers entraîne un flux sortant d'ions  $K^+$  et un flux entrant d'ions  $Na^+$  majoritaire. Cette entrée d'ions sodium crée une dépoliarisation de la membrane et génère ainsi un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE) permettant de transmettre l'information nerveuse au neurone postsynaptique (figure2). L'ACh peut également se fixer sur des récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique (mAChRs) qui régulent la libération de l'ACh. Au niveau de la fente synaptique, l'ACh est dégradée en choline et acétate par l'acétylcholinestérase (AChE). La choline est recapturée par l'élément présynaptique pour synthétiser de nouvelles molécules d'ACh (figure 2).

# Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

## 1.3.Thiaméthoxame

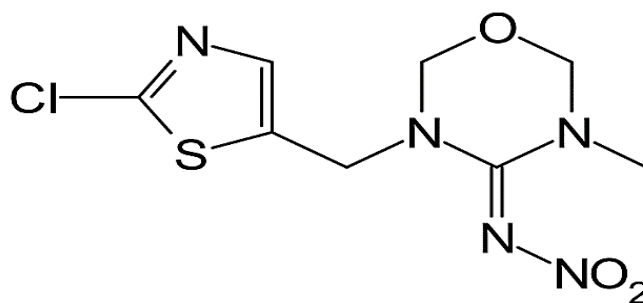
### 1.3.1. Découverte

Le thiaméthoxame (TMX) a été synthétisé pour la première fois en 1991. Après de nombreux tests en laboratoire et sur le terrain il a été identifié comme le meilleur composé préparé dans le cadre du programme de recherche sur les néonicotinoïdes et a ensuite été sélectionné pour le développement. Il s'agit d'une molécule unique sa structure chimique diffère remarquablement de celle des autres composés néonicotinoïdes commerciaux et en développement car elle possède un nouveau cycle 1,3,5-oxadiazinane qui est substitué en position 5 par un groupe méthyle et elle est le premier néonicotinoïde disponible dans le commerce ayant un hétérocycle 2-chloro-5-thiazolyle. Cette combinaison unique de caractéristique structurelle est responsable de son activité insecticide exceptionnelle : le groupe méthyle en position 5 renforce l'activité contre les insectes suceurs, tandis que l'hétérocycle 2-chloro-5-thiazolyl est essentiel pour améliorer l'efficacité contre les insectes broyeurs.

Le TMX est le premier présentant des néonicotinoïdes de deuxième génération. Il a été introduit pour la première fois sur le marché en 1998. A ce jour, des homologations ont été accordées dans 52 pays principalement en Amérique latine, en Europe de l'Est et en Asie. Des demandes d'enregistrement ont également été déposées auprès des autorités américaines et canadiennes à la fin de 1998 et en Europe et au Japon au début de 1999 (**Peter et al.,2001**). En Algérie, selon le ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR), le TMX a été homologué sous la marque Actara 25 WG en juillet 2008 et deux ans après il a été mis sur le marché (**Chahbar-Adidou et al., 2018**).

### 1.3.2. Définition

Le TMX est un insecticide organique synthétique appartenant à la famille chimique des néonicotinoïdes et à la classe des thianicotynils. Le nom systémique de la molécule est 3-(2-chlorothiazol-5-ylméthyl) -5-méthyl-[1,3,5]-oxadiazinan-4-ylidène-N-nitroamine (figure 3). Il s'agit d'une nouvelle molécule la plus importante développée au cours des trois dernières décennies dont l'intérêt est dû, d'une part à sa lutte contre les insectes qui sont résistants aux autres classes d'insecticides et d'autre part à sa toxicité modérée pour les mammifères, les oiseaux et les poissons parce qu'ils se lient au niveau du récepteur nicotinique de l'acétylcholine post synaptique plus abondante chez les insectes que chez les animaux à sang chaud (**Feki,2022 ; Bourbia-Ait hamle,2012**). Il possède aussi des caractéristiques systémiques exceptionnelles et fort effet préventif face à la transmission des virus. Les qualités de cet insecticide permettent des méthodes d'applications flexibles, une excellente efficacité, supérieure à celle de l'Imidaclopride ou de l'Acétamipride et une activité résiduelle prolongée.



**Figure 3 :** Structure chimique du thiaméthoxame (Hamilton,2010).

### 1.3.3. Utilisation et propriétés

Le thiaméthoxame est le principe actif de l'insecticide, à l'usage commerciale le produit utilisé sous forme d'Actara® 25 WG est appliqué à l'aide d'un pulvérisateur dans la raie de semis des pommes de terre, ainsi qu'à l'aide d'un pulvérisateur foliaire afin de lutter contre le doryphore, les pucerons et la cicadelle de la pomme de terre. Il est aussi appliqué sur les arbres à fruits à pépins pour lutter contre le charançon de la prune, la mineuse marbrée, le puceron rose du pommier, le psylle du poirier et la punaise de la molène. Le TMX traverse la surface foliaire et circule dans le système de translocation de la plante atteignant les insectes par contact ou par ingestion (A.R.L.A,2007 ; Maienfisch,2006).

Dans la région Nord-Est Algérienne le TMX est utilisé à large spectre contre les insectes piqueurs et suceurs des céréales, des arbres fruitiers et des cultures maraîchères. Il est utilisé en culture à des doses allant de 800 à 4000 mg/L d'insecticide [formulation commerciale] correspondant à 200 à 1000 mg/L de TMX (Bourbia-Ait Hamlet,2012).

Il a été rapporté que le TMX est légèrement toxique par voie orale et par inhalation et il possède une faible toxicité par voie cutanée. Il est peu ou pas irritant pour la peau et les yeux. Cet insecticide est classé cancérigène probable chez l'humain (Feki,2022).

### 1.3.4. Propriétés physico-chimiques du thiaméthoxame

Les propriétés physico-chimiques de la matière active sont présentées dans le tableau 2 et de ses préparations commerciales dans le tableau 3 (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de santé canada,2007).

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

**Tableau 2** : Propriété physico-chimiques du thiaméthoxame (A.R.L.A.S.C,2007).

Propriété	Résultat														
État physique et couleur	Poudre de couleur blanc cassé														
Odeur	Inodore														
Point ou plage de fusion	139,1 °C														
Point ou plage d'ébullition	Sans objet														
Densité à 25 °C	$1,57 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$														
Pression de vapeur à 20 °C	$2,7 \times 10^{-9} \text{ Pa}$														
Constante de la loi d'Henry à 20 °C	$1,9 \times 10^{-10} \text{ Pa m}^3/\text{mol}$														
Spectre d'absorption ultraviolet (UV)-visible	Pas d'absorption significative aux longueurs d'onde > 300 nanomètres (nm)														
Solubilité dans l'eau à 25 °C	4,1 g/L														
Solubilité dans des solvants organiques à 20 °C	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Solvant</th> <th>Solubilité (g/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Acétone</td> <td>48</td> </tr> <tr> <td>Dichlorométhane</td> <td>110</td> </tr> <tr> <td>Acétate d'éthyle</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>1-octanol</td> <td>0,62</td> </tr> <tr> <td>Méthanol</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>Toluène</td> <td>0,68</td> </tr> </tbody> </table>	Solvant	Solubilité (g/L)	Acétone	48	Dichlorométhane	110	Acétate d'éthyle	7	1-octanol	0,62	Méthanol	13	Toluène	0,68
Solvant	Solubilité (g/L)														
Acétone	48														
Dichlorométhane	110														
Acétate d'éthyle	7														
1-octanol	0,62														
Méthanol	13														
Toluène	0,68														
Coefficient de partage <i>n</i> -octanol-eau ( $\log K_{oc}$ ) à 25 °C	$\log K_{oc} = -0,13$														
Constante de dissociation ( $pK_a$ )	Pas de dissociation dans la plage 2 à 12 de pH														
Stabilité (température, métaux)	Aucun changement de la MAQT par contact avec les métaux (acier inoxydable, acier moulé, étain et aluminium) et les ions métalliques ( $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Al}^{+3}$ , $\text{Cu}^{+2}$ et $\text{Fe}^{+2}$ ).														

**Tableau 3** : Propriétés de la préparation commerciale de l'insecticide Actara 25 WG (A.R.L.A.S.C,2007).

Propriété	Résultat
Couleur	Brun pâle
Odeur	Odeur de moisi
État physique	Solide
Type de formulation	Granulés mouillables
Teneur nominale garantie	25,0 % (limites : 24,25 à 25,75 %)
Produits de formulation	La préparation ne contient ni produit de formulation figurant sur la liste 1 de l'ARLA, ni produit de formulation figurant sur la liste des substances de la voie 1 de la PGST.

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

Description du contenant	Bouteilles de polyéthylène haute densité
Densité	0,47 g/ml à 20 °C
pH	7 à 11 (dispersion aqueuse de 1 %)
Action oxydante ou réductrice	Le produit n'a pas de propriétés oxydantes ou réductrices.
Stabilité à l'entreposage	Le produit s'est révélé stable pendant au moins une année en conditions d'entreposage.
Explosivité	Le produit n'a aucune propriété explosive.

### 1.3.5. Mécanisme d'action

Le mode d'action du thiaméthoxame diffère sensiblement de celui d'autres néonicotinoïdes. La distinction majeure réside dans le fait que le TMX exige d'abord une transformation en clothianidine pour devenir actif, tandis que d'autres peuvent agir directement dans leur forme d'origine. Le TMX est un faible agoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Il entraîne une puissante dépolarisation en se fixant à des récepteurs muscariniques. Le métabolite issu de la N-déméthylation du TMX [TMX-dm] se fixe sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine et agit de la même façon que les néonicotinoïdes de première génération. Ce mode d'action a été étudié chez les insectes terrestres tels que la blatte et certains orthoptères et n'a pas été rapporté pour des organismes aquatiques (**Paquet et Triffault-Bouchet,2020**).

### 1.3.6. Effet toxicologique

Les mécanismes par lesquels les pesticides exercent leur toxicité sont multiples, les effets neurotoxiques des certains pesticides sont rapportés pour la maladie de parkinson et les maladies neurodégénératives. Ces effets sont parfois reliés aux propriétés insecticides ciblant le SNC des insectes et qui peuvent expliquer leur nocivité chez l'homme. De ce fait, la toxicocinétique est un élément critique de la caractérisation du danger d'une substance chimique (**Baldi et al.,2013**).

#### 1.3.6.1. Informations toxicologiques

- Toxicité aiguë par voie orale : DL 50 rat >5000 mg/kg.
- Toxicité aiguë par inhalation : CL 50 rat > 5290 mg/m 3,4 h.
- Toxicité aiguë par pénétration cutanée : DL 50 rat > 5000 mg/kg.
- Irritation de la peau : non irritant directive.
- Irritation des yeux : non irritant.
- Toxicité à long terme : tumeurs de foie remarquables chez les souris (**Syngenta,2004**).

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

### 1.3.6.2. Toxicité aiguë

L'effet aiguë (ou à court terme) de TMX se traduisant généralement peu de temps après le traitement, avec apparition immédiate de symptôme. L'intoxication aiguë survient lorsque le sujet est exposé à des quantités importantes de ce pesticide (**Louchahi,2014 ; Feki et al.,2021**). Des études de toxicité à court terme chez le rat montrent que les organes cibles sont les reins et le foie. Les mâles sont plus sensibles que les femelles aux effets s'exerçant sur les reins. La toxicité au niveau du foie est observée aux doses supérieures et prend la forme d'une hypertrophie hépatocellulaire, d'une augmentation du poids du foie et de modifications connexes dans les paramètres biochimiques cliniques (notamment davantage de cholestérol et un accroissement de l'activité de certaines enzymes hépatiques). L'**Actara® 25 WG** est considéré faiblement toxique par les voies orale, cutanée et par inhalation, faiblement irritant pour les yeux et la peau, sans être un sensibilisant cutané. Ses doses aiguës élevées exercent des effets neurotoxiques sur l'activité locomotrice (**A.R.L.A.S.C,2007**).

### 1.3.6.3. Toxicité chronique

L'effet chronique (ou à long terme) de TMX se développe avec l'apparition d'une pathologie après des expositions répétées dans le temps pour des doses de produit le plus souvent faibles qui sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme ou d'entraîner des phénomènes irritatifs au niveau de différents organes. La toxicité chronique peut être aussi le résultat d'intoxications aiguës répétées (**Louchahi,2014**). Chez le rat, dans les études sub-chronique et chronique, la pathologie hépatique comprend les éléments suivants : hypertrophie hépatocellulaire, nécrose d'hépatocytes isolés, infiltration lymphocytaire et pigmentation (sub-chronique) ou hyperplasie (chronique) des cellules de Kupffer. L'incidence de pathologie néoplasique et non néoplasique augmente pour une même dose autrement dit il n'y pas de limite clairement établie entre les doses qui induisent des tumeurs et d'autres effets toxiques systémiques (**A.R.L.A.S.C,2007**). Par ailleurs, l'exposition répétée à ce pesticide peut se traduire par une hépatotoxicité, d'une insuffisance rénale, d'une athérosclérose, d'un infarctus du myocarde avec une augmentation de la pression artérielle (**A.R.L.A,2001**).

### 1.3.6.4. Toxicité de la reproduction

Le système reproducteur des mammifères est un processus étroitement régulé qui peut être perturbé par des expositions multiples. En fait, l'exposition à certaines toxines sur le développement ne se font pleinement sentir qu'à la puberté ou à l'âge adulte lorsque le système reproducteur devient sexuellement mature et que ses fonctions se modifient (**Boekelheid et al.,2012**).

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

Dans l'étude de toxicité du TMX vis-à-vis de la reproduction chez les animaux des changements dans le poids des organes de l'appareil reproducteur sont accompagnés de signes histopathologiques, de retard au niveau de la maturation des ovaires et d'une spermatogenèse réduite ont été rapportés avec une incidence minimale à modérée de cellules spermatiques géantes dans les testicules et l'atrophie des tubules séminifères observée chez le chien (A.R.L.A.S.C,2007). Chez le rat, le TMX est largement distribué dans le corps. Ce pendant les résidus les plus élevés sont rapidement retrouvés dans le foie et sont presque complètement absorbés après des doses orales uniques (El-Okle et al.,2016).

En outre, une perturbation notable de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique a été démontrée chez les lézards mâles et femelles exposé au TMX par voie orales, ainsi que des perturbations significatives des niveaux hormonaux de stéroïdes sexuels (Habotta et al.,2021).

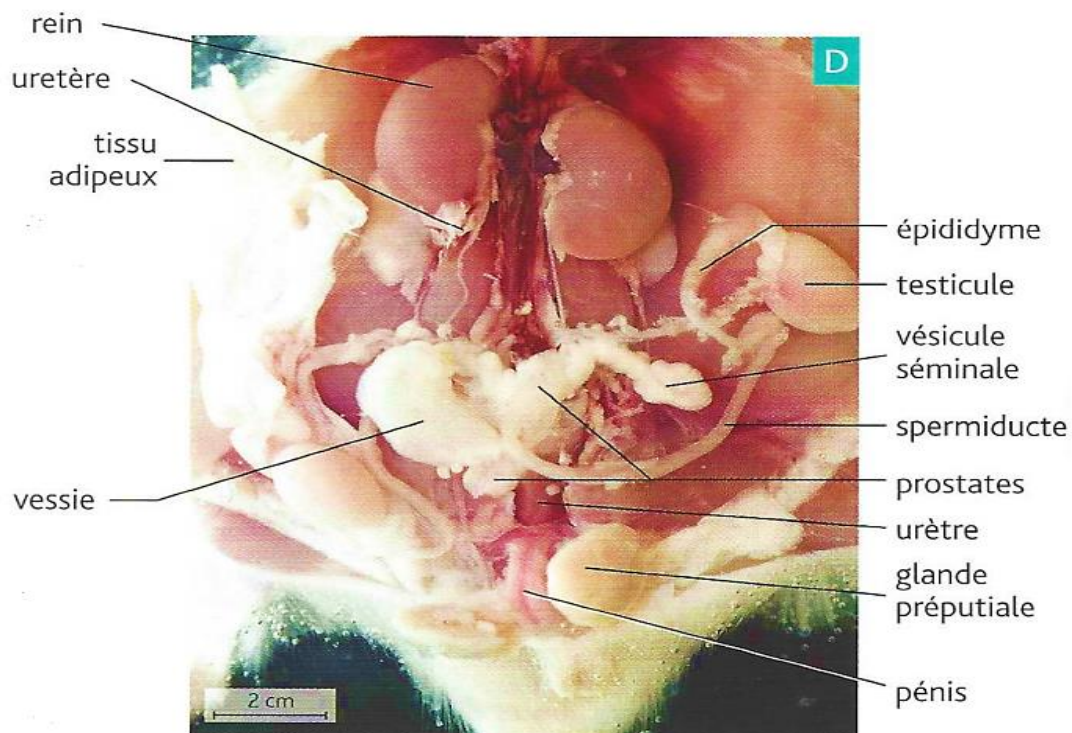
## 2. Rappels anatomo-structuro-fonctionnels du testicule et de l'épididyme

### 2.1.Généralité sur l'appareil reproducteur mâle

L'appareil reproducteur mâle assure la production, la nutrition, le transport et le stockage des gamètes mâles (les spermatozoïdes) dans les voies génitales masculines, ainsi que leur expulsion dans les voies génitales féminines lors du coït et aussi la synthèse des hormones sexuelles (Hamamah,1997).

L'organisation de l'appareil reproducteur mâle est la même chez presque tous les mammifères, y compris le rat, avec néanmoins des différences concernant la taille, le poids et la forme des organes (Hamon et al., 1999). L'appareil reproducteur male est composé de plusieurs structures ; deux gonades ou testicules qui élaborent les gamètes et sécrètent des androgènes, les voies spermatiques qui assurent la maturation des spermatozoïdes et leur acheminement dans les voies génitales femelles, les glandes annexes assurant par leurs sécrétions la qualité du sperme et la nutrition des spermatozoïdes et enfin, le pénis, organe copulateur capable de déposer le sperme dans le vagin de la femelle (Figure 4).

Dans notre étude en va s'interresser sur la structure des deux organes :Testicule et épидидyme.



**Figure 4 :** Organisation anatomique de l'appareil uro-génital de rat mâle (**Boutin et al.,2015**).

### 2.2. Testicules et enveloppes testiculaires

#### 2.2.1. Anatomie

Les testicules ou gonades mâles sont des organes pairs, de forme ovoïde suspendus en dehors de la cavité abdominale, en position sous inguinale. Chaque testicule est logé dans une poche revêtue de peau (le scrotum) et coiffé par l'épididyme (Figure 5). Chez le rat, il mesure en moyenne 2 cm de longueur et pèse 1g lorsqu'il est dépourvu de l'épididyme (**Mansah, 2021**).

Le testicule est entouré d'une capsule conjonctive fibreuse blanche épaisse et résistante, appelée l'albuginée (Figure 5). Cette dernière est riche en fibres de collagène et renferme des fibres musculaires lisses. Cette capsule (l'albuginée) s'épaissit encore au niveau de la coiffe épидидymaire et s'enfonce à l'intérieur du testicule pour former un cône fibreux, le corps d'Highmore parcouru par un réseau de canalicules, le rete testis (Figure 5). Du corps d'Highmore partent des cloisons conjonctives radiaires, la septa testis délimitant 200 à 300 lobules testiculaires. Chaque lobule testiculaire contient 2 à 4 tubes séminifères très longs (lieu de la spermatogenèse) débouchant dans le rete testis par de courts segments rectilignes, les tubes droits (Figure 5). Entre les tubes séminifères se situe le tissu interstitiel contenant des cellules à activité endocrine (cellules de Leydig), actives tout au long de la vie reproductive du mâle (**Soler et al.,1994 ; Cavalie et al., 2017 ; Gordon Betts et al.,2017**).

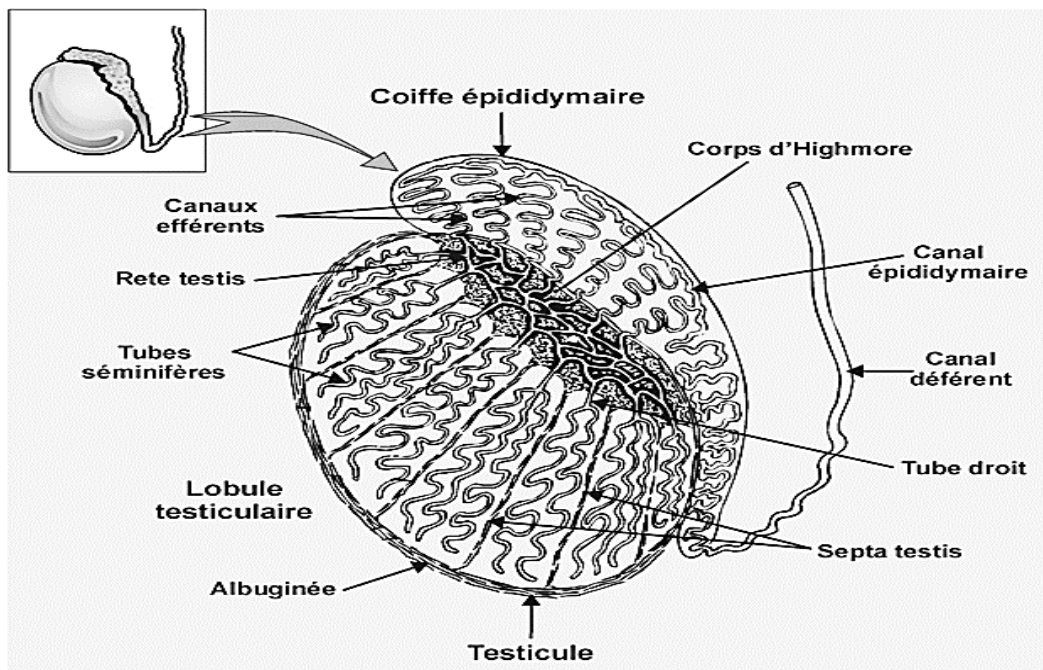


Figure 5 : Schéma du testicule et de l'enveloppe testiculaire (Mieusset et Bujan, 1995).

### 2.2.2. Histologie du testicule

#### 2.2.2.1. Tubes séminifères

Les tubes séminifères 2 à 3 tubes par lobule représentent le compartiment tubulaire du testicule assurant sa fonction exocrine qui est la production de spermatozoïdes. Leur paroi est formée d'un épithélium stratifié comprenant deux types cellulaires : les cellules de la lignée germinale et les cellules de sertoli et d'une membrane basale séparant cet épithélium du milieu interstitiel (Figure 6). La longueur moyenne d'un tube séminifère est de 30 mm chez le rat (Barone, 2001 ; Thibault, 2001).

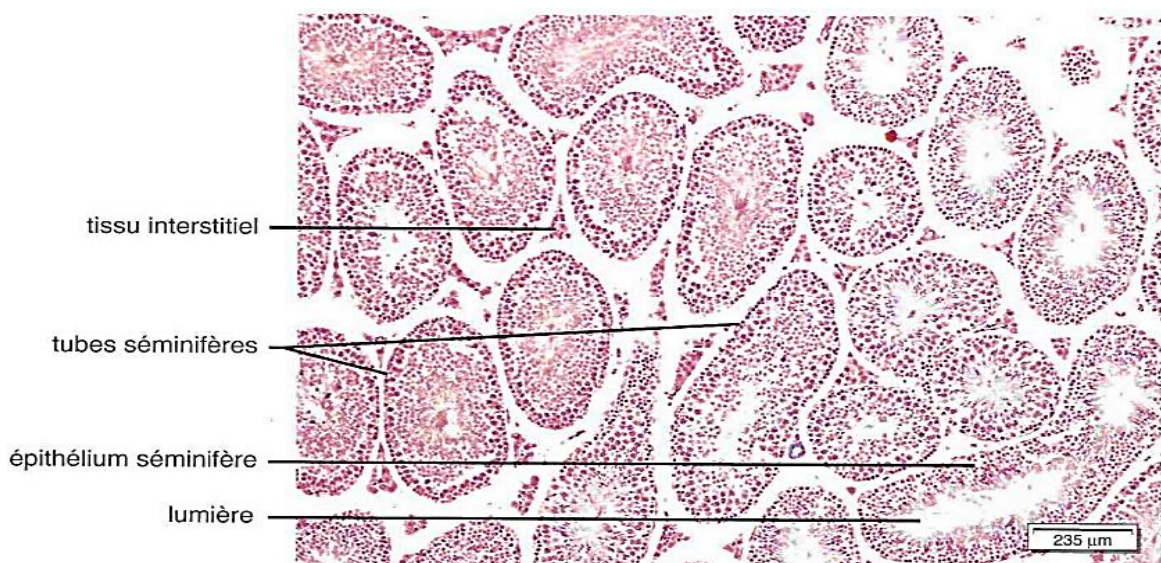
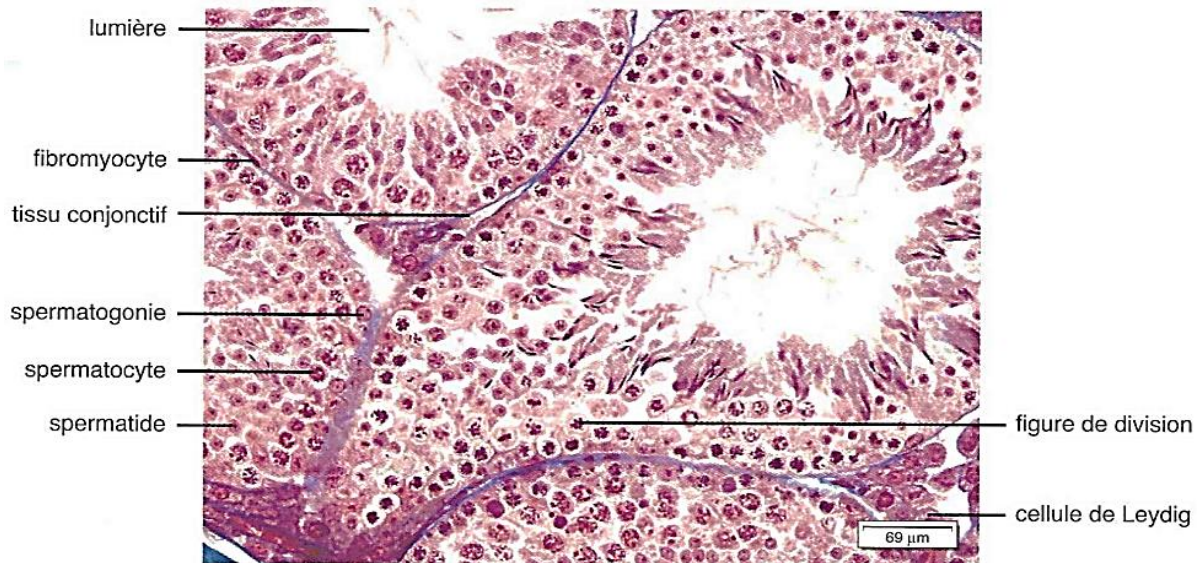


Figure 6 : Coupe histologique du testicule de souris vue au microscope optique (Heusser & Dupuy, 2015).

# Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

## 2.2.2.2. Les cellules de la lignée germinale

Les cellules de la lignée germinale sont hautement organisées dans l'épithélium séminifère et s'étendent de la membrane basale jusqu'à la lumière du tube séminifère. Au cours de leur maturation ces cellules migrent du pôle basal du tube séminifère vers son pôle apical où sont libérés sous formes de spermatozoïdes (gamètes mâles). Les différents types de cellules germinales sont successivement les spermatogonies, les spermatocytes (SP I, SP II), les spermatides et enfin les spermatozoïdes (Figure 7).



**Figure 7 :** Vue plus rapprochée au microscope optique des tubes séminifères montrant les différentes cellules germinales d'un testicule de Souris (**Heusser & Dupuy, 2015**).

Les Spermatogonies sont des petites cellules à noyau arrondi ou ovalaire de 10 à 15µm de diamètre, adhérant à la membrane basale (Figure 8). Il existe deux types de spermatogonies selon l'aspect de leurs noyau (**Fawcette et Burgos, 1956**) : Les spermatogonies de type A, dites poussiéreuses, à noyau homogène, finement granuleux qui se subdivisent elles même par mitose en deux sous-types dont celles qui possèdent un noyau sombre, arrondi avec des nucléoles périphériques et des vacuoles nucléaires, nommées spermatogonies Ad (dark=sombre, dense) qui seraient les cellules souches de réserve, et celles qui présentent un noyau de forme ovale des nucléoles centraux et sans vacuoles nucléaires, nommées spermatogonie Ap (pâle) (**Baunne, 2009**). Quant aux spermatogonies de type B, caractérisées par un noyau arrondi à chromatine mottée et nucléoles bien visibles, elles évoluent par mitose en spermatocytes I (**Vacheret, 1999 ; Siffroi, 2001**).

Les spermatocytes I (SP I ou primaire) sont des cellules diploïdes, arrondies, volumineuses au noyau situé dans le compartiment basal du tube séminifère (Figure 8). Au cours de la

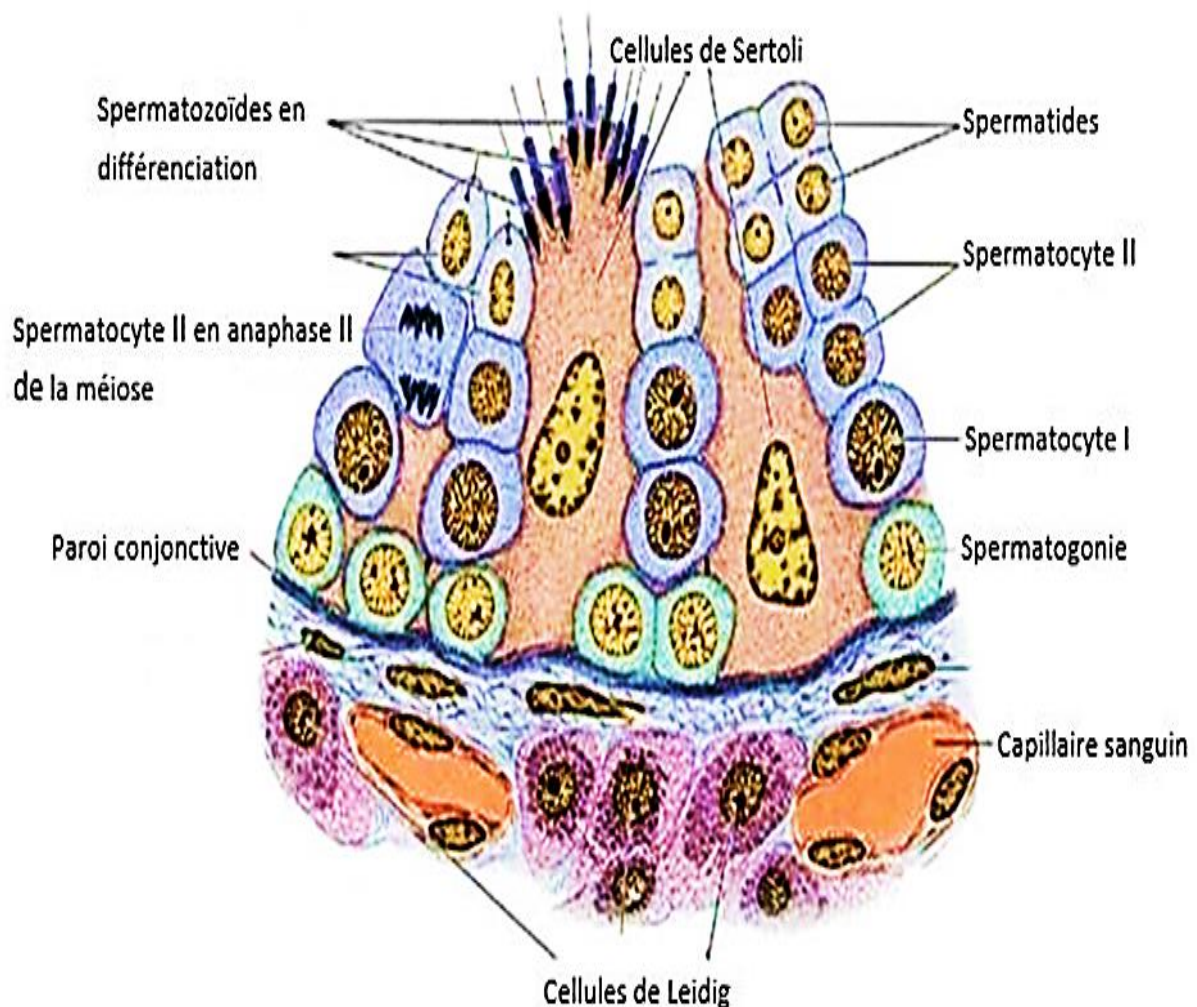
## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

prophase, la cellule passe par cinq stades successifs : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinès (**Baunne, 2009**).

Les spermatocytes II (SP II ou secondaires) sont des petites cellules haploïdes rondes à demi-vie courte (**Siffroi, 2001**), ce qui rend leurs identifications sur les coupes histologiques difficile. Au bout de la deuxième division, il y'a formation de cellules à n chromosomes : les spermatides (**Baunne, 2009**).

Les spermatides sont des petites cellules haploïdes de 6 à 7 microns de diamètre, situées en position interne à proximité de la lumière des tubes séminifères (**Vacheret, 1999 ; Siffroi, 2001**). Ces cellules vont subir une différenciation, aboutissant à la formation des spermatozoïdes allongé puis des spermatozoïdes via la spermiogenèse (**Baunne, 2009**).

Les spermatozoïdes sont des cellules allongées de 60  $\mu\text{m}$  de longueur, présentant une tête conique aplatie sombre et un flagelle séparé de la tête par le col (Figure 8) ; ils sont situés dans la lumière des tubes séminifères (**Vacheret, 1999 ; Siffroi, 2001**).

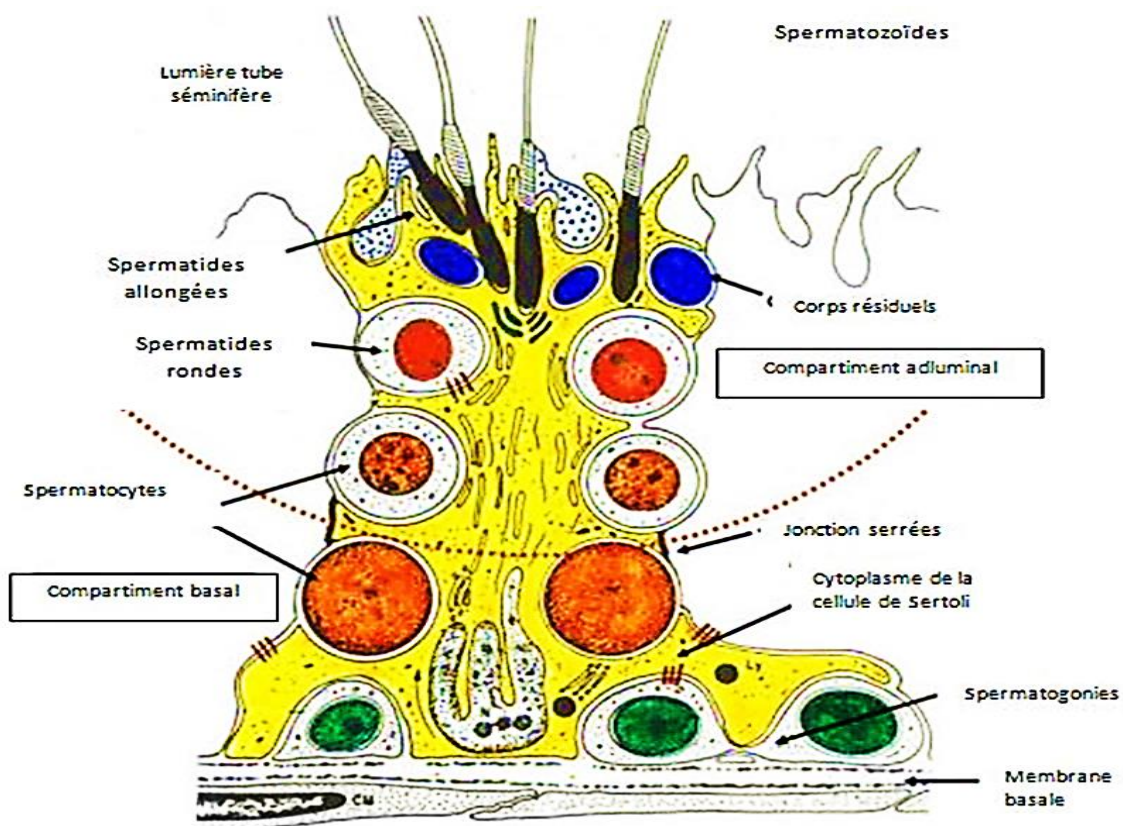


**Figure 8** : Représentation schématique de la paroi d'un tube séminifère (**Prudhomme, 2009**).

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

### 2.2.2.3. Cellule de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont des cellules de forme pyramidale, de grande taille, qui se trouvent au niveau de la membrane basale des tubes séminifères et tendent vers la lumière du tube (**Figure 9 ; Sharma et al., 2011**). La membrane cytoplasmique latérale forme des cryptes où viennent se loger les cellules de la lignée germinale. Le noyau de ces cellules est ovalaire ou triangulaire avec un volumineux nucléole et allongé perpendiculairement à la membrane basale. Les cellules de Sertoli, formant la barrière hémato-testiculaire, assurent la nutrition des cellules germinales en cours de maturation, elles sont donc indispensables au bon déroulement de la spermatogénèse (**Lafon,2010**). Elles secrètent d'hormone antimüllérienne et sont alors facilement visibles par marqueur (**Dugardin et Grise, 2009**).



**Figure 9** : Schéma de l'ultra structure de la cellule de Sertoli (**Fawcett, 1975**)

### 2.2.2.4. Tissu interstitiel et cellules de Leydig

Les espaces compris entre les tubes séminifères sont occupés par un tissu conjonctif lâche, riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et en nerfs ; au sein duquel sont repartis des petites amas des cellules endocriniennes, appelées cellules de Leydig, isolées ou regroupées en petits îlots situés à la proximité des capillaires, et diverses cellules libres (fibroblastes, macrophage, lymphocytes, mastocytes) (**Dadoune et Démolin,1991**). Ces cellules sont essentiellement responsables de la sécrétion de la testostérone la principale hormone androgène et de la

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

Dihydrostérone. Certaines cellules immunitaires sont également présentes (**Soummani et al., 1991**).

### 2.2.3. Fonctions du testicule

Le testicule est une glande mixte, assurant une double fonction ; exocrine par la production de spermatozoïdes et endocrine via la sécrétion des hormones stéroïdiennes.

#### 2.2.3.1. Fonction exocrine des testicules : la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus physiologique qui a lieu dans les tubes séminifères, correspondant à l'ensemble des phénomènes de transformation, de différenciation des cellules diploïdes ( $2n$ ), cellules germinales (spermatogonies), en cellules haploïdes ( $n$ ) ou gamètes mâles, les spermatozoïdes (**Dadoune, 2006**).

La spermatogenèse débute dès la puberté et se poursuit tout au long de la vie de l'individu. Chez le rat comme chez tous les mammifères, elle comprend plusieurs phases, impliquant le passage par trois catégories de cellules germinales (spermatogonies, spermatocytes et spermatides) où chaque type cellulaire correspond à une phase du processus spermatogénique (**Dadoune, 2006**).

La phase de prolifération (Multiplication) correspondant à une succession de mitoses où chaque spermatogonie se divise en deux cellules toujours diploïdes, appelées spermatocytes I.

La méiose est la phase qui permet la transformation des spermatocytes (primaires et secondaires), après passage par deux divisions successives, en spermatides. Chaque spermatocyte I à  $2n$  chromosomes subit un accroissement de taille et une réplication de son ADN c'est au cours de cette étape que le phénomène de crossing-over se produit, puis entre en première division méiotique (division réductionnelle), pour former deux spermatocytes II haploïdes, ces derniers vont subir à leur tour la méiose II (division équationnelle) et donner quatre spermatides haploïdes (Figure 10).

La spermiogenèse est la dernière étape de la spermatogenèse, cette phase est dépourvue de division, mais comporte une différenciation et transformation des spermatides en spermatozoïdes (Figure 10). D'abord, les spermatides rondes se différencient en spermatides allongés, puis se transforment par des modifications structurales et chimiques en spermatozoïdes qui seront libérés dans la lumière des tubes séminifères. Durant cette phase La spermatide subit certaines modifications dont : la condensation du noyau, la formation de la pièce intermédiaire et du flagelle, ainsi que la formation de l'acrosome (**Sharma et Agarwal,**



# Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

## 2.3.1. Anatomie

L'épididyme est un canal unique contourné de longueur variable selon les espèces, chez le rat comme chez tous les mammifères, il est organisé en trois grandes régions anatomiques : la tête (région proximale), le corps (région médiane) et la queue (région distale) (Figure 11) (Noblanc, 2012).

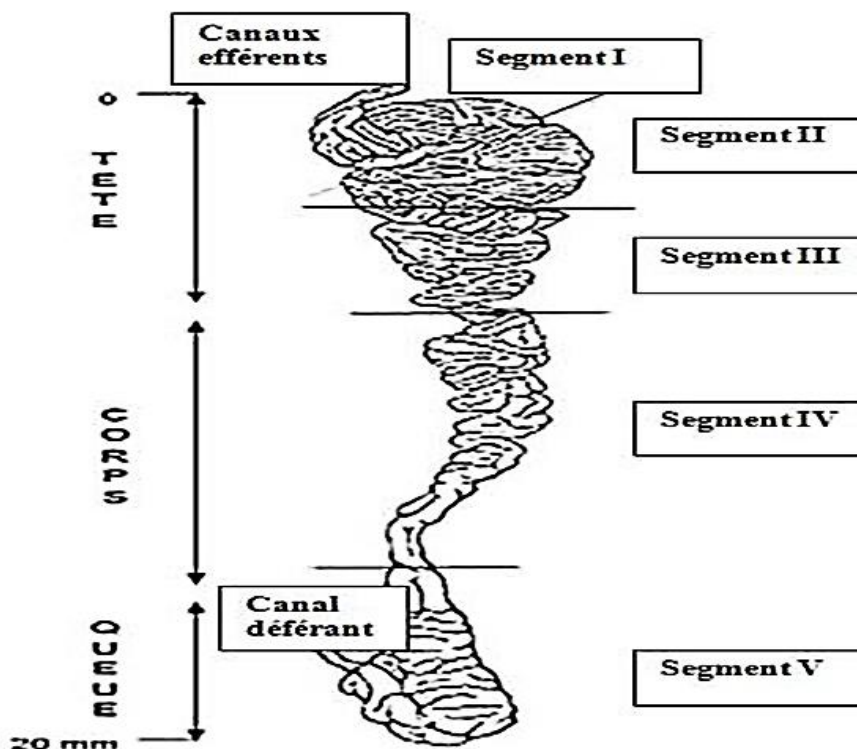
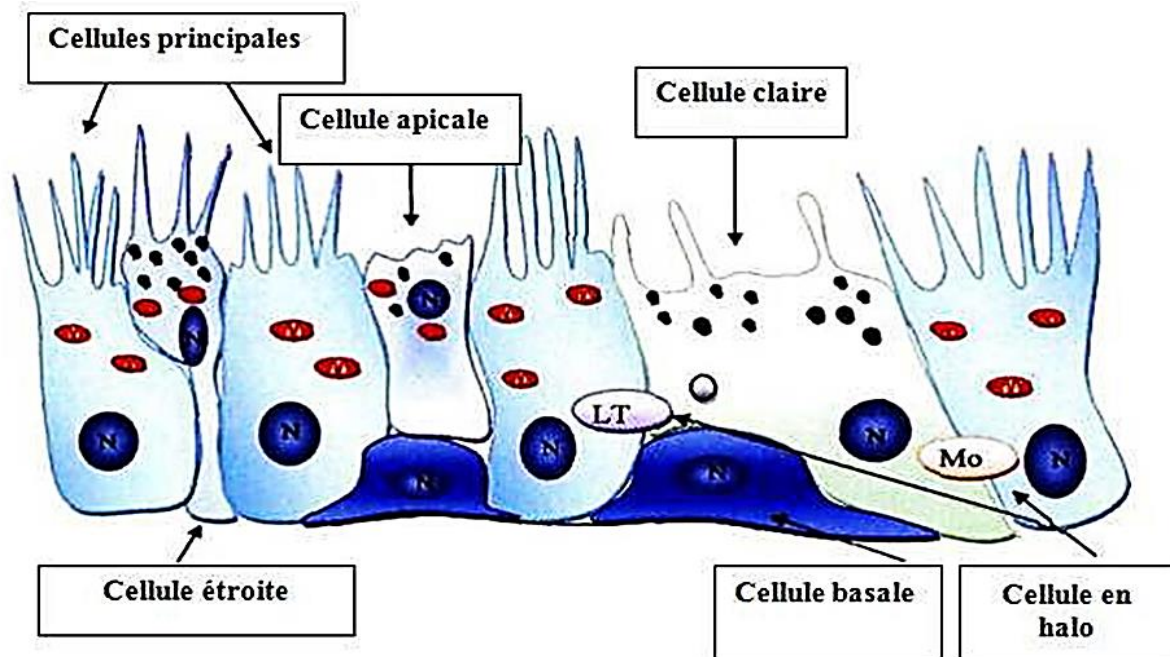


Figure 11 : Anatomie et régionalisation de l'épididyme (Hermo et Robaire, 2002 modifié).

## 2.3.2. Histologie

Le canal épидидymaire comprend deux compartiments : un compartiment constitué d'un épithélium pseudo-stratifié reposant sur un chorion de tissu conjonctif riche en vaisseaux sanguins et des nerfs, lui-même entouré de 2 à 6 couches de fibres musculaires lisses ; et une lumière bordée par cet épithélium (Robaire et al., 2006).

L'épithélium épидидymaire comprend divers types cellulaires présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles différents de la région proximale (la tête) à la région distale (la queue) du tubule. Ces types cellulaires sont les cellules basales, étroites, apicales, claires, en halos et principales (Figure 12) (Robaire et al., 2006 ; Da Silva, 2011).



**Figure 12 :** Représentation schématique de l'épithélium épидидymaire (Girouard, 2009).

**N :** noyau ; **LT :** lymphocyte T ; **Mo :** monocyte

Les cellules principales sont les plus nombreuses, elles représentent 65 à 80% des cellules épithéliales épидидymaire et se trouvent tout au long de l'épидидyme, ce sont des cellules prismatiques à noyau basal avec des stérécils. Leur hauteur est plus élevée au niveau de la tête qu'au niveau de la queue de l'épидидyme (Jones *et al.*, 1979), Leur structure et leurs fonctions varient de façon très importante entre les différentes régions épидидymaire (Hermo et Robaire, 2002) et sont très actives à la sécrétion de petites molécules organiques, et au transport et la sécrétion des protéines, ainsi que la réabsorption du fluide épидидymaire (Robaire et Viger, 1995 ; Cooper, 1998).

Les cellules basales sont des petites cellules hémisphériques avec un noyau irrégulier et un cytoplasme pauvre en organites (Soranzo *et al.*, 1982), situées à la base de l'épithélium (Girouard, 2009). Elles sont distribuées tout au long de l'épидидyme et représentent 10 à 20 % de l'ensemble des cellules épидидymaire. Ces cellules participent à la protection contre les radicaux libres (Veri *et al.*, 1993), ainsi qu'à la protection immunitaire des spermatozoïdes en participant à ce qu'on appelle, la barrière hémato-épидидymaire (Seiler *et al.*, 2000).

Les cellules claires sont de grandes cellules prismatiques, présentes essentiellement dans le corps et la queue de l'épидидyme (Soranzo *et al.*, 1982). Elles contiennent des vésicules de taille variable dans leur région apicale, des lysosomes dans leur région moyenne, et des gouttelettes lipidiques dans leur partie basale et ont une grande capacité d'endocytose (Robaire et Hermo, 1988).

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

Les cellules apicales ont un noyau sphérique en position apicale, d'où leur nom et n'entrent pas en contact avec la membrane basale et sont retrouvées principalement dans la tête épидидymaire. Elles présentent un cytoplasme dense et très riche en mitochondries (Figure 12). Selon **Martinez-Garcia et al., (1995)** les cellules apicales sont impliquées dans l'endocytose des éléments du fluide épидидymaire et dans l'acidification de ce fluide.

Les cellules en halo sont rondes et de petite taille avec un bord étroit, présentent un cytoplasme clair et un noyau dense (**Robaire et al., 2006**). Elles sont présentes tout au long de l'épididyme et se situent à la base de l'épithélium épидидymaire. Elles correspondent aux lymphocytes T ou monocytes (**Hermo et Robaire, 2002**).

Les cellules étroites se retrouvent que dans les segments initial et intermédiaire du tube épидидymaire, sont caractérisées par un cytoplasme riche en vacuole, vésicules d'endocytose, lysosomes et mitochondries et leur membrane apicale émet des villosités courtes, épaisses et irrégulières (**Hermo et al., 2000**).

### 2.3.3. Fonctions physiologiques de l'épididyme

L'épididyme est responsable de transport, de stockage et la protection des spermatozoïdes venant des tubules séminifères. Au niveau de ce conduit, les spermatozoïdes poursuivent leur maturation et acquérant la mobilité et la capacitation. L'épididyme assure l'apport de nutriments et oligoéléments nécessaires à la conservation et la survie des spermatozoïdes, la sécrétion de facteurs de décapacitation, ainsi que de l'élimination de l'excès de sécrétion testiculaire (**Robaire et Hermo, 1988**). Ensuite, les glandes annexes élaborent un liquide dans lequel les spermatozoïdes baignent et reçoivent des substances nutritives facilitant leur survie et leur transport vers le système éjaculateur (**Oberlin et al., 2004**).

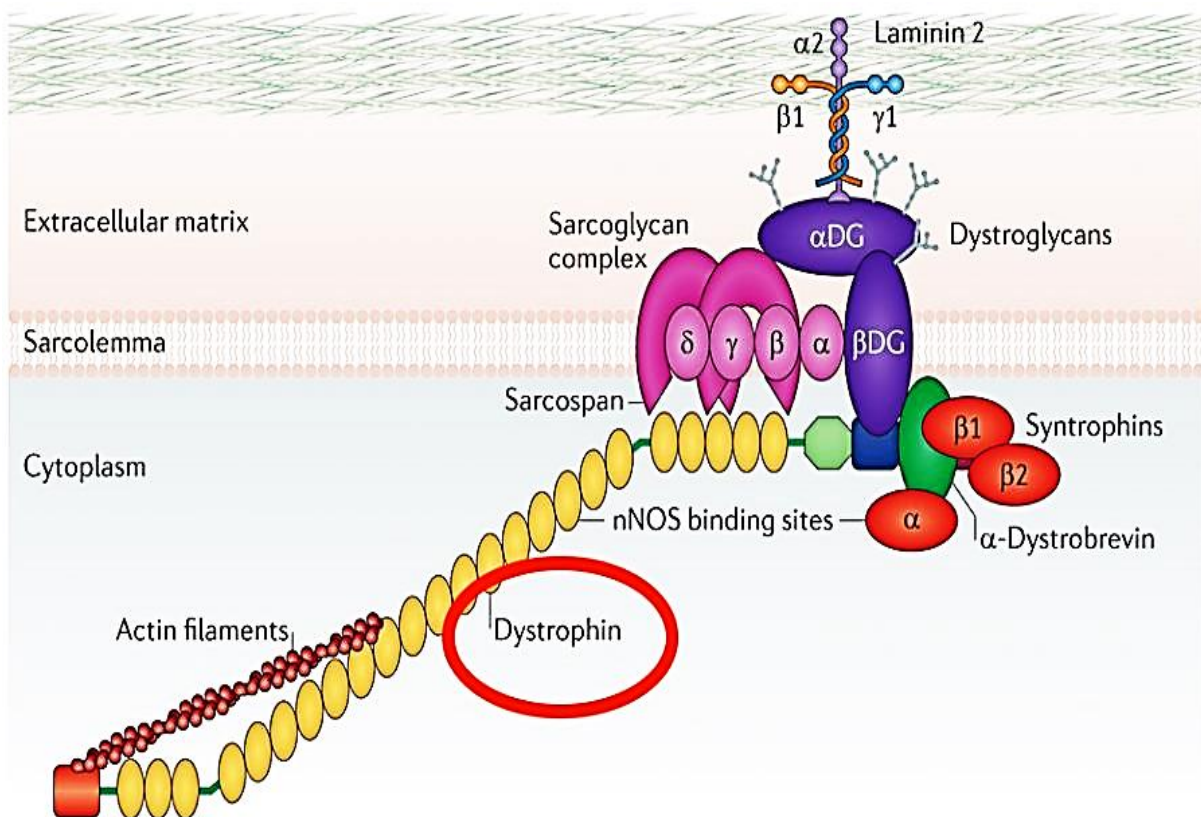
### 3. Dystrophine et protéines associées

La dystrophine (Dp) est une protéine liée à l'édifice membranaire du côté subcortical par l'intermédiaire d'une large gamme de protéines et glycoprotéines, composant le complexe des protéines associées à la dystrophine (DAPC : dystrophin-associated glycoprotéine complexe) dans lequel la Dp joue un rôle central dans le maintien de la structure des cellules notamment musculaires et le recrutement de protéines de régulation et de signalisation.

#### 3.1. Définition

La dystrophine (Dp) fait partie de la grande famille de protéines filamenteuses de type « spectrine » caractérisées par un domaine N-terminal se liant à l'actine ainsi que par la présence de motifs répétés homologues à ceux de la spectrine (**Ben Yaou et al., 2016**).

Elle est tout d'abord décrite comme une protéine filamenteuse, présente sous la membrane du sarcolemme de toutes les fibres musculaires (lisse, strié, ou cardiaque). Elle est en lien intime avec les glycoprotéines du sarcolemme via des protéines cytoplasmiques et elle constitue avec toutes ces molécules un complexe, nommé DAPC (Figure 13). La Dp du sarcolemme est considérée comme l'une des plus grandes protéines humaines, elle est composée de 3685 acides aminés et pèse 427 kDas (**Koenig, 1988**).

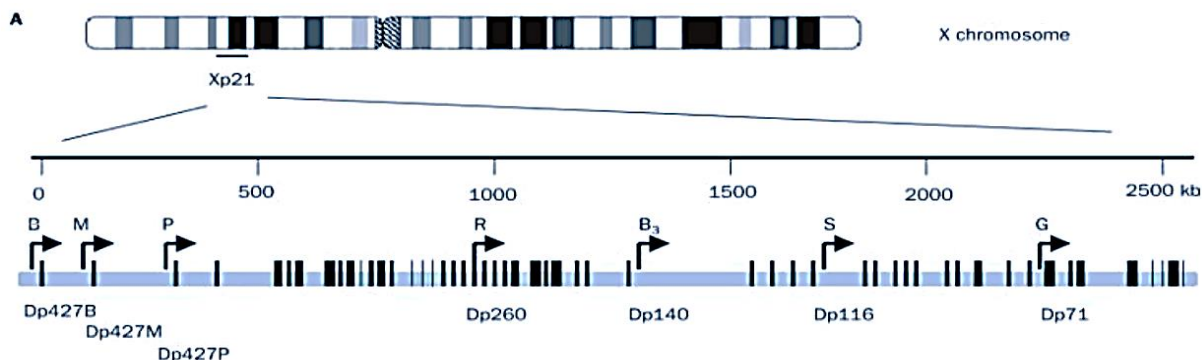


**Figure 13** : Représentation schématique de la dystrophine et des protéines et glycoprotéines associées au niveau d'une fibre musculaire (**Rebecca et al., 2013**).

# Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

## 3.2. Gène DMD de la dystrophine

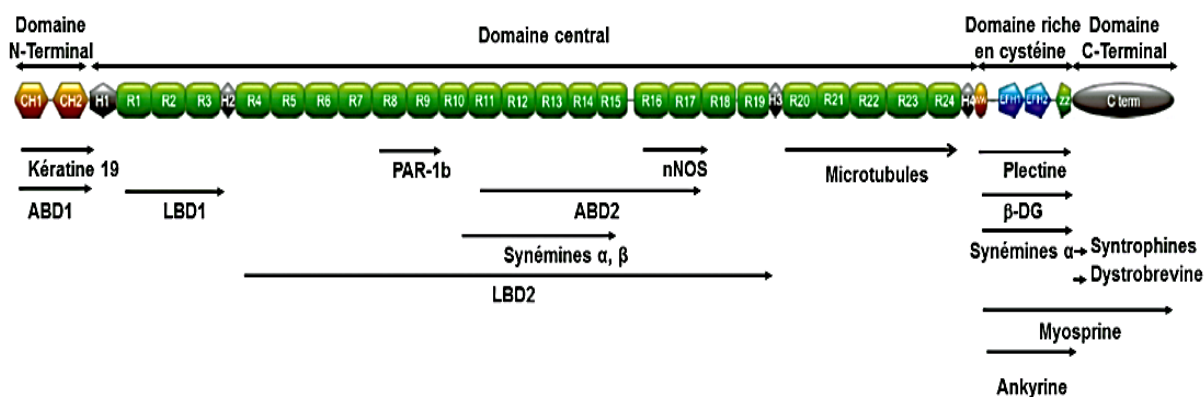
La dystrophine est codée par le gène DMD qui fait défaut chez les patients souffrant d'une forme de myopathie grave (Dystrophie Musculaire de Duchenne : DMD). Sa taille est de 2,4Mb ce qui fait de lui le plus long gène humain ( $2.4 \times 10^6$  paires de bases). Il est situé sur le chromosome X (locus Xp21.2) et constitué de 7 promoteurs, pouvant exprimer en plus de la forme musculaire, la Dp 427 kDa, des formes de plus courtes tailles : Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 au niveau d'autres tissus (Figure 14) (Pons *et al.*, 1993 ; Nicolas *et al.*, 2012).



**Figure 14 :** Présentation de la position du gène DMD sur le chromosome X [Promoteurs (flèche) et exons (traits noirs)] (Muntoni *et al.*, 2003).

## 3.3. Structure et organisation de la dystrophine

La Dp est composée de quatre grands domaines fonctionnels : le domaine de liaison à l'actine (ABD), le domaine central avec ses 24 répétitions, la région riche en cystéine et le domaine C-terminal (Koenig, 1988 ; Blake, 2002).



**Figure 15 :** Les domaines de la dystrophine et leurs protéines de liaison (Ben Yaou *et al.*, 2016).

Le domaine N-terminal de liaison à l'actine (ABD : Actin Binding Domain) est composé de plus de 240 acides aminés et se lie à l'actine. Il est composé de deux sous-domaines homologues à la calponine (calponin homology domaine CH1 et CH2) séparés par une hélice  $\alpha$  (Norwood *et al.*, 2000). Ce domaine comporte 3 régions distinctes ABD 1, 2 et 3 (Ahn *et Kunkel*, 1993 ; Sadoulet- Puccio *et al.*, 1996) et permettrait à chacune l'interaction avec la  $\gamma$ -

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

actine cytosquelettique qui à son tour joue un rôle dans l'ancrage de la dystrophine à la région sous sarcolemmale (**Stromer, 1998**).

Le domaine central est le plus gros fragment constitue 76% de la Dp, il est composé de 2840 acides aminés répartis en 24 séquences répétées similaires aux éléments hélicoïdaux de la spectrine. Ce domaine comporte 4 régions charnières riches en résidus proline conférant à la Dp sa flexibilité et se lie à divers partenaires, notamment l'actine, les lipides membranaires et l'oxyde nitrique synthase (**Nicolas et al., 2012**). La quatrième zone charnière comporte en outre un domaine nommé WW impliqué dans les interactions entre les protéines notamment entre la Dp et le  $\beta$ -dystroglycane, protéine transmembranaire appartenant au complexe protéique associé à la dystrophine (**Sadoulet-Puccio et al., 1997 ; Rentshler et al., 1999**).

Le domaine riche en cystéine (*cysteine rich repeats* ou CRR) est composé de 280 acides aminés allant des résidu 3080 à 3360 et se lie à la protéine membranaire intrinsèque  $\beta$ -dystroglycane ( $\beta$ -DG) qui en interagissant avec l' $\alpha$ -dystroglycane ( $\alpha$ -DG) et les sarcoglycane (SG), formant le complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC : Dystrophin-Glycoproteins Complex) et à l'acide nitrique (**Nicolas et al., 2012**). Ce domaine est composé de quatre sous-domaines : 1 sous-domaine formé de 2 tryptophanes séparées par 21 acides aminés, nommé « WW », 2 motifs en main EF, appelé « EF hand avec EFH1 et EFH2, organisés en structure hélice-boucle-hélice, un sous-domaine en doigt de zinc (ZZ) (**Ben Yaou, 2016**).

À l'extrémité C-terminale (carboxy-terminal) se situe le quatrième domaine de la dystrophine, composé de 325 acides aminés et contient le site de liaison à la dystrobrevine (DB) et aux syntrophines (Syn), protéines cytoplasmiques sous sarcolemmales. Le domaine C-terminal interagit avec la membrane plasmique par l'intermédiaire du  $\beta$  DG (**Blake et al., 1998 ; Nicolas et al., 2012**).

### 3.4. Les protéines associées à la dystrophine

Deux catégories de protéines et glycoprotéines associées se distinguent : les protéines de structure et les protéines cytoplasmiques. Elles assurent des fonctions différentes (**Gao et McNally, 2015 ; Bhat et al., 2018**).

#### 3.4.1. Les protéines de structure

Afin de maintenir un lien entre la matrice extra cellulaire et le cytoplasme de la cellule, la dystrophine interagit avec un grand nombre de protéines du cytosquelette mais également des protéines transmembranaires qui lui permettent son ancrage au sarcolemme des fibres musculaires (Figure 13) (**Blake et al., 2001**). Parmi ces protéines de structure on distingue :

Les dystroglycane (DG) sont les premiers composants du DAPC à être cloner (**Ibraghimov et al., 1992**). Ils sont constitués de deux sous-unités  $\alpha$ -DG et  $\beta$ -DG codés par un seul gène DAG1

## Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

---

situé sur le chromosome 3p21 (**Ishikawa-Sakurai et al., 2004**). Le gène des DG est initialement traduit en une protéine précurseur de 97 kDa qui est ensuite clivée en deux peptides matures :  $\alpha$ -DG qui est extracellulaire et se lie à plusieurs composants de l'ECM notamment la laminine 2 tandis que le  $\beta$ -DG est une protéine transmembranaire qui est reliée à la dystrophine (Figure 13).

Les dystrobrevine (DB) sont des protéines associées et homologues à la Dp, elle ont une séquence significativement identique au domaine C-terminal de la Dp (**Blake et al., 2001**). Elles constituent un ensemble de deux sous unités  $\alpha$ -DB et  $\beta$ -DB. L' $\alpha$ -DB est une protéine codée par le gène DTNA, localisé sur le bras long du chromosome humain 18 en position 18q12, mesurant 180 Kb et contenant 24 exons (**Blake et al., 2002 ; Sadoulet-Puccio, 1996**). Elle est principalement exprimée dans le cerveau, les muscles squelettiques et cardiaques et elle est ancrée au sarcolemme par le biais de son interaction avec le complexe transmembranaire des sarcoglycanes (**Yoshida et al., 2000**). La  $\beta$ -dystrobrevine est codée par le gène DTNB, localisé sur le chromosome humain 2 en position 2p23 et contient 21 exons et mesure 130 KB (**Blake et al., 2002**). La  $\beta$ -DB est abondamment exprimée dans l'encéphale, dans les tissus non musculaires et dans les cellules épithéliales ou elle pourrait avoir un rôle avec les syntrophines dans la polarisation des cellules (**Blake et al., 1998 ; 2002**).

Les sarcoglycanes (SG) sont des glycoprotéines transmembranaires spécifiques du muscle squelettique et cardiaque. Elles s'assemblent en un complexe à six variants :  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - et  $\zeta$ - sarcoglycane associé à une petite protéine appelée sarcospane (Figure 13). La fonction de cet ensemble de protéines est de renforcer l'ancrage de la Dp à la membrane, en consolidant le lien entre les trois composants Dp, DG, l' $\alpha$ -DB (**Nakamori et Takahashi, 2011**).

### 3.4.2. Les protéines cytoplasmiques

Les syntrophines (**Syn**) sont des éléments cytoplasmiques du complexe DAPC. Elles sont identifiées pour la première fois comme des protéines de 58 kDa dans l'organe électrique de la Torpille (**Kramarcy et al., 1994 ; Lapidos et al., 2004**). Les syntrophines sont cinq isoformes différentes de protéines intracellulaires, nommées  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-,  $\gamma$ 1-,  $\gamma$ 2- Syn, codées respectivement par les gènes SNTA1, B1, B2, G1 et G2 (**Adams et al., 2018**).

Les syntrophines sont distribuées différemment dans les tissus et s'associent d'une façon spécifique non seulement à la Dp mais également aux DB. Au sein du DAPC, les Syn jouent le rôle de protéine adaptatrice et permettent de localiser les protéines intracellulaires impliquées dans la signalisation cellulaire, comme l'oxyde nitrique synthase : NOS (**Vandebrouck et al., 2007 ; Sabourin et al., 2009 ; Leyva-Leyva et al., 2009**).

## **CHAPITRE II**

### **Etude expérimentale**

## **Matériel et Méthodes**

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

### 1. Matériel et méthodes

Cette étude a pour objectif de déterminer l'impact d'une exposition sub-chronique à un insecticide de la famille des néonicotinoïdes : le thiaméthoxame (TMX), commercialisé sous le nom d'Actara®, sur la fonction de reproduction. Pour ce faire, nous avons examiné l'aspect histologique et analysé l'expression, ainsi que la distribution des dystrophines, à travers une étude immuno-histochimiques, des deux organes de l'appareil reproducteur, l'épididyme et le testicule, du rat mâle de la souche "Wistar".

Le travail expérimental a été fait à :

- L'animalerie de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB) où les animaux ont été livrés par pasteur rage (Kouba, Alger), et traités par le pesticide le thiaméthoxame « TMX » après une semaine d'adaptation.
- Le laboratoire de Neurochimie de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB où la perfusion des animaux a été réalisée, les organes prélevés et les blocs en cassettes sont confectionnés.
- Le laboratoire d'Anatomo-pathologie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, où des coupes histologiques ont été faites.
- Le laboratoire de physiologie animale de la Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques de L'UMMTO où nous avons procédé au marquage des dystrophines par la méthode immuno-histochimique à la peroxydase.

Nous tenons à préciser que la première partie de l'expérimentation a été faite par des étudiants en master 2 de la FSBSA-UMMTO et ceux de la FSB-USTHB de l'année 2021-22 qui ont fait des études histologiques. En ce qui nous concerne, nous avons démarré les manipulations à partir de la confection des coupes. Cependant, nous maîtrisons parfaitement les étapes précédentes.

#### 1.1. Matériel

##### 1.1.1. Matériel biologique

L'expérimentation a été réalisée durant la période allant du mois de février au mois de mai de l'année 2023.

Pour notre expérimentation, nous avons travaillé sur les blocs de 12 rats mâles de laboratoire : *Rattus norvegicus*, de souche "Wistar", provenant de l'annexe "Rage" de l'Institut Pasteur, Kouba, Alger. Les animaux ont été reçus à l'Animalerie de l'USTHB.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

Selon Yigit (1998), la taxonomie du rat "*Wistar*" est la suivante :

**Règne :** Animal.

**Embranchement :** Vertébrés

**Classe :** Mammifères

**Famille :** Muridés

**Ordre :** Rongeurs

**Genre :** *Rattus*

**Espèce :** *norvigicus*

### 1.2. Méthodes

#### 1.2.1. Traitement des animaux

12 rats mâles, jeunes adultes, âgés de 6 à 7 semaines et pesant entre 300 et 400 grammes, sont utilisés. A leur réception, ces animaux sont adaptés aux conditions de l'animalerie afin d'éviter tout effet de stress. Ils recevaient quotidiennement de la nourriture standard en croquettes *ad-libitum* et de l'eau de robinet. La température ambiante moyenne était de 21-25°C, l'humidité relative de 30-70 % et l'éclairage artificiel de 12 / 12 heures.

Ces rats sont ensuite répartis au hasard en quatre lots, contenant 3 rats chacun. Ils recevaient de l'eau ou du TMX par gavage pendant 10 semaines selon le tableau suivant.

**Tableau 4 :** Caractéristiques des lots de rats.

Lots	Nombre des rats	Traitement administré (dose)
Lot 1 : constitué de rats témoins non traités par le TMX	3	1 ml/j d'eau du robinet
Lot 2 : DJA (dose journalière Admissible)	3	0.026 mg/kg du TMX +1 ml/j d'eau du robinet
Lot 3 : NOAEL (Non Observed Adverse Effect Level).	3	2.6 mg/kg du TMX+ 1 ml/j d'eau du robinet
Lot 4 : NOAEL × 2 (Double dose de NOAEL)	3	5.2 mg/kg de TMX+ 1 ml/j d'eau du robinet

#### 1.2.2. Perfusion intracardiaque et prélèvement des organes

Les animaux ont été anesthésiés par injection intra-péritonéale de 25 g d'uréthane 25% dans de l'eau 100 ml, à raison de 0.5 ml pour 100 grammes de poids corporel.

Après l'anesthésie de l'animal, la perfusion intracardiaque est faite à base de paraformaldéhyde 4% (PAF 4%) comme fixateur.

La perfusion se déroule comme suit :

-L'animale est fixé sur le dos à une planche en liège et ses membres sont étendus et immobilisés avec des épingles.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

- A l'aide de ciseaux, la peau est incisée à partir de l'avant de l'orifice urinaire jusqu'en dessous de la cage thoracique en faisant attention à ne pas endommager les organes internes (le cœur, le foie, l'estomac...).
- Une petite incision est faite dans le ventricule gauche à l'aide des ciseaux.
- Une aiguille de perfusion (aiguille épicroânienne) est ensuite introduite dans la fente et orientée en direction de l'aorte ascendante.
- Rapidement, une autre fente est pratiquée au niveau de l'oreillette droite afin de permettre l'évacuation des solutions de perfusion.
- Avant le fixateur, la perfusion est faite avec une solution saline (0.9 %) jusqu'à ce que le liquide qui ressort de l'oreillette droite soit exempt de sang.
- La perfusion se poursuit ensuite avec la solution de fixation : PAF 4% (Environ 150 à 200 ml avec un débit moyen de 14 ml/min).

Après la perfusion, les organes d'intérêt, notamment l'épididyme et les testicules sont délicatement prélevés.

### 1.3. Technique histologique

L'étude histologique implique la mise en œuvre de plusieurs étapes obligatoires afin de réaliser des coupes de l'échantillon étudié. Le protocole de notre étude se déroule comme suit :

#### 1.3.1. Post fixation

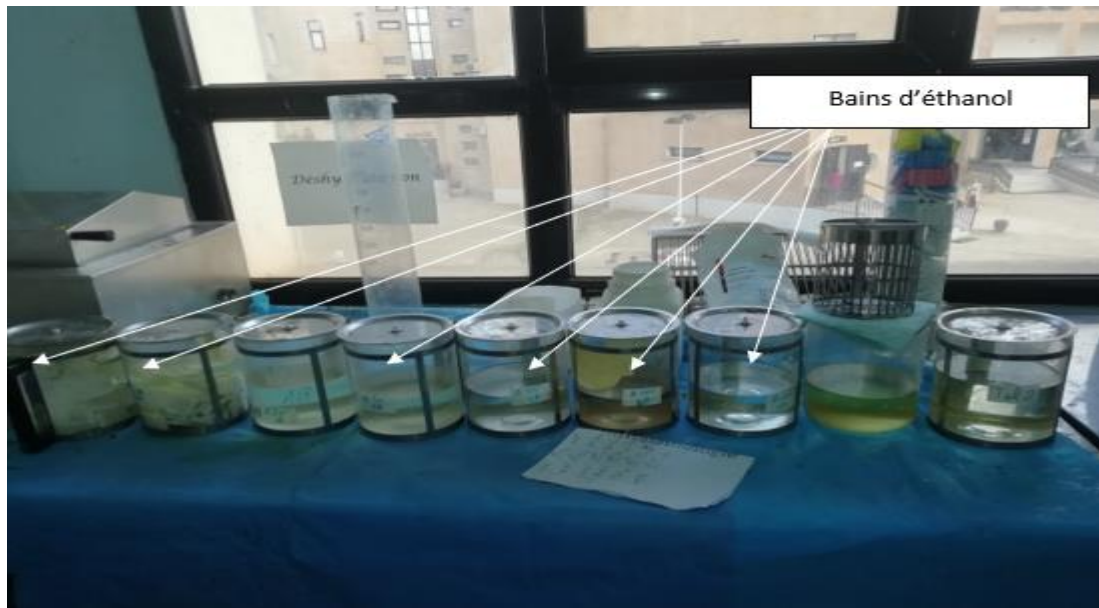
Après le prélèvement, les organes sont ensuite immergés dans la solution de fixation (PAF4%). La fixation ou post fixation permet de conserver les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état vivant en s'opposant au processus d'autolyse et aussi de les protéger contre les réactions bactériennes et enzymatiques (Nzelof,1972).

#### 1.3.2. Lavage

Afin d'éliminer les traces de fixateur les organes sont ensuite lavés à l'eau courante pendant 30 minutes.

#### 1.3.3. Déshydratation et éclaircissement

La déshydratation consiste à éliminer totalement la quantité de l'eau contenue dans l'organe pour permettre la pénétration de la paraffine dans les tissus car cette dernière n'est pas miscible dans l'eau. La technique de déshydratation se fait manuellement en passant progressivement l'organe dans des bains d'éthanol à degrés croissants (70°, 90°, 100°) pendant 30 minutes pour chaque bain, puis dans deux bains de xylène pendant 1h chacun pour compléter la déshydratation et préparer l'imprégnation de l'organe à la paraffine, car l'éthanol n'est pas miscible à la paraffine (Figure 16).



**Figure 16 :** Photographie de la série des bains de déshydratation (Originale 2023).

### 1.3.4. Imprégnation

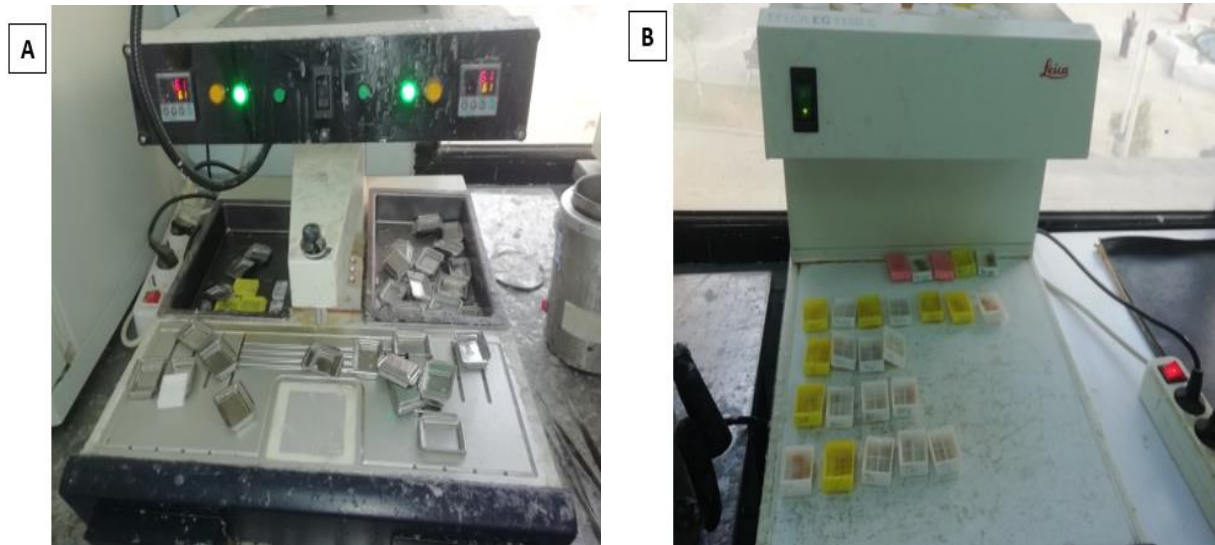
L'imprégnation est une étape nécessaire pour faire des coupes, elle consiste à déposer les organes immédiatement après la déshydratation dans 3 bains successifs de la paraffine, à 60°C (la température où la paraffine devient liquide) pendant 2 heures du temps pour chacun.

### 1.3.5. Inclusion

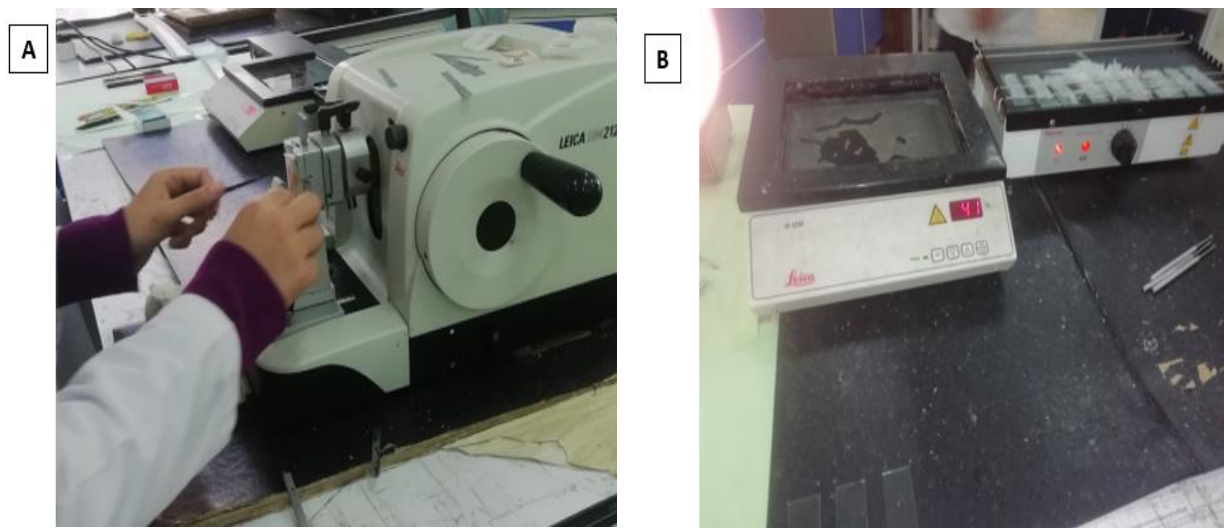
L'inclusion est l'opération qui consiste à enrober l'organe déshydraté dans de la paraffine pure fondue à 60°C. Les organes sont placés au milieu des moules spécifiques en inox, remplis de paraffine, puis des cassettes en plastique sur lesquelles sont inscrits les numéros des échantillons sont déposées sur les moules, ensuite la paraffine fondue est versée une autre fois jusqu'à son débordement (les cassettes soient totalement immergées). Ensuite, les blocs sont peu refroidis rapidement sur une plaque réfrigérée afin d'obtenir des blocs solides faciles à démouler (Figure 17).

### 1.3.6. Confection des coupes et étalement

Nous avons réalisé des rubans fins de 5µm d'épaisseur sur les blocs d'organes, à l'aide d'un microtome à paraffine de type Leica (Figure 18A). Les coupes sont déposées sur un bain marie (41°C) et récupérées sur des lames gélatinées propres (Figure 18B).



**Figure 17 :** Machine à enrobage (A) et Blocs réfrigéré (B) (Originale 2023).



**Figure 18 :** Microtome (A), Bain marie et Plaque chauffante (B) (Originale 2023).

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

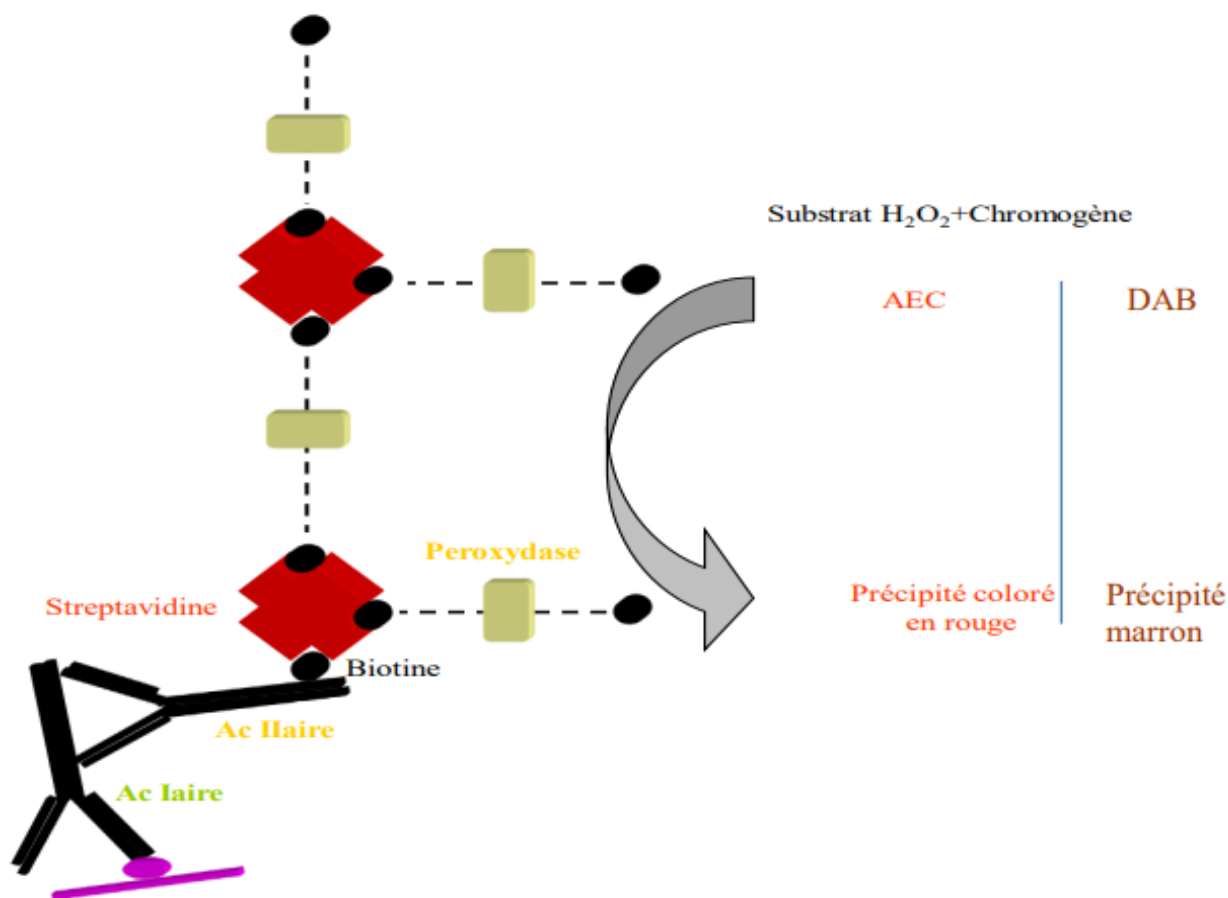
### 1.4. Technique immuno- histochimique

#### 1.4.1. Son principe

L'immunohistochimie (IHC) est une technique largement utilisée en histo- et cytopathologie depuis plus de vingt ans. Elle a considérablement amélioré le diagnostic morphologique, en particulier dans le domaine des maladies cancéreuses. Son objectif et son principe consistent à détecter certaines protéines cellulaires spécifiques, qu'elles se trouvent dans le cytoplasme, la membrane ou le noyau, en utilisant une réaction antigène-anticorps (**Genton, 2006**).

#### 1.4.2. L'IHC à la peroxydase avec amplification

L'IHC à la peroxydase utilise des anticorps dirigés contre les protéines cibles, et le complexe formé est visualisé à l'aide d'un anticorps secondaire biotinylé qui se lie fortement à la streptavidine conjuguée à la peroxydase (Figure 20). Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) sont respectivement utilisés comme substrat de l'enzyme et chromogène de la réaction, ce qui produit une coloration brunâtre (**Garaud et Roussel, 2004**).



**Figure 19** : Technique immuno- histochimique enzymatique indirecte par amplification (**Garaud et Roussel, 2004**).

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

Une fois les coupes histologiques du testicule et de l'épididyme réalisées et montées sur des lames gélatinées, nous passons à la deuxième étape de la technique d'immunohistochimie (IHC) :

### 1.4.3. Etapes de l'IHC en pratique

#### 1.4.3.1. Déparaffinage

Les lames sont placées sur une plaque chauffante pendant quelques minutes pour faire fondre la paraffine. Ensuite, elles sont incubées dans deux bains de xylène pendant 2 minutes chacun à température ambiante pour éliminer la paraffine des échantillons (Figure 21).



**Figure 20** : Photographie montrant l'étape de déparaffinage avec une Plaque chauffante, les bains de xylène et d'autres d'alcool (**Originale 2023**).

#### 1.4.3.2. Réhydratation

Cette étape s'effectue en passant les lames dans une batterie de bains d'éthanol à degrés décroissants (100°, 90°, 70°) pendant 02 min dans chacun, puis elles sont rincées à l'eau du robinet pendant 2 minutes (Figure 20).

#### 1.4.3.3. Démasquage des sites antigéniques et préincubation

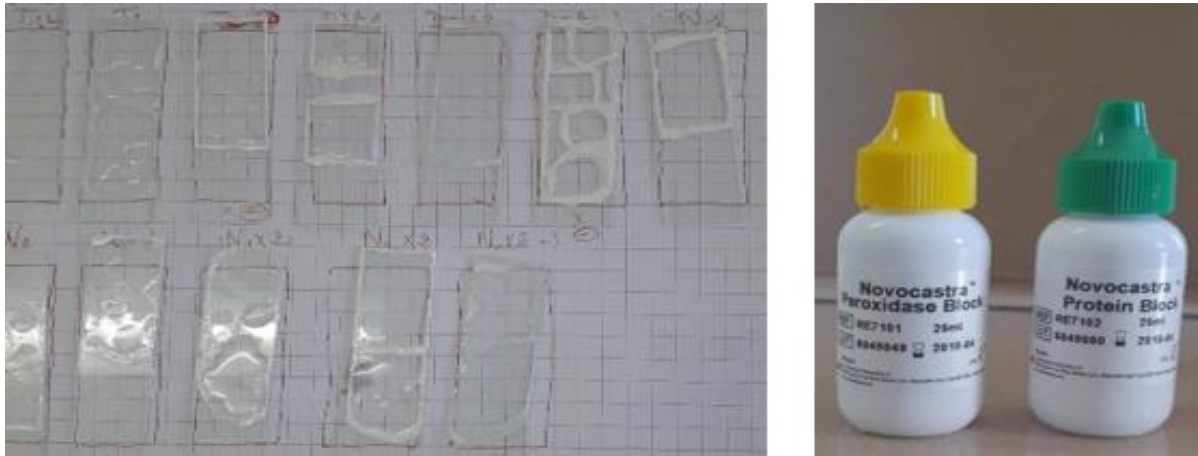
Le démasquage permet de rendre accessibles les épitopes masqués naturellement ou suite à la fixation afin de les rendre accessibles aux anticorps et rendre possible la réaction antigène-anticorps. Ce démasquage est particulièrement recommandé dans le cas d'échantillons inclus à la paraffine (**Shi et al., 1991**).

Les coupes sont ensuite perméabilisées pendant 15 min dans du PBS avec un PH 7.4 et Tween 20 à 0.1 %, par la suite les lames ont été lavées deux fois avec du PBS pendant 05 min chacun.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

### 1.4.3.4. Blocage des sites aspécifiques

Les lames sont incubées dans un mélange de PBS avec 3% de peroxydase block 01 pendant 15 minutes pour bloquer les peroxydases endogènes à l'aide de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ensuite, elles sont rincées deux fois avec du PBS pendant 5 minutes chacun. Une deuxième solution de block 02 est appliquée sur les lames pendant 15 minutes, suivie de deux rinçages avec du PBS. Cette étape permet de bloquer les sites de fixation non spécifiques à l'aide de la caséine (Figure 21).



**Figure 21** : Photographie montrant l'étape d'incubation avec les solutions de blocage (Originale 2023).

### 1.4.3.5. Incubation avec l'anticorps primaire

Dans une chambre humide à température ambiante, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-dystrophines puis déposées dans un frigidaire (T +4 C°) et ce pendant toute la nuit. Les coupes du contrôle négatif ont été incubées avec la solution de blocage sans l'anticorps primaire.

### 1.4.3.6. Révélation du signal

#### 1.4.3.6.1. Incubation avec l'anticorps secondaire et streptavidine peroxydase

Les coupes ont été lavées deux fois pendant 05 min avec du PBS. Ensuite, elles sont incubées pendant 30 min avec l'anticorps secondaire anti-IGg de lapin biotinylé (Leica biosystems, France), puis elles sont rincées deux fois avec du PBS 05 min chacun.

Après cette étape, les lames sont incubées avec un complexe streptavidine-peroxydase (Novolin, Leica biosystems) pendant 30 min, puis rincer avec du PBS deux fois 05 min chacun.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

### 1.4.3.6.2. Chromogène

L'immunomarquage est révélé en utilisant le chromogène Diamino-benzidine-tetrahydrochloride (DAB) dans un tampon de substrat DAB (Novolink, Leicabiosystems) dilué avec 0.1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les lames sont laissées quelques secondes pour permettre la coloration (révélation). Ensuite, elles sont rincées à l'eau du robinet.

### 1.4.3.6.3. Contre coloration

Les lames sont immergées dans une solution de 0.1% d'hématoxyline pendant 5 à 10 minutes (Figure 22). Ensuite, elles sont rincées à l'eau du robinet. Cette étape est essentielle pour visualiser les noyaux.



**Figure 22 :** Photographie montrant l'étape d'incubation avec de l'hématoxyline (**Originale 2023**).

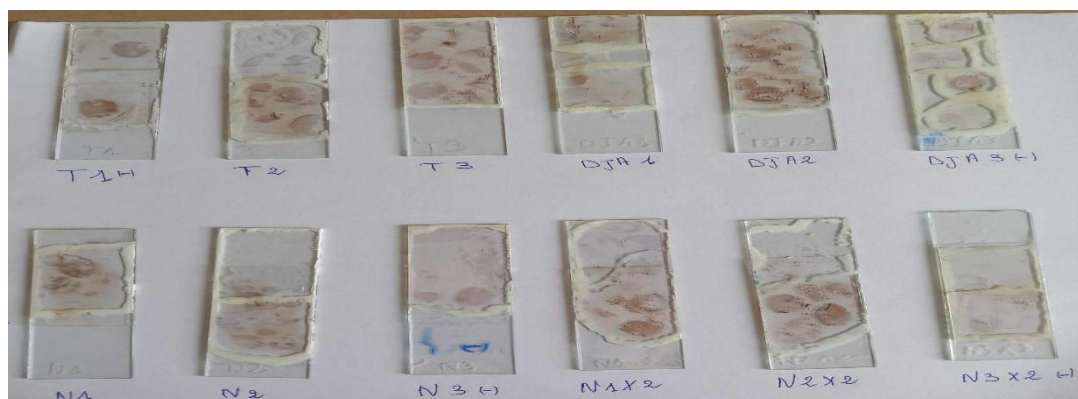
### 1.4.3.7. Montage des lames

#### 1.4.3.7.1. Déshydratation

Les tissus sont déshydratés dans trois bains d'alcool à degrés croissants (70%, 95%, 100%) pendant 1 minute chacun, ensuite passés dans 2 bains de xylène pendant 1 minute chacun.

#### 1.4.3.7.2. Le montage

Le montage des lames a été fait avec la résine synthétique (Eukit). Les lamelles sont ensuite laissées sécher à l'air libre (Figure 23).



**Figure 23 :** Photographie montrant l'étape du montage avec l'eukitt (**Originale 2023**).

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

### 1.5. Observation microscopique

Les lames histologiques sont observées à différents grossissements (x40, x100 et x400) à l'aide d'un microscope optique muni d'une caméra et connecté à un ordinateur afin d'enregistrer les microphotographies (Figure 24).



**Figure 24 :** Microscope avec caméra connecté à un ordinateur (Originale 2023).

### 1.6. Analyse morphométrique

L'étude morphométrique est effectuée sur des coupes histologiques des structures testiculaires et épидидymaires d'animaux témoins et traité au thiaméthoxame. Les mesures sont réalisées à l'aide du logiciel "Axio Vision Rel.4.8" et incluent la surface des tubes séminifères, leur diamètre, leur lumière, la surface du tissu interstitiel et de l'épithélium séminifère, la surface des noyaux de spermatogonies pour le testicule, ainsi que la surface et le diamètre de l'épididyme et le diamètre de l'épithélium épидидymaire.

### 1.7. Etude statistique

Les présentations graphiques des données et des résultats individuels ont été enregistrés puis groupées sur une base de données Excel puis traités par « le logiciel Graphpad prism 9 ». Les valeurs obtenues sont présentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. Les tests de normalité et d'homogénéité des variances ont été appliqués pour vérifier une série d'observation.

La comparaison de la moyenne pour les 4 groupes a été faite comme suit :

- Si la normalité et l'homogénéité sont vérifiées, on utilise un test paramétrique de l'ANOVA.

Le calcul du degré de significativité s'est fait entre les valeurs moyennes, la significativité est définie pour une probabilité p avec un risque de 5% :

- Si  $P \geq 0.05$  : la différence est non significative

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

- Si  $P \leq 0.05$  : la différence est peu significative \*
- Si  $P \leq 0.01$  : la différence est significative \*\*
- Si  $P \leq 0.01$  : la différence est très significative \*\*\*
- Si  $P \leq 0.001$  : la différence est hautement significative \*\*\*\*

### 2. Le marquage non quantifié :

Le principe de cette étape consiste à examiner la quantité et la localisation du marquage des dystrophines au niveau des structures du testicule et de l'épididyme et ensuite de repérer d'éventuels changements entre le tissu des témoins et celui des animaux traités au TMX.

Cette méthode a été utilisée pour quantifier l'intensité du marquage de la dystrophine dans les structures de l'épididyme et du testicule chez les rats mâles adultes de souche Wistar. Les images ont été prises à l'aide d'un microscope optique équipé d'une caméra numérique, par la suite les images sont analysées.

Nous avons évalué l'existence et la spécificité du marquage, ainsi que l'intensité du dépôt chromogénique (absente, faible ou marquée). Les cellules considérées comme positives sont celles présentant une coloration nucléaire marron.

Pour évaluer le marquage, nous avons utilisé les critères suivants :

- Cellule non marquée —
- Cellule légèrement marquée +
- Cellule modérément marquée ++
- Cellule fortement marquée +++

## **Résultats et Discussion**

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

### 2. Résultats

Certaines coupes présentaient un marquage peu visible en raison d'un mauvais contact de l'anticorps primaire ou des solutions de révélation lors des incubations.

#### 2.1. Aspects histologiques

##### 2.1.1. Histologie du testicule

L'observation au microscope photonique au grossissement x100 des coupes de testicules des rats témoins montre de nombreux canalicules de différentes tailles correspondant aux tubes séminifères (Figure 25A). Chaque tube séminifère est constitué de couches cellulaires composant l'épithélium germinatif.

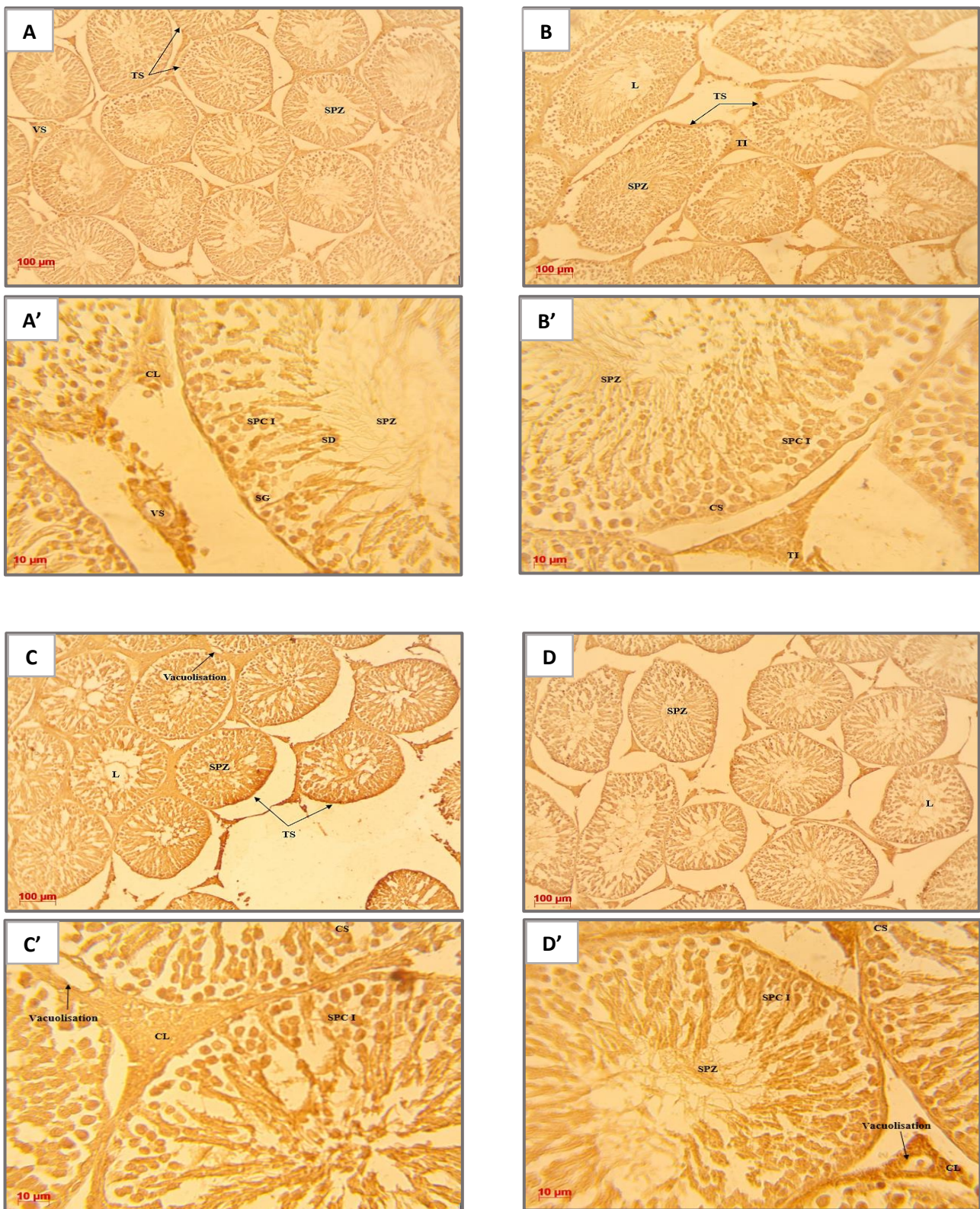
Au grossissement x400 (Figure 25A'), nous reconnaissons de l'extérieur vers la lumière de l'épithélium plusieurs couches arrangées de cellules germinales, avec les spermatogonies près de la paroi basale et les spermatides plus matures vers la lumière centrale du tubule, ainsi que les cellules de Sertoli formant la charpente des tubes séminifères et permettant le soutien et la cohésion des cellules germinales. Entre les tubes séminifères se trouve du tissu conjonctif (TC) contenant les vaisseaux sanguins (Vs) et les cellules de Leydig (CL).

L'examen morphologique des testicules des rats du lot DJA (Figure 25B), traités par 0.026 mg/kg de TMX, n'a révélé aucun changement histologique exceptionnel. En effet, on observe de nombreux tubes séminifères séparés par un tissu vascularisé renfermant des cellules interstitielles ou cellules de Leydig. La paroi de ces tubes séminifères englobe une série de cellules germinales à différents stades, allant des spermatogonies jusqu'aux spermatozoïdes accumulés dans la lumière des tubes séminifères, en passant par les spermatocytes et les spermatides (Figure 25B').

L'analyse des coupes histologiques des testicules de rats du lot NOAEL (Figure 25C et C'), traités par 2.6 mg/kg de TMX, la dose semble avoir provoqué des altérations tel qu'une réduction de la surface de la lumière des tubes séminifère et des vacuolisations au niveau du tissu conjonctif.

Le tissu testiculaire des rats du lot NOAEL x 2, traités par 5.2 mg/kg de TMX (Figure 25D), présente des changements histologiques spécifiques au niveau des tubules séminifères, relativement à ceux des rats témoins, montrent une réduction du nombre de spermatozoïdes au niveau de la lumière avec un élargissement de la lumière centrale. Par ailleurs, des vacuolisations semblent beaucoup plus importantes, cependant les vaisseaux sanguins de ce dernier paraissent plus dilatés (Figure 25D').

## Chapitre 2 : Etude expérimentale



**Figure 25** : Coupes histologiques du testicule chez les rats témoin (A et A') et traités pendant 10 semaines par le thiaméthoxame : DJA (B et B'), NOAEL (C et C'), NOAEL x 2 (D et D').

**L** : lumière ; **SPZ** : spermatozoïdes ; **TI** : tissu interstitiel ; **Sg** : spermatogonies ; **SPC I** : spermatocyte I ; **VS** : vaisseaux sanguins ; **TS** : tubes séminifères ; **SD** : spermatide ; **CL** : cellules de Leydig ; **CS** : cellules de Sertoli.

Barre d'échelle : 100 µm (x100) pour A/ B/ C/ D et 10 µm (x400) pour A'/ B'/ C'/ D'.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

### 2.1.2. Histologie de l'épididyme

L'examen microscopique au grossissement x100 des coupes histologiques de l'épididyme des rats du lot témoin (Figure 26A) nous a permis d'observer des tubules épидидymaires entrelacés et enroulés les uns autour des autres. Ces tubules présentent un épithélium uniforme, ils sont délimités par une fine couche de tissu musculaire lisse et leur lumière contient des spermatozoïdes.

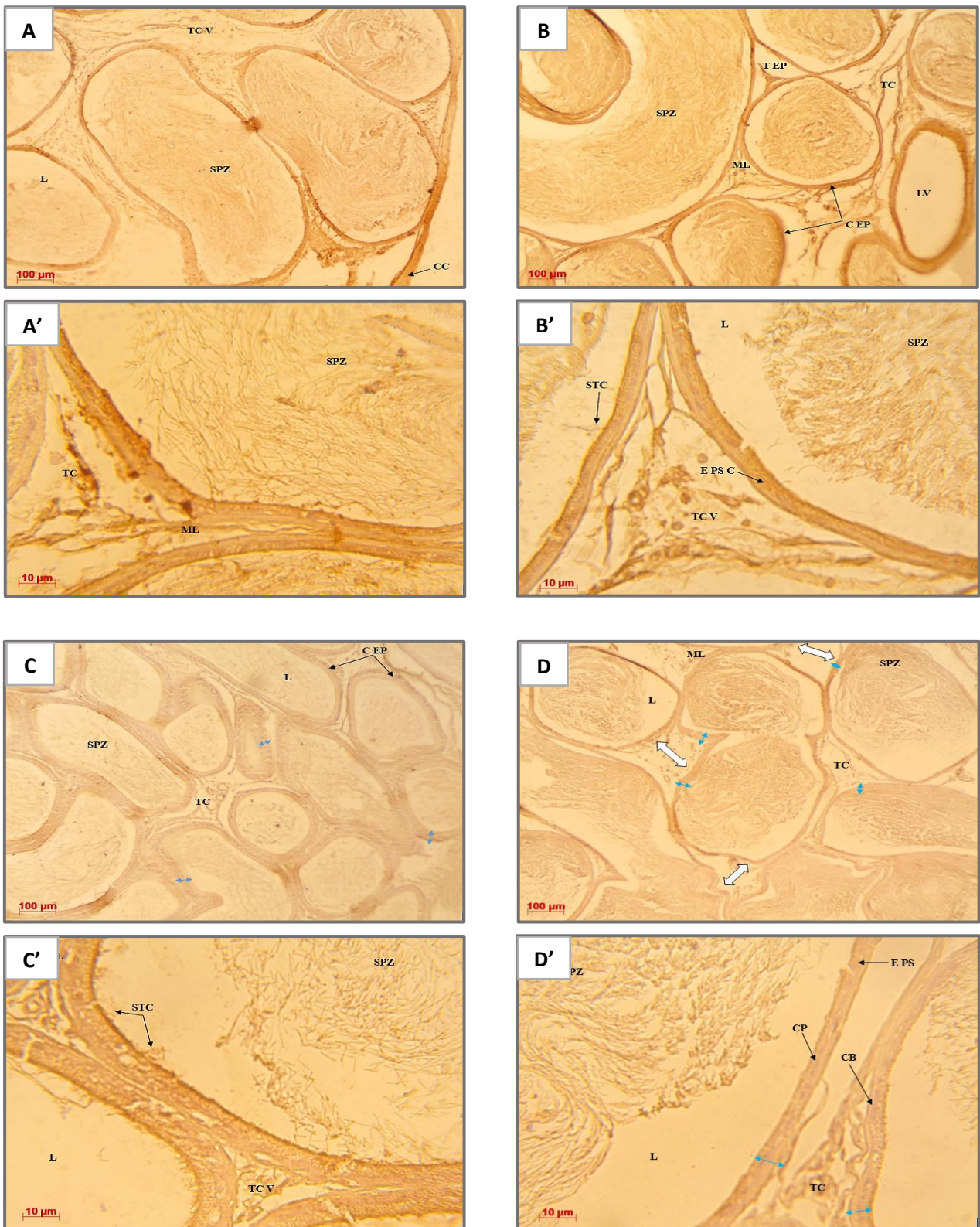
Au grossissement x400 (Figure 26, A'), l'épithélium apparaît pseudo-stratifié cylindrique, avec des cellules principales, appelées cellules prismatiques ; ce sont les cellules épithéliales les plus abondantes, alignées le long des parois des tubules et montrant des microvillosités (stéréocils) à leur surface apicale. Quant aux cellules basales, elles délimitent le côté basal de l'épithélium d'une façon discontinue. Par ailleurs, des vaisseaux sanguins sont observés dans le tissu conjonctif remplissant les espaces inter-tubulaires.

L'aspect histologique de l'épididyme des rats du lot DJA traités par 0.026 mg/kg de TXM, ne montre aucune modification structurale apparente comparativement aux témoins (Figure 26B). Il en est de même pour l'épithélium épидидymaire qui présente le même aspect général que celui des témoins, en effet, il est simple, pseudostratifié et stéréo-cilié au pôle apical, où des spermatozoïdes sont visibles dans la lumière épидидymaire (Figure 26B').

En ce qui concerne la dose NOAEL, correspondant à 2,6 mg/kg de TMX, elle semble affecter partiellement la structure histologique de l'épididyme (figure 26, C). En effet, au fort grossissement, nous avons noté la présence d'une hyperplasie régénératrice au sein de l'épithélium, une diminution peu visible de l'espace entre les tubules et aussi de la masse des spermatozoïdes (figure 26, C').

Au niveau de la structure histologique épидидymaire des rats du lot NOAEL x 2, traités par 5.2 mg/kg de TMX (Figure 26, D), nous avons détecté certaines modifications, telles que la présence d'une hyperplasie de l'épithélium pseudostratifié, une augmentation de l'espace inter tubulaire et une diminution peu remarquable du nombre des spermatozoïdes dans la lumière (Figure 26D').

## Chapitre 2 : Etude expérimentale



**Figure 26 :** Coupes histologique de l'épididyme chez les rats témoins (A, A') et traités pendant 10 semaines par le thiaméthoxame : DJA (B, B'), NOAEL (C, C') et NOAELx2 (D, D').

**SPZ :** spermatozoïdes ; **L :** lumière ; **CB :** cellules basales ; **CP :** cellules principales ; **STC :** stéréocils ; **CEP :** canaux épидидymaires ; **LV :** lumière vide ; **TC V :** tissu conjonctif vasculaire ; **ML :** muscles lisses ; **E P S C :** épithélium pseudostratifié cylindrique ; **CC :** capsule conjonctif ; **↔ :** hyperplasie ; **↔ :** espace inter tubulaires.

Barre d'échelle : 100 µm (x100) pour A/ B/ C/ D et 10 µm (x400) pour A'/ B'/ C'/ D'.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

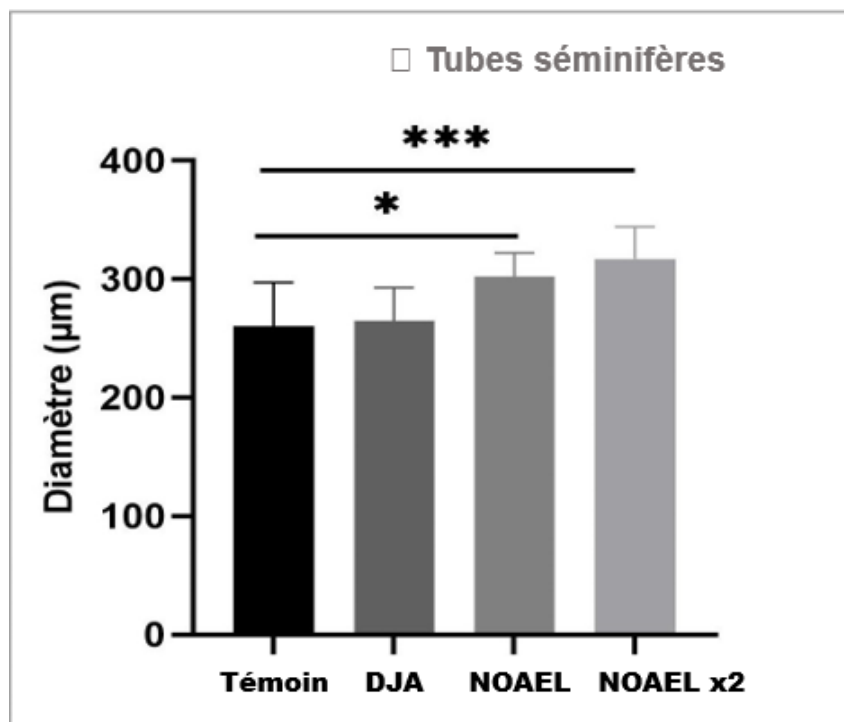
### 2.2. Histomorphométrie du testicule et de l'épididyme

Afin de vérifier les observations histologiques, nous avons procédé à la mesure de certains paramètres histologiques

#### 2.2.1. Données histomorphométriques du testicule

##### 2.2.1.1. Diamètre des tubes séminifères

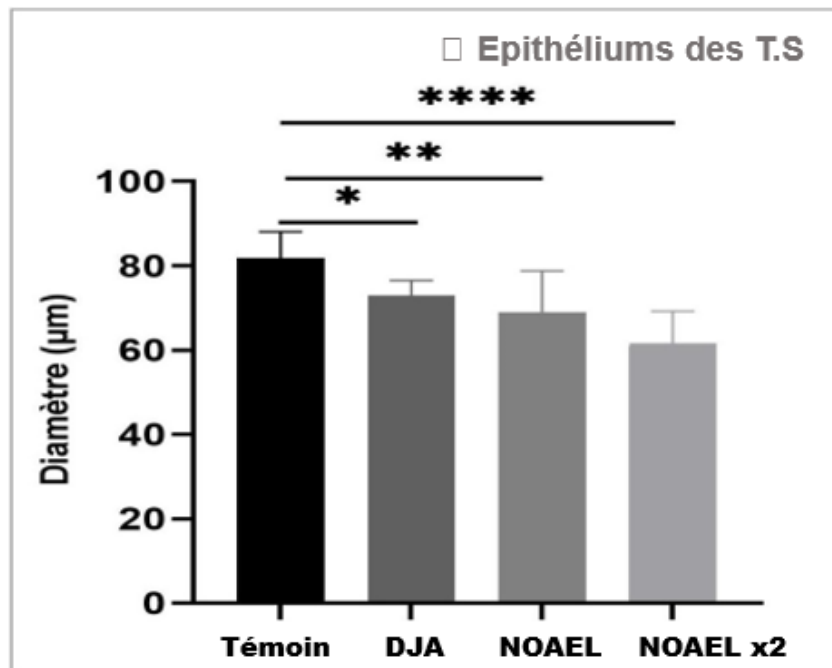
L'examen des valeurs moyennes du diamètre des tubes séminifères (TS) des rats adultes a révélé une augmentation de ce paramètre proportionnelle à la dose de thiaméthoxame administrée (Figure 27). En effet, le diamètre moyen des TS est de  $259,7 \pm 37,45 \mu\text{m}$  chez les animaux n'ayant pas reçu de TMX, il ne change pas ( $264,8 \pm 27,95 \mu\text{m}$ ) chez les rats traités du lot DIA, il augmente significativement ( $P \leq 0.05$ ) et très significativement ( $P \leq 0.01$ ) pour passer à  $302,2 \pm 20,09 \mu\text{m}$  et à  $317,1 \pm 27,19 \mu\text{m}$ , respectivement chez les rats du lot NOAEL et ceux du lot NOAEL x2.



**Figure 27** : Présentation graphique du diamètre des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux rats témoins.

##### 2.2.1.2. Epaisseur de l'épithélium des Tubes séminifères

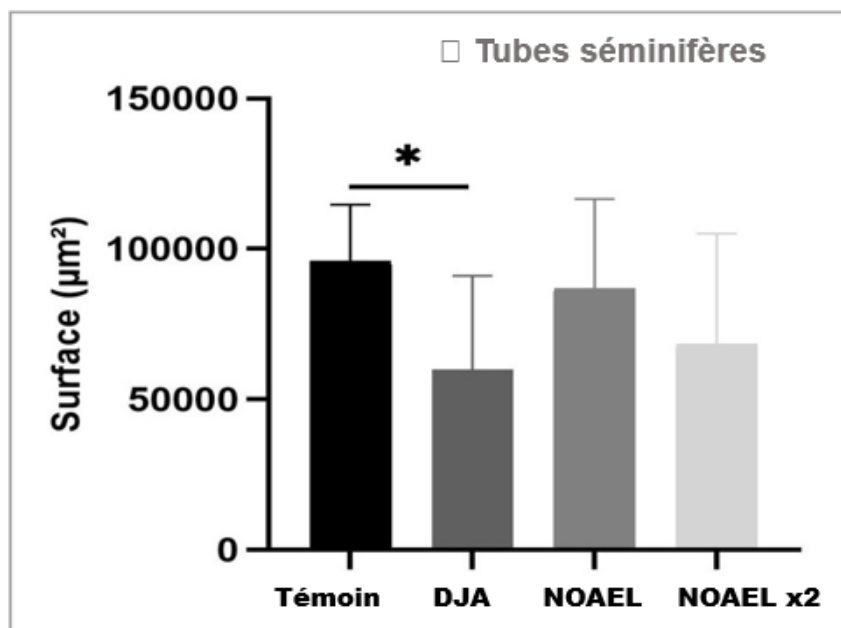
Les résultats relatifs à l'épaisseur de l'épithélium, illustrés sur la figure 28, montrent une légère diminution significative de ce paramètre chez les rats traités du lot DJA ( $73,01 \pm 3,553 \mu\text{m}$  ;  $P \leq 0.05$ ), du lot NOAEL ( $69,00 \pm 9,822 \mu\text{m}$  ;  $P \leq 0.05$ ) et ceux du lot NOAELx2 ( $61,50 \pm 7,789 \mu\text{m}$  ;  $P \leq 0.01$ ) par rapport aux valeurs des rats témoins ( $81,79 \pm 6,340 \mu\text{m}$ ).



**Figure 28** : Présentation graphique de l'épaisseur de l'épithélium des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux témoins.

### 2.2.1.3. Surface des tubes séminifères

La surface moyenne des tubes séminifères est de  $96074 \pm 18602 \mu\text{m}^2$  chez les rats du lot témoin. Comparativement à cette valeur, celle des rats du lot DJA ( $59922 \pm 31123 \mu\text{m}^2$ ) baisse significativement ( $P \leq 0.01$ ) (Figure 30). Aucune différence significative n'est relevée pour les rats du lot NOAEL ( $87027 \pm 29527 \mu\text{m}^2$ ), et de même pour les rats du lot NOAEL x 2 ( $68515 \pm 36569 \mu\text{m}^2$ ) (Figure 29).

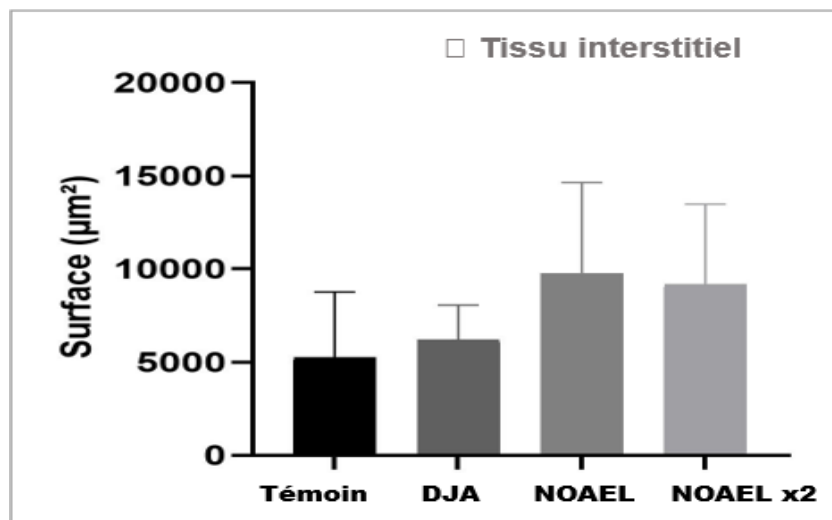


**Figure 29** : Présentation graphique de la surface moyenne des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux témoins.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

### 2.2.1.4. Surface du tissu interstitiel

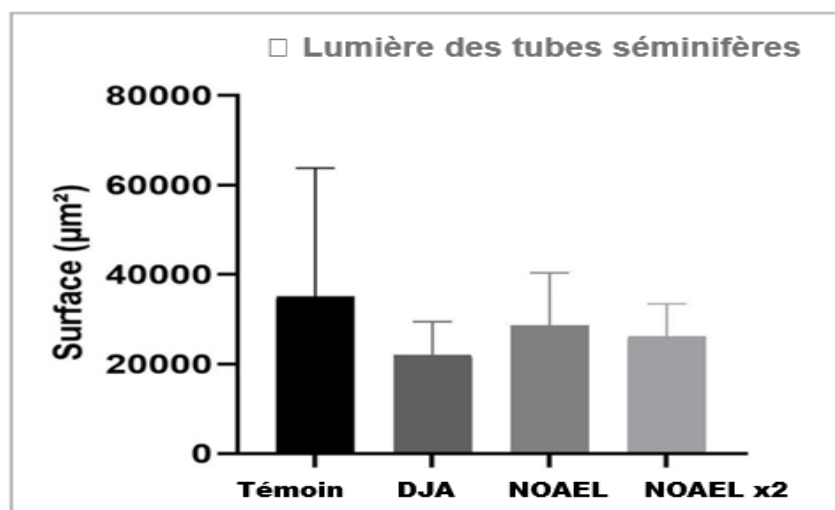
La valeur moyenne de la surface du tissu interstitiel (TI) situé entre les tubes séminifères chez les rats traités est plus élevée par rapport à celle des rats témoins (Figure 30). En effet, la valeur moyenne de la surface de TI est de  $5255 \pm 3508 \mu\text{m}^2$  chez les témoins, alors qu'elle est de  $6204 \pm 1860 \mu\text{m}^2$  chez les rats du lot DJA, de  $9781 \pm 4872 \mu\text{m}^2$  chez NOAEL et de  $9203 \pm 4287 \mu\text{m}^2$  chez ceux du lot NOAEL x 2. Cependant, aucune augmentation n'est significative.



**Figure 30** : Présentation graphique de la surface de tissu interstitiel chez les rats traité au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement au témoin.

### 2.2.1.5. Surface de la lumière des tubes séminifères

Les valeurs moyennes de la surface de la lumière des tubes séminifères montrent une diminution non significative chez les rats traités par rapport au lot témoin (Figure 31). En effet, la surface moyenne est de  $35121 \pm 28702 \mu\text{m}^2$  chez les témoins,  $22033 \pm 7491$  chez les traités DJA,  $28724 \pm 11660$  chez les rats NOAEL et de  $26170 \pm 7335$  chez les rats du lot NOAELx2.

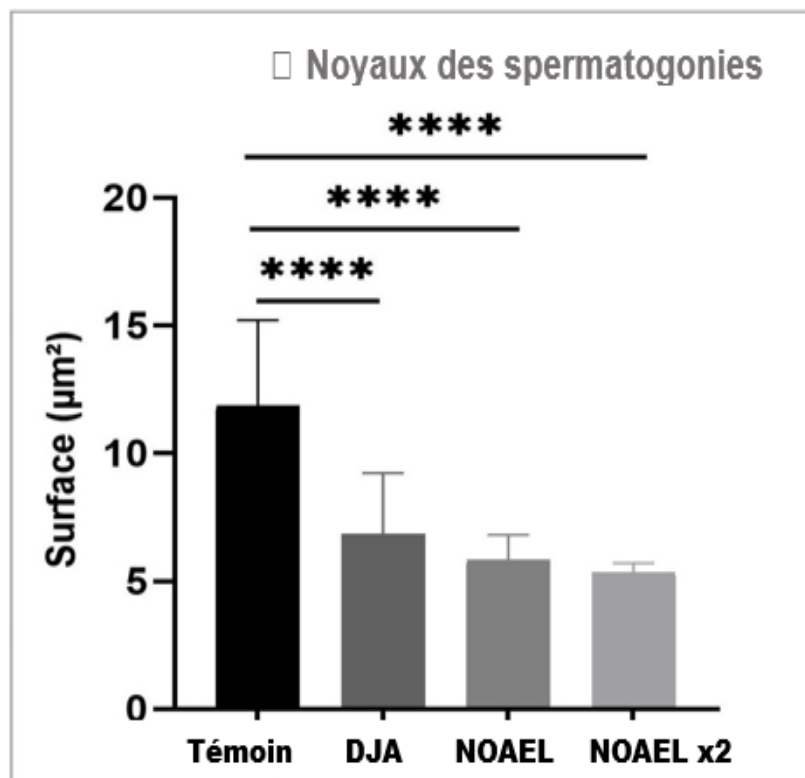


**Figure 31**: Présentation graphique de la lumière des tubes séminifères des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL et NOAEL x 2) comparativement aux témoins.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

### 2.2.1.6. Surface des noyaux des spermatogonies

L'examen des valeurs moyennes de la surface des noyaux des spermatogonies montre une diminution en fonction de la dose de TMX administré (Figure 32). Ainsi, les noyaux des spermatogonies des rats témoins ont une surface moyenne de  $11,87 \pm 3,349 \mu\text{m}^2$  qui régresse progressivement pour passer à  $6,850 \pm 2,378 \mu\text{m}^2$  chez le lot DJA, à  $5,825 \pm 0,9874 \mu\text{m}^2$  chez NOAEL et enfin à  $5,359 \pm 0,3491 \mu\text{m}^2$  chez NOAELx2. Comparativement aux témoins, les baisses relevées chez les différents lots traités au TMX sont hautement significative ( $P \leq 0.001$  ; Figure 32).

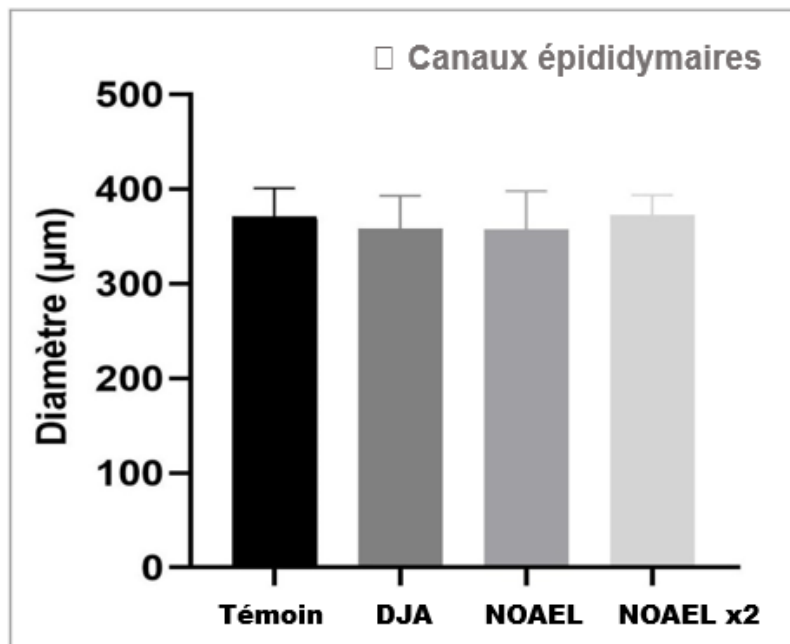


**Figure 32** : Présentation graphique de la surface moyenne des noyaux des spermatogonies des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins.

### 2.2.2. Données histomorphométriques de l'épididyme

#### 2.2.2.1. Diamètre des canaux épидидymaires

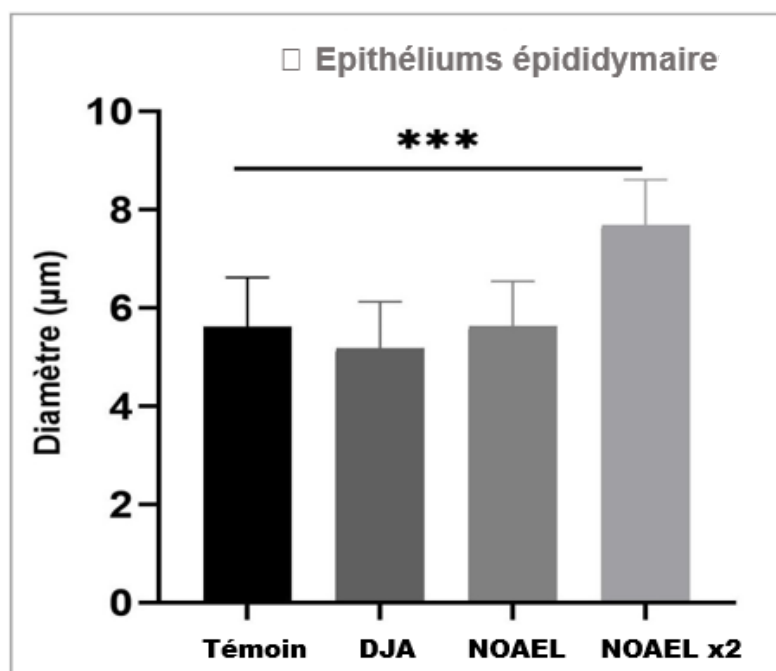
L'analyse du diamètre des canaux épидидymaires (CE) ne révèle pas de différences significatives entre les rats témoins et ceux traités par le TMX (Figure 33). Ainsi, le diamètre des CE est de  $371,4 \pm 29,68 \mu\text{m}$  chez les rats témoins, de  $358,4 \pm 34,69 \mu\text{m}$  chez les rats DJA, de  $357,4 \pm 40,43 \mu\text{m}$  chez les NOAEL, et enfin de  $372,4 \pm 21,54 \mu\text{m}$  chez les rats NOAELx2.



**Figure 33** : Présentation graphique de diamètre des canaux épидидymaire des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins.

### 2.2.2.2. Diamètre de l'épithélium épидидymaire

La valeur moyenne de l'épaisseur de l'épithélium épидидymaire du lot DJA ( $5,182 \pm 0,9437 \mu\text{m}$ ) et celle du lot NOAEL ( $5,631 \pm 0,9072 \mu\text{m}$ ) ne présentent pas de différences significatives comparativement à la valeur relevée chez les témoins ( $5,613 \pm 1,005 \mu\text{m}$ ). Cependant, l'épaisseur épithéliale de l'épididyme des rats du lot NOAELx2, dont la valeur est de  $7,692 \pm 0,9169 \mu\text{m}$ , est largement supérieure ( $P \leq 0.01$ ) à celle des témoins 2 (Figure 34).

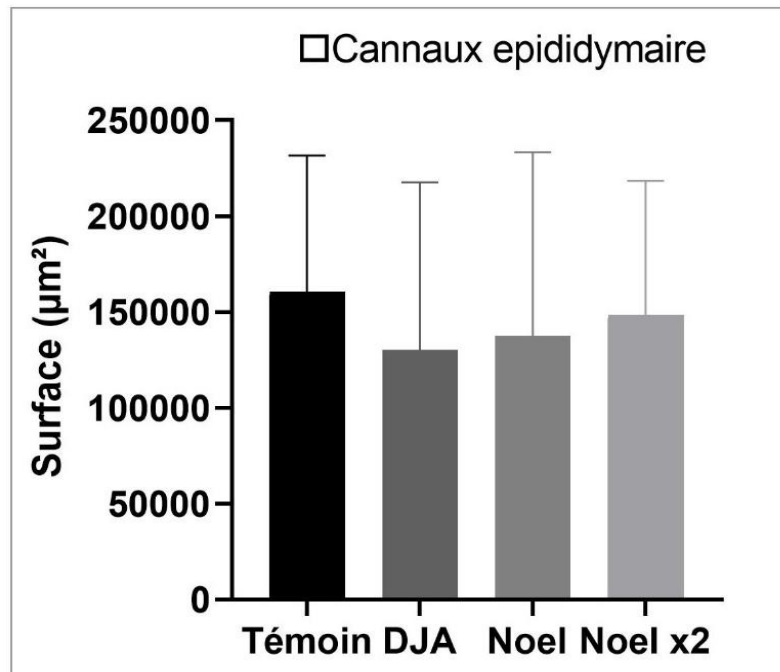


**Figure 34** : Présentation graphique de diamètre de l'épithélium épидидymaire des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

### 2.2.2.3. Surface des canaux épидидymaire

Les canaux épидидymaires ont une surface de  $160520 \pm 71219 \mu\text{m}^2$  pour les rats témoins,  $130200 \pm 95944 \mu\text{m}^2$  pour les rats traités du lot DJA,  $137398 \pm 95944 \mu\text{m}^2$  pour ceux du lot NOAEL, et  $148480 \pm 69971 \mu\text{m}^2$  pour ceux du lot NOAEL x2 (Figure 35). Aucune différence de ce paramètre n'a été relevé entre les rats témoins et les rats traités au TMX (Figure 35).



**Figure 35** : Présentation graphique de la surface des canaux épидидymaires des rats traités au thiaméthoxame (DJA, NOAEL, NOELx2) comparativement aux témoins.

## 2.3. Impact du thiaméthoxame sur l'expression et la distribution des dystrophines au niveau le testicule et de l'épididyme

A première vue, les dystrophines sont bien présentes dans les structures histologiques du testicule et de l'épididyme.

### 2.3.1. Au niveau du testicule

#### 2.3.1.1. Localisation des dystrophines dans les structures histologiques du testicule

L'examen de la distribution des Dps au niveau du testicule des rats témoins a révélé la présence de ces protéines au niveau des cellules de Leydig, situé dans les espaces interstitiels du testicule ainsi que les vaisseaux montrent une coloration positive pour les dystrophines.

Par ailleurs, une forte expression des dystrophines est également constatée au niveau de la membrane plasmique des cellules de Sertoli aussi à la lame basale des tubes séminifères.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

L'immunomarquage intensif détecté confirme une expression significative de ces protéines au sein de cette paroi tubulaire.

Une constatation assez importante réside dans la présence des dystrophines au sein des cellules germinales en développement. Une coloration marquée, particulièrement exprimé au niveau des cellules des spermatogonies ainsi que de la tête et du flagelle des spermatozoïdes montrent une expression élevée de la dystrophine.

D'autre part, on constate que les Dps sont distribuées d'une façon discontinue dans l'ensemble des structures du testicule.

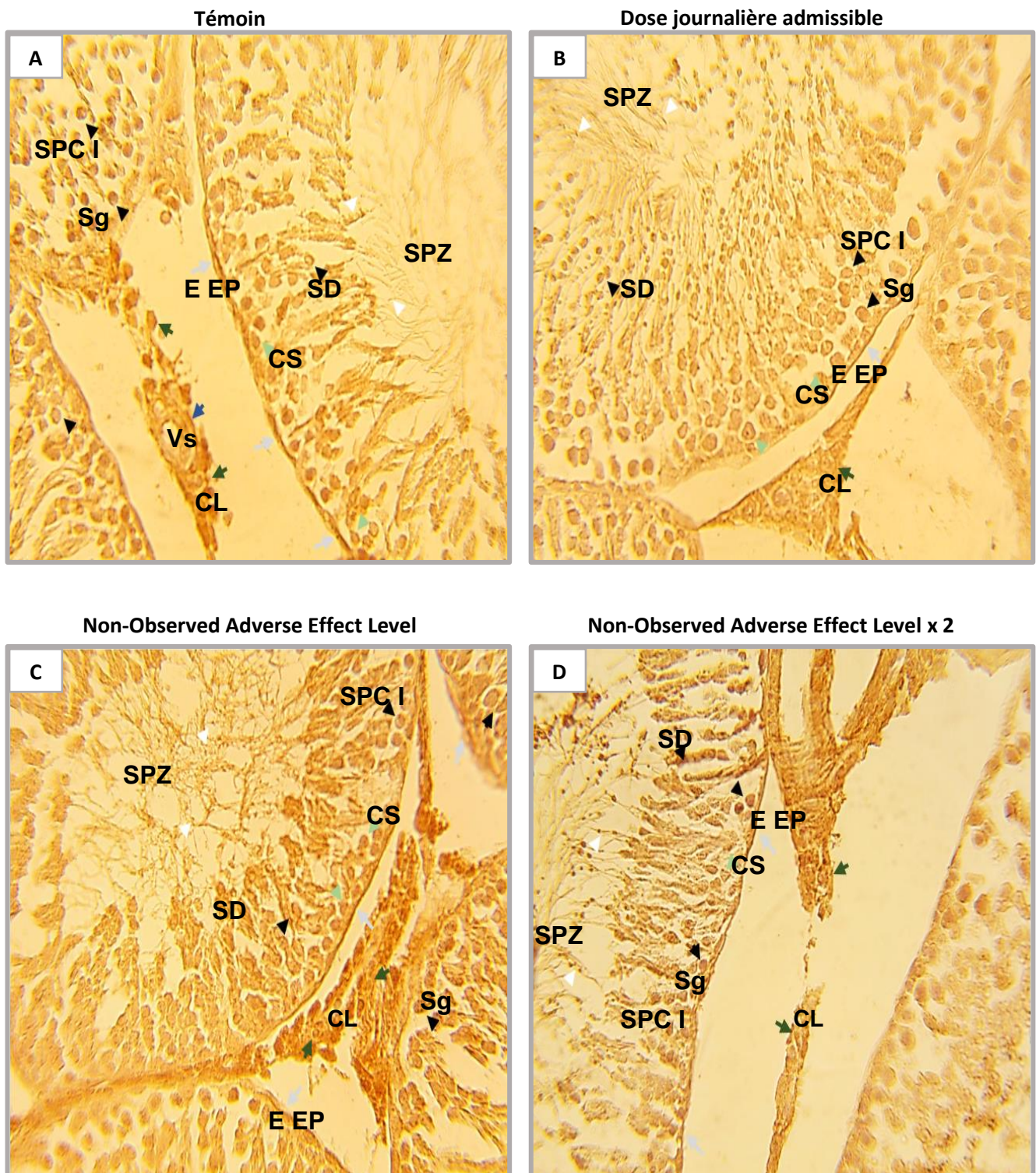
### **2.3.1.2. Impact du thiaméthoxame sur l'expression et la distribution des dystrophines au niveau des structures testiculaires**

Les observations effectuées sur des coupes des rats traités avec différentes doses de TMX ne montrent pas de changement sensible de l'expression des Dps chez les rats ayant reçu la dose DJA comparativement aux rats témoins (Figure 36B et Tableau 5).

En revanche, à la dose NOAEL, nous avons relevé une baisse de l'intensité du marquage immunohistochimiques des Dps dans les membranes plasmiques des cellules de Leydig, des vaisseaux sanguins et des cellules de Sertoli et parallèlement, une expression des Dps semblable à celle des témoins au niveau des spermatogonies, des cellules de la lignée germinale et des spermatozoïdes, en particulier la tête et le flagelle (Figure 36C et Tableau 5).

Par contre, pour le lot NOAEL x 2, la baisse d'immunomarquage aux Dp s'accroît au niveau des cellules de Leydig et des vaisseaux par rapport à ce que nous avons observé et relevé chez les animaux qui ont reçu la dose NOAEL (Figure 36 A, C, D et Tableau 5).

De plus, une importante déplétion des Dp apparaît dans les cellules germinales chez les rats du lot Noael x 2, ce qui n'est pas le cas dans les spermatozoïdes notamment au niveau de la tête et de la queue (Figure 36D et Tableau 5).



**Figure 36 :** Coupes histologiques montrent l'expression et la localisation des dystrophines dans les structures du testicule des rats témoins (A) et des rats traités au thiaméthoxame, DJA (B), Noael (C), Noael x 2 (D).

Grossissement x400. Les flèches colorées représentent les différentes régions où les dystrophines sont localisées ; cellules de Leydig (CL), cellules de sertoli (CS), vaisseaux sanguins, vaisseaux sanguins (Vs), Épithélium épидидymaire (E EP), spermatogonie (Sg), spermatocyte I (SPC I), spermatide (SD), spermatozoïdes (SPZ).

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

**Tableau 5** : Teneur approximative d'expression des dystrophines dans les structures histologiques du testicule chez le rat témoin et ceux traités (DJA, NOAEL et NOAEL x 2).

Structures	Lots	Témoin	DJA	NOAEL	NOAEL x2
Cellules de Leydig		+++	+++	++	+
Les vaisseaux sanguins		+++	+++	++	+
Cellules de sertoli		+++	+++	++	++
Les spermatogonies		+++	+++	+++	++
Les cellules de la ligné germinale		+++	+++	+++	+
Les spermatozoïdes		+++	+++	+++	+++

Absence (-), Faible expression (+), Expression modérée (++) , Forte expression (+++).

### 2.3.2. Au niveau de l'épididyme

#### 2.3.1.1. Localisation des dystrophines dans les structures histologiques de l'épididyme

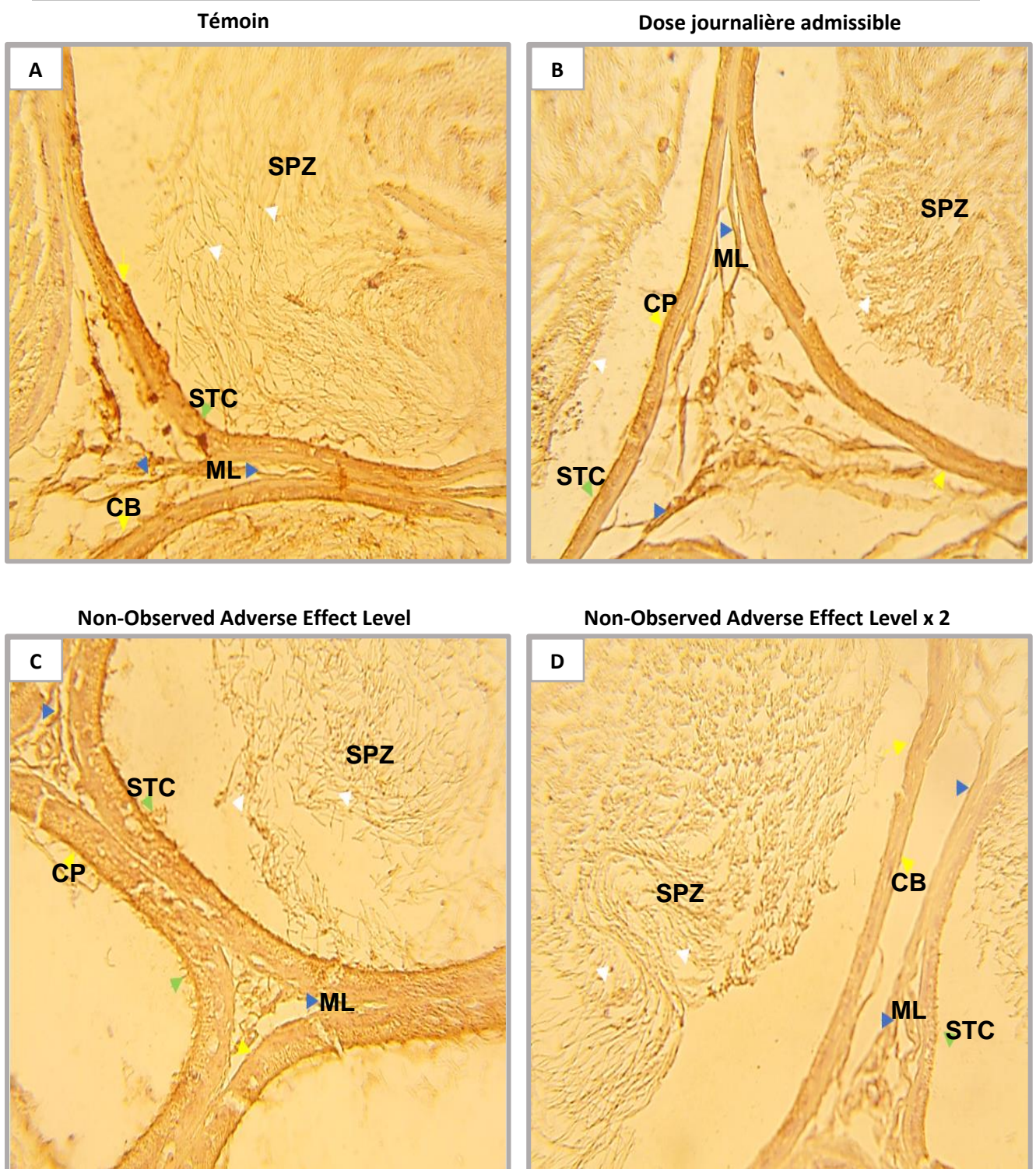
L'examen de la distribution des dystrophines dans les structures de l'épididyme des rats témoins a révélé la présence de ces protéines au niveau de la coiffe épидидymaire et ce aussi bien du côté apical que du côté basal (Figure 37A, Tableau 6). L'intensité de l'immunomarquage aux Dp apparaît aussi important au niveau du muscle lisse des animaux non traités (Figure 37A, Tableau 6). Les Dps sont également retrouvées dans les spermatozoïdes mais à un degré légèrement faible comparativement aux structures précédemment décrites (Figure 37A, Tableau 6). A l'inverse, chez les animaux du même lot, les Dp sont faiblement présentes dans les stéréocils (Figure 37A, Tableau 6).

En outre, les observations effectuées ont révélé l'aspect continu de la distribution des Dps sur pratiquement toutes les structures de l'épididyme ou elles sont exprimées (Figure 37A).

#### 2.3.1.2. Impact du thiaméthoxame sur l'expression et la distribution des dystrophines au niveau des structures épидидymaires

Les observations que nous avons effectuées sur l'épididyme des rats traités au TMX, ne révèlent aucune modification ni de la distribution ni de l'intensité de l'immunomarquage chez les rats ayant reçu la dose DJA, alors qu'à partir de la dose NOAEL, une réduction de l'expression des Dps à plusieurs endroits est constaté, c'est le cas dans la coiffe épидидymaire, le coté basal de l'épithélium épидидymaire, les stéréocils, les spermatozoïdes et le muscle lisse ; en revanche, du côté apical de l'épithélium épидидymaire l'intensité des dystrophines ne semble pas pâlir sous l'effet du TMX et toutes les doses testées (Figure 37A, C, D et Tableau 6)

## Chapitre 2 : Etude expérimentale



**Figure 37 :** Coupes histologiques montrent l'expression et la localisation des dystrophines dans les structures de l'épididyme des rats témoins (A) et des rats traités au thiaméthoxame ; DJA (B), Noael (C), Noael x 2 (D).

Grossissement x400. Les flèches colorées représentent les différents régions où les dystrophines sont exprimées : les muscles lisses (ML), les spermatozoïdes (SPZ), cellule basale (CB), cellule principale (CP), stéréocil (STC).

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

**Tableau 6 :** Teneur approximative d'expression des dystrophines dans les structures histologiques du testicule et de l'épididyme chez le rat témoin et ceux traités (DJA, NOAEL et NOAEL x 2).

Structures	Lots	Témoin	DJA	NOAEL	NOAEL x2
Coiffe épидидymaire		+++	+++	++	++
Épithélium épидидymaire	Apical	+++	+++	+++	+++
	Basal	+++	+++	++	++
Les stéréocils		+	+	++	++
Les spermatozoïdes		++	++	+	+
Les muscles lisses		+++	+++	++	++

Absence (-), Faible expression (+), Expression modérée (++) , Forte expression (+++).

### 3. Discussion

Cette étude examine les effets d'une exposition sub-chronique au thiaméthoxame (TMX) sur la fonction de reproduction chez les rats mâles de souche Wistar. Pour ce faire, nous avons analysé les aspects histologiques, ainsi que l'expression et la distribution des dystrophines dans les organes reproducteurs : l'épididyme et le testicule.

Il est bien connu que la fonction de reproduction chez les humains et les animaux est très vulnérable aux produits chimiques exogènes, qui peuvent causer des dommages et des perturbations au niveau des structures histologiques et par conséquent sur les fonctions physiologiques des différents organes de l'appareil reproducteur menant souvent à l'infertilité.

Au cours des dernières décennies, les néonicotinoïdes ont émergé en tant que nouvelles classes d'insecticides et sont rapidement devenus la famille de pesticides la plus utilisée (Tomizawa et Casida, 2003). La popularité des néonicotinoïdes a conduit à leur domination en tant que la classe d'insecticides la plus vendue à l'échelle mondiale (Elbert et al., 2008 ; Jeschket et al., 2011). Malheureusement, plusieurs études menées sur des rats ont signalé des effets néfastes de ces produits chimiques sur la santé humaine (Kimura-Kuroda et al., 2012).

#### 3.1. Effet du Thiaméthoxame sur l'histophysiologie du testicule

Chez les rats traités au thiaméthoxame à différentes doses (DJA, NOAEL et NOAELx2), l'observation de l'aspect histologique de l'épithélium séminifère révèle la présence de différentes cellules germinales à différents stades de maturation et la présence de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères, témoignant d'un déroulement non altéré au point de perturber d'une façon drastique le processus de la spermatogenèse. Cependant, des changements histologiques observables au microscope photonique et vérifiés par des analyses

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

morphométriques indiquent des perturbations morpho-physiologiques, notamment chez les rats ayant reçu la dose NOAEL x2 et à un moindre degré chez les rats NOAEL.

En effet, chez les rats exposés aux doses NOAEL et NOAELx2 de TMX, la quantité des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères, ainsi que la surface des spermatogonies ont baissé, et le diamètre des tubes séminifères a augmenté. Ces changements indiquent une perturbation de l'homéostasie de l'épithélium séminifère entraînant des troubles fonctionnels dans le processus de spermatogenèse, autrement dit des phases de différenciation et de transformation des cellules germinales.

Une étude similaire précédente a été menée sur des rats mâles adultes de souche Wistar exposés au thiaméthoxame pendant une période de 7 jours a rapporté des effets néfastes. Ils comprenaient des signes tels qu'un œdème interstitiel, une nécrose coagulative, une raréfaction des protéines et de l'épithélium germinatif, ainsi qu'une absence de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères (**El Okle et al.,2016**). Ces observations démontrent que cet insecticide peut altérer la structure morphologique du tissu testiculaire.

Par ailleurs, l'étude réalisé sur des souris mâles *albinos suisses* qui vise à évaluer l'effet du thiaméthoxame sur l'état physiologique et histologique du système reproducteur a révélé que l'exposition à ces insecticides entraîne une diminution significative de la viabilité et de la motilité des spermatozoïdes, ainsi qu'une détérioration de la spermatogenèse et de la fertilité masculine (**Hasan et al., 2017**).

L'effet néfaste sur les spermatozoïdes a été également rapportée par l'étude de **Abouelghar et al. (2020)**, qui ont démontré une importante perturbation de la spermatogénèse, se traduisant par une absence de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères chez les souris males soumises à une toxicité subaiguë (de 6-30 mg/kg de poids corporel par gavage pendant une période de 28 jours) de thiaméthoxame.

En ce qui concerne l'apparition des vacuoles ainsi que la dilatation des vaisseaux sanguins observée dans l'espace inter-tubulaire au niveau du tissu testiculaire dans les deux lots NOAEL et NOAEL x2, cela a également été décrit par une autre étude récente menée sur des lapins *chinchilla* adultes mâles exposés à court terme au TMX des effets reprotoxiques, ont révélé la présence des vacuolisations intratubulaires, une dilatation sévère, une congestion des artérioles inter tubulaires (**Hussain et al.,2022**).

Ces observations suggèrent que l'exposition au TMX peut altérer l'organisation histologique du testicule et perturber la fonction de reproduction chez les rats. Cela soulève des préoccupations quant aux effets potentiels du thiaméthoxame sur la fertilité et la santé reproductive.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

### 3.2. Effets du Thiaméthoxame sur l'histophysiologie de l'épididyme

Chez le rat, Le thiaméthoxame semble affecter les aspects structuraux de l'épididyme et parmi les changements repérés, nous comptons une diminution de la surface des canaux épидидymaire en particulier chez les rats du lot DJA, une hyperplasie régénératrice de l'épithélium des rats du lot NOAELx2, ainsi qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière des canaux épидидymaire des rats des lot NOAEL et davantage chez NOAELx2.

De plus, l'exposition au thiaméthoxame provoque une diminution de la densité des spermatozoïdes au niveau de la lumière épидидymaire et la vacuolisation de quelques cellules épithéliales (El Okle et al.,2016).

Selon Bal et al. (2012), l'exposition des rats males pendant une durée de trois mois à des doses de 5 à 10 mg/kg de poids corporel d'un néonicotinoïde de la même génération que le thiaméthoxame, en l'occurrence le clothianidine, semble affecter négativement la quantité et la forme des spermatozoïdes contenus dans la lumière testiculaire et épидидymaire, ainsi que la concentration de testostérone, hormone essentielle pour le développement et le fonctionnement normal des organes reproducteurs masculins.

Une étude récente a révélé que le thiaméthoxame a un impact négatif sur les paramètres des spermatozoïdes épидидymaires. Cette exposition induit l'apparition des malformations chez les spermatozoïdes, ainsi qu'une diminution de leur nombre dans le testicule et l'épididyme en raison d'une altération du fonctionnement normal de plusieurs organites cytoplasmiques présents dans les deux structures étudiées (Abd-Allah et al.,2022).

L'hyperplasie de l'épithélium épидидymaire apparu chez les rats traités au TMX témoigne également d'une anomalie morfo-fonctionnelle de ce canal. Selon Porth (2011), l'hyperplasie peut survenir en réponse, notamment à une inflammation chronique ou à une accumulation de liquide physiologique. Ces réponses peuvent être considérées comme des mécanismes compensatoires de l'organisme pour faire face aux dommages ou perturbations causés par l'exposition au thiaméthoxame. Autrement dit, l'hyperplasie peut être considérée comme une réponse de défense de l'organisme aux effets délétères de cette substance chimique.

### 3.3. Effets du Thiaméthoxame sur l'expression et la distribution des dystrophines dans le testicule et l'épididyme

Pour évaluer l'effet du thiaméthoxame sur l'expression et la distribution des dystrophines dans les deux organes de l'appareil reproducteur, l'épididyme et le testicule, nous avons utilisé un anticorps polyclonal qui reconnaît la dystrophine de 427 kDa et les isoformes de petite taille.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

### 3.3.1. Au niveau du testicule

Chez les rats mâles adultes (témoins), les dystrophines (Dp) sont retrouvées dans différents compartiments du testicule sous forme d'un marquage plus ou moins dense, principalement localisées au niveau des membranes des cellules de Leydig qui sont responsables de la synthèse et de la sécrétion des hormones androgène vitale pour le développement et la fonction des organes reproducteurs masculins (**O'Shaughnessy et al., 2006**). Ces observations laissent déduire que les Dp pourraient être impliquées dans la régulation des mécanismes membranaires de sécrétion de la testostérone et mettre en évidence un lien potentiel entre les dystrophines et la fonction endocrinienne du testicule.

Quant à la présence des Dp dans les vaisseaux sanguins au niveau du tissu interstitiel, elle est déjà décrite antérieurement, notamment dans les capillaires des structures nerveuses, comme l'hypothalamus (**Benabdesselam et al., 2010 ; Benabdesselam et al., 2019**), la neurohypophyse (**Benabdesselam et al., 2010**) et la rétine (**El Mattari, 2014 et Vacca, 2014**). Au niveau de ces organes, les Dps sont retrouvées aussi bien dans la membrane des cellules endothéliales que dans les expansions gliales entourant les capillaires où elles semblent jouer un rôle important dans la régulation homéostatique du microenvironnement vasculaire ou capillaire. En effet, dans le tissu interstitiel du testicule, les Dp pourraient participer à la régulation de la fonction vasculaire, notamment en contribuant à la stabilité de la membrane cellulaire et à la signalisation intracellulaire.

En outre, la détection des Dps au niveau de la membrane plasmique des cellules de Sertoli qui jouent un rôle dans la spermatogenèse en permettant la progression des cellules germinales en spermatozoïdes, leur base forme une barrière sélective entre le sérum et les cellules germinales évoluées, leur corps constitue un échafaudage qui maintient en place les clones des cellules germinales en voie de différenciation (**Josso et Rey, 1995 ; Ravel et Jaillard, 2011**), cette localisation suggère un rôle essentiel pour les Dp dans le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle dans ces cellules. De plus, la présence des Dps dans la lame basale des tubes séminifères indiquent leur probable contribution à la formation de la barrière hémato-testiculaire, qui régule les échanges moléculaires avec les jonctions étanches entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales.

Les cellules germinales subissent des étapes de différenciation et de maturation pour former des spermatides. La localisation de la dystrophine dans ces cellules en développement suggère leur rôle potentiel dans la morphogenèse et la fonctionnalité des spermatozoïdes, bien que les mécanismes exacts de leur intervention restent à clarifier avec d'autres études.

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

La discontinuité des Dps dans les membranes des cellules du testicule suggèrent la concentration de ses protéines liées à leurs protéines associées (**Benabdesselam et al, 2012**) dans certains espaces fonctionnels, comme les microdomaines.

Certaines doses de TXM, semblent avoir un impact plus sur le taux que sur la distribution des Dp. En effet, dans le groupe NOAEL, la baisse des Dp dans les parois vasculaires pourrait impacter négativement la vascularisation, la perfusion sanguine et par conséquent, réduire les apports en nutriments essentiels au niveau du testicule. Aussi, la diminution des Dps dans les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli chez les rats NOAEL et d'avantage chez les rats NOAEL x 2 pourrait perturber aussi bien la régulation endocrinienne, ainsi que la progression et le développement des cellules germinales, compromettant la fonction globale des testicules en perturbant la production des spermatozoïdes repérée sous l'examen histologique

### 3.3.2. Au niveau de l'épididyme

Les dystrophines (Dp) sont retrouvées dans différentes régions de l'épididyme notamment la coiffe et l'épithélium épididymaires. La présence des Dp au niveau des deux membranes, apicale et basale, des cellules épithéliales épididymaires soulignent le rôle potentiel des Dps dans la fonction de barrière et de transport de l'épididyme, où elles pourraient participer à la régulation de l'équilibre ionique et du passage des molécules à travers l'épithélium épididymaire, contribuant ainsi à la formation d'un environnement favorable pour la maturation, le stockage et le transport des spermatozoïdes. Par ailleurs, les Dp dans les structures des stéréocils confèreraient à ces derniers les mouvements qui les caractérisent.

Tout comme dans le sarcolemme du muscle squelettique, les Dp dans les muscles lisses épididymaires pourraient être impliquées dans le maintien de la stabilité des membranes lors de la contraction et relâchement des cellules contractiles, contribuant ainsi indirectement aux mouvements nécessaires au transport des spermatozoïdes à travers l'épididyme.

En revanche, l'exposition des rats aux doses relativement élevées de TMX (NOAEL et NOAEL x2) semble avoir un impact négatif sur le taux des dystrophines et aucune influence sur la distribution de ces protéines. En effet, la baisse des Dps au niveau des structures de la coiffe épididymaire, le muscle lisse, les stéréocils et les spermatozoïdes pourrait entraîner des altérations dans la maturation des spermatozoïdes. Selon **Cerqueira Campos et al. (2020)** les Dp, notamment celles qui se manifestent dans les cellules de Sertoli, jouent un rôle important dans la reproduction masculine, tout particulièrement dans la spermatogénèse. Selon les mêmes auteurs, des mutations de la dystrophine peuvent entraîner une altération de la spermatogénèse, une diminution de la production des spermatozoïdes et une infertilité masculine. Des études ont

## Chapitre 2 : Etude expérimentale

---

rapporté chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une maladie génétique causée par une mutation de la dystrophine, et chez les souris modèles de cette pathologie une diminution de la quantité et la qualité du sperme (**Vaughan et al., 2020**).

Il est important de souligner que les Dps dans les structures de l'appareil reproducteur n'ont pas fait objets d'explorations et encore moins l'impact des pesticides sur les Dps dans le même système.

En approfondissant la recherche sur l'impact du thiaméthoxame sur les dystrophines dans les structures reproductrices masculines, nous pourrions mieux évaluer les conséquences de cette exposition sur la santé et le fonctionnement des organes reproducteurs. Ces expériences fourniront des informations cruciales pour évaluer les risques éventuels pour la fertilité masculine de ce type d'exposition et contribueront à l'élaboration d'une réglementation visant à protéger la santé reproductive humaine et même animale.

## **Conclusion & Perspective**

## Conclusion

---

Dans cette étude, nous avons évalué l'impact d'une exposition sub-chronique au Thiaméthoxame sur les aspects histo-morphométriques et parallèlement sur l'expression et la distribution des dystrophines dans les structures du testicule et de l'épididyme de rats de souche "Wistar". Les résultats obtenus soulignent l'impact négatif de la dose NOAEL et d'avantage de la dose NOAEL x 2 sur les structures histologiques et l'expression des Dps des deux organes.

Les principales altérations morphologiques ou structurales se résument à une réduction du diamètre des tubes séminifères, de la densité cellulaire dans les différents compartiments testiculaires, ainsi qu'une baisse de l'épaisseur de l'épithélium épидидymaire. Par ailleurs, la teneur en spermatozoïdes est réduite aussi bien dans la lumière des tubes séminifères que dans celle du canal épидидymaire.

Concernant les dystrophines, nous les avons localisées dans les cellules de sertoli, les cellules de Leydig, les vaisseaux sanguins, les spermatogonies, les cellules germinales, ainsi que dans la coiffe épидидymaire, les muscles lisses, les stéréocils et l'épithélium épидидymaire.

L'expositions des Dps au thiaméthoxame a causé la diminution de leurs expressions dans la plupart des cellules et tout particulièrement des membranes des deux organes.

Nous pensons que les modifications structurales, confirmées par des analyses morphométriques pourraient résulter des altérations de l'expression des Dps sous l'effet du thiaméthoxame.

L'étude que nous avons réalisée est une initiation à la recherche, elle reste donc partielle. Ainsi, pour apporter plus d'informations et mieux évaluer l'effet du TMX sur la fonction de reproduction, des études avec un bon effectif de rats et plus approfondies doivent être envisagées, notamment l'examen de :

- L'effet du Thiaméthoxame sur la descendance, générations F1 et/ou F2,
- La toxicité chronique du Thiaméthoxame et plus à long terme,
- L'impact du TMX sur l'appareil reproducteur femelle,
- La motilité spermatique, la qualité du sperme, ainsi que des dosages hormonaux,
- La signalisation et ses mécanismes qui pourraient fournir des informations sur les voies moléculaires affectées par le TMX.

## **Références Bibliographique**

## Références Bibliographiques

---

### A

- Abd-Allahe.r., El-Ghareeb A., Hafez O.S. & Abd El-Rahman H.A. (2022).** Biochemical and histopathological evaluations of thiamethoxam on the male reproductive system. *Egypt. J. Chem.* Vol 65, N° 11. P : 677-689.
- Abouelghar GE., Yassien R.I., Abd-Elghany El-Bermawy Z., Ammar HA. et Abd-Elaziz Shalaby Y.(2020).** Sublethal Toxicity of Thiamethoxam Insecticide in Albino Mice: Biochemical, Oxidative Damage and Histopathological Evaluations. *Adv J Toxicol Curr Res.* Vol 4, N° 1. P : 17-28.
- Abraham L., et Kierszenbaum. (2002).** Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique. Edition de Boeck Supérieur 1<sup>er</sup> édition,Amerique. P :648.
- Adams D. (2017).** Insecticides and Pesticides: Techniques for Crop Protection. (Revue). *Larsen and Keller Education*). Australie P: 283.
- Adams, M. E.,Odom G.L., Kim.M.j.Chamberlain J.S. et Froehner S.C. (2018).**Syntrophin binds directly to multiple spectrin-like repeats in dystrophin and mediates binding of nNOS to repeats 16-17. *Human Molecular Genetics.* Vol 27, N°17. P: 2978–2985.
- Aebi A., Mulhauser B., Glauser G. & Mitchell E.A.D. (2017).** Miels et néonicotinoïdes, quelles implications pour les apiculteurs ? N°180, v 5. P : 28-30.
- Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire. (2007).** Rapport d'évaluation du thiaméthoxam - ERC2007-01. *Santé Canada.* CANADA. P: 105.
- Ahn A.H. and Kunkel L.M. (1993).** The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat. Genet.* Vol 3, N°4. P: 283-291.
- Amann RP. (2011).** Physiology and Endocrinology. In: Mc Kinnon AO, SQUIRES EL, VAALA WE, VARNER DD (eds). *Equine Reproduction* (2ed). United Kingdom. P : 881-908.
- Andoni Urtizbera J. (2009).** Zoom sur la recherche dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Association française contre la myopathie. (Revue). *Savoir et comprendre.* France. P : 39.
- Aouimeur T., Mallouk A. & Melazem L. (2022).** Etude des effets néfastes du pesticides néonicotinoïdes sur la santé humaine et l'environnement. (Mémoire). *Université Tébessa Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie Appliquée.* Algérie. P: 82.

### B

- Badran. H. H. et Hermo L. (2002).** Expression and regulation of aquaporins 1, 8 and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. *Journal of andrology.*Vol 23,N°3. P: 358-373.
- Bal R., Naziroğlu M., Türk G., Yilmaz Ö., Kuloğlu T. et Etem E., Baydas G. J. C. B. (2012).** Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell biochemistry and function.*Vol 30 ,N°6. P: 492-499.
- Baldi I., Cordier S., Coumoul X., Elbaz A, Gamet-Payraastre I., Le Bailly P., Multigner I., Rahmani R., Spinosi J. & Van Maele-Fabry G. (2013).** Pesticides : Effets sur la santé. (Rapport de recherche). *Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM).* Paris : inserm : Editions EDP Sciences. France. P : 1014.
- Barone R. (2001).** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4 : splanchnologie II. Edition Vigot frères 3<sup>ème</sup> édition,France. P : 952.
- Baunne F. (2009).** Apoptose du spermatozoïde et fertilité masculine. Thèse doctorat. Université d'aurvege. P : 175.
- Bedossa P. et Degos F. (2009).** Épidémiologie. Prévention. Dépistage et diagnostic du carcinome hépatocellulaire. *Bulletin du Cancer.*Vol 96, N°1. P :35-43.

## Références Bibliographiques

---

- Benabdesselam R., Dorbani-Mamine L., Benmessaoud M. & Rendon A. (2012).** Dp71 gene distribution of the dystrophin-associated protein complex and neuronal nitric oxide synthase expression in the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Journal of endocrinology*. Vol 213, N°3. P : 239-249.
- Benabdesselam R., Sene A., Raison D., Benmessaoud-Mesbah O., Ayad G., Mornet D., Yaffe D, Rendon A., Hardin-Pouzet H. et Dorbani-Mamine L. (2010).** A Deficit of Brain Dystrophin 71 Impairs Hypothalamic Osmostat. *Journal of Neuroscience Research*. Vol 88. P:324–334
- Benabdesselam R., Rendon A., Dorbani-Mamine L. & Hardin-Pozet H. (2019).** Effect of Dp71 deficiency on the oxytocin hypothalamic axis in osmoregulation function in mice. *Acta histochemica* . VOL 121, N°3. P : 268-276.
- Berkani A. & Bouzeghoul k. (2011).** L'effet des pesticides : cas de Thiaméthoxame (sur *Saccharomyces cerevisiae*). (Mémoire). *Université 8 mai 1945 Guelma faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers département d'écologie et génie de l'environnement*. Algérie. P : 80.
- Bhat H. F., Mir S.S., Dar K.B. et Bhat ZF. (2018).** ABC of multifaceted dystrophin glycoprotein complex (DGC). *Journal of Cellular Physiology*. Vol 233 N°7. P : 5142–5159.
- Blake D. J., Nawrotzki R., Loh. N.Y., Gorecki D.C. et Davies K.E. (1998).** beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 95, N°1. P: 241–246.
- Blake. D.J., WEIR A., NEWHEY S.E. et DAVIES K.E. (2002).** Function and genetics of dystrophin and dystrophin related proteins in muscle. *physiologie Review* vol 82 ;N° 2. P :291-329.
- Bodereau B. (2011).** Récepteurs nicotiques neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes. Université d'Angers. P : 124.
- Boekelheide K., Blumberg B., Chapin RE, Ila Cote, Graziano JH., Janesick A., Lane R., Lillycrop K., Myatt L., States CJ., A. Thayer K., Waalkes MP. & Rogers J M. (2012).** Predicting Later-Life Outcomes of Early-Life Exposures. *Environmental Health Perspectives*. USA. Vol 120, n°10 P : 1353- 1361.
- Bouazza S. et Meddah B. (2013).** Etude histologique des testicules du rat Wistar prépubère malnutri puis réalimenté. Mémoire de Master. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes, Algérie. P :60.
- Bourbia-Ait Hamlet s. (2013).** Évaluation de la toxicité de mixtures de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *Helix aspersa*. (Mémoire). *Université Badji Mokhtar – Annaba*. Algérie. P : 177.
- Barouki R. (2013).** Environnement Et Santé : Les Leçons Des Pesticides. *Med Sci (Paris)*. Vol :29, N°3. P : 235-236.
- Boussit D. (1989).** Reproduction et insémination artificielle en cuniculture. Edition Association française de cuniculture. Diffusion Lavoisier TEC & DOC. France. P : 17-34.
- Boutin V., Geray Y L. Krauss & Vilbert C. (2015).** Atlas de biologie BCPST 1re et 2 e années. (Livre). *Dunod*, Paris. P : 112.
- Bouziani M. (2021).** De l'usage intensif des pesticides, et leurs conséquences néfastes. *Journal web El Wantan*.
- Buckingham SD, Lapied B, Le-Corronc H, Grolleau F. et Sattelle DB. (1997).** Imidaclopride actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *The Journal of Experimental Biology*. Vol 200 N°21. P: 2685-2692.
- Byers TJ., Kunkel ML., & Watkinst SC. (1991).** The Subcellular Distribution of Dystrophin in Mouse Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle. *The Journal of Cell Biology*. USA. Vol 115, n°2. P: 411-421.

## Références Bibliographiques

---

### C

- Casida JE. (2010).** Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol 5, N°7. P: 2923-2931.
- Caleb G. (2009).** Etude de la toxicité sub-chronique d'argémone mexicaine utilisée dans le traitement traditionnel du paludisme. Thèse de doctorat. Université de Bamako faculté de médecine. Mali. P : 81.
- Cavalié G., Alexandre B., Marnas G. et Boisson B. (2017).** Anatomy and histology of the scrotal ligament in adults: inconsistency and variability of the gubernaculum testis. *Surgical and Radiologic Anatomy*. vol 40, N°4. P: 365–370.
- Cerqueira Campos F., Dennis C., Alégot H., Fritsch C., Isabella A., Pouchin P., Bardot O., Horne-Badovinac S. & Mirouse V. (2020).** Oriented basement membrane fibrils provide a memory for F-actin planar polarization via the Dystrophin-Dystroglycan complex during tissue elongation. *The Company of Biologists Ltd. Development* 147. France. P : 14.
- Chahbar-Adidou N., Hamadi K., Acheuk F & Doumandji S. (2018).** Toxicité subchronique du Thiaméthoxame insecticide utilisé en protection des végétaux sur deux espèces locales d'Apis mellifera L. (Revue). *Université Ferhat Abbas*. Sétif. Algérie. P: 31-45.
- Cooper T.G. (1998).** Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* vol 53. P: 119-136.

### D

- Da Silva N., Cortez-Retamozo V., Reinecker HC., Wildgruber M., Hill E., Brown D., Swirski FK., Pittet MJ. et Breton S. (2011).** A dense Network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction*. Vo 141, N°5. P : 653-663.
- Dadoune J P. et Demolin A. (1991).** Structure et fonction du testicule. *La production chez les mammifères et l'Homme*. P : 221-250.
- Dadoune J.P. (2006).** Biologie de la reproduction humaine. Elipses, France. P :157.
- Davody, A P, (2015).** Aspect embryologique et anatomique : localisation des portions de l'urètre. <https://urologie-davody.fr/stenose-uretrale/diagnostic-uretre/anatomie-de-luretre-masculi>.
- Dugardin F. Petit J. & Grise P. (2009).** Lexique Urologique. Ed John Libbey EUROTEXT, France. P: 92.

### E

- EL Okle O.S., Lebda M.A. & Thohamy H.G. (2016).** Thiamethoxam-Induced Biochemical, Hormonal and Histological Alterations in Rats. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. Vol 8, N°5. P : 320-325.
- Elbert A., Haas M., Springer B., Thielert W. & Nauen R. (2008).** « Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection ». *Pest Manag Sci*. vol. 64, n° 11. P: 1099-1105.
- El-Farouki A. (2015).** Place du spermogramme dans l'exploration de l'infertilité du couple à l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech. Thèse de doctorat en médecine. Université Kady Ayyad. Marrakech. P: 148.

### F

- Fawcett DW. (1975).** Le spermatozoïde mammifère. *Biologie du développement*. vol 44, N°2. P: 394-436.
- Fawcette D.D.W. et Burgos M.H. (1956).** Observation on the cutomophosis of the germinal and interstitial cells of the human testes. *Ciba foundation colloquium on Agein*. Vol 2. P: 86-99.

## Références Bibliographiques

---

**Feki A., Kammoun I., Kallel C., Hakim A. & Ben Amara I. (2022).** Étude de la toxicité induite par le thiaméthoxame sur les paramètres morphologiques, hématologiques et sur l'équilibre oxydant/antioxydant chez des rats de souche Wistar. *Environnement et Santé*. Tunisie. Vol.11, N° 02. P : 130-139.

**Fekil A., Kammoun I., Naifar M., Makni Ayadi F., Hakim A. & Ben Amara I. (2021).** Study of the biochemical profile in rats treated with increasing doses of thiamethoxam. *J.I. M. Sfax*. Tunisie. N°37. P :55 – 63.

### G

**Gao Q. Q. and McNally E. M. (2015).** The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Comprehensive Physiology*. Vol 5, N° 3. P: 1223–1239.

**Garaud J. C and Roussel G. (2004).** Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique. Livre P : 249.

**Genton C.Y. (2006).** L'immunohistochimie : Son principe, ses applications et ses limites. *Clinics in Mother and Child Health*. Suisse. Vol 3, N° 1. P: 477 – 481.

**Girouard J. (2009).** Rôle des domaines membranaires rafts dans le transfert et la compartimentation des protéines impliquées dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes bovins. Thèse de Doctorat en physiologie-endocrinologie. Département d'obstétrique et gynécologie faculté de médecine université laval. Québec. P: 218.

**Gordon Betts, Peter Desaix, Eddie Johnson, Jody E Johnson, Oksana Korol, Dean Kruse, Brandon Poe, James A. Wise, Mark Womble, Kelly A. Young. (2017).** Anatomy and Physiology. OpenStax - Université Rice 1<sup>er</sup> édition, France. P: 1381.

**Goulson D. (2013).** Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*. Vol 50, N° 4. P: 977-987.

### H

**Habotta Ola A., Ateya A., Saleh R M. et El-Ashry S.E. (2021).** Thiamethoxam-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and disturbance of steroidogenic genes in male rats: Palliative role of Saussurea lappa and Silybum marianum. *Environmental Toxicology*. Egypt. vol. 36, n° 10. P: 2051-2061.

**Hamamah S. (1997).** Spermatogenesis is a target for apoptosis: a comparative study in two species, rat Wistar and pig Meishan. *Human Reproduction*. Vol 12. P: 6.

**Hamilton D. (2010).** Thiamethoxam (245). *Primary Industries and Fisheries*. Australie. P : 1787- 2021.

**Hamon R., Thepot N. et Salaun G. (1999).** Biologie de la reproduction des mammifères d'élevage. Editions Educagri 2<sup>ème</sup> édition, France. P :123.

**Hasan S.L., Kadhim K.K., Karim A.J. & Khalaf J.M. (2017).** Histopathology of Male Swiss Albino Mice reproductive system due to Toxic effects of Thiamethoxam. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. Vol 5, N°3. P : 1201-1206.

**Hermo L., Adamali H. I. et Andonian S. (2000).** Immunolocalisation of CA II and H<sup>+</sup> V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *J Androl*. Vol 21, N°3. P : 376- 391.

**Hermo L. et Robaire B. (2002).** Epididymal cell types and their function. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. P: 81-102.

**Heusser S. & Dupuy H-G. (2015).** Atlas de biologie animale (Livre). *Dunod*, Paris. P : 228.

<https://www.elwatan.com/pages-hebdo/magazine/de-lusage-intensif-des-pesticides-et-leurs-consequences-nefastes-08-042021#:~:text=Les%20r%C3%A9sultats%20des%20diff%C3%A9rentes%20C3%A9tudes,la%20prostate%2C%20my%C3%A9lomes%2C%20infertilit%C3%A9s%20E2%80%A6>

## Références Bibliographiques

---

**Hussain S., Ayub F. & Talib M. (2022).** Thiamethoxam Induced Oxidative Stress and Histopathological Alterations in Male Patients. *International Journal of Current Science Research and Review*. Pakistan. vol. 05, n° 04. P: 1272-1279.

### I

**Ishikawa-Sakurai M., Yoshida M., Imamura M., Davies K.E. and Ozawa E. (2004).** ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to bêta - dystroglycan. *Human Molecular Genetics*, vol 13, N° 7. P: 693–702.

### J

**Jarrett H. W. et Foster J. L. (1995).** Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 270, N° 10. P :5578–5586.

**Jeschke P., Nauen R.,Schindler M. et Elbert A.(2011).**Overview of the status and Global strategy for Neonicotinoïds.*Journal and Agricultural and Food Chimestry*.Vol 59,N° 7. P : 2897-2908.

**Jeschke P., Nauenet R et Beck ME. (2013).** Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angewandte Chemie International Edition Reviews* vol. 52, n° 36. P: 9464-9485.

**Jones R., Hamilton D.W. et Fawcett D.W. (1979).** Morphology of the epithelium of the extra testicular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *American Journal of Anaomyt*. Vol 156, N°3. P: 373-400.

**Josso N. & Rey R. (1995).** La cellule de Sertoli, une cellule endocrine. *Médecine Science (Paris)*. France. vol. 11, n° 4. P : 537.

### K

**Kilani-Morakchi S., Aribi N. et Soltani N, (2009).** Activity of boric acid on German cockroaches: Analysis of residues and effects on reproduction. *African Journal of Biotechnology*. Vol 8, N°4. P: 703-708.

**Kimura-kuruda J., Komuta Y., Kuruda Y.,Hayashi M.et Kawano H.(2012).**Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoïds Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats .*P.Los*.Vol ,N°2. P : 324-632.

**Koenig M., Monaco A.P. and Kunkel L.M. (1988).** The complete sequence of dystrophin predicts a rodshaped cytoskeletal protein. *Cell*. Vol 53, N°2. P :219-228.

### L

**Labie D. (2007).** Neurotoxicité des produits industriels et développement cérébral. *Médecine /sciences*. Vol : 23, N°10. P : 868-872.

**Lafont C. & Tassart M. (2010).** Imagerie du tractus génital chez l'homme infertile. *Médecine de la Reproduction*. Vol 12, N°3. P :242-248.

**Le Daré B., Ferron PJ. Et Gicquel T. (2021).** Il était une fois l'hépatotoxicité. *Médecine /sciences*. Vol :37, N°3. P : 235-241.

**Leyva-Leyva M., Sandoval A., Felix R. et Gonzalez-Ram R. (2018).** Biochemical and Functional Interplay Between Ion Channels and the Components of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex. *The Journal of Membrane Biology*. Vol 251, N°4. P :535–550.

**Lilja H. and Laurell C B. (1985).** The predominant protein in human seminal coagulate. *Scand. J Clin LabInvest*.vol 45 N°7. P: 635-641.

## Références Bibliographiques

---

**Loh N. Y., Nebenius-Oost D. Blake D. J., Smith A.JH. & Davies K.E. (2001).** Role of beta-dystrobrevin in nonmuscle dystrophin-associated protein complex-like complexes in kidney and liver. *Molecular and Cellular Biology*. Vol 21, N°21. P : 7442–7448.

**Louchahi MR. (2014).** 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. (Mémoire). *Ecole nationale supérieure d'agronomie*. Algérie. P :103.

### M

**Madhavan R. and Jarrett H. W. (1994).** Calmodulin-activated phosphorylation of dystrophin. *Biochemistry*. Vol 33, N°19. P: 5797–5804.

**Maienfisch P. (2006).** Synthesis and Properties of Thiamethoxam and Related Compounds. *Zeitschrift für Naturforschung B*. Basel, Switzerland. Vol 61. P: 354- 359.

**Maienfisch, P., Huerlimann H., Rindlisbacher A., Gsell L., Ettwiler, H., Haettenschwiler J., Syeger E., & Walti M. (2001).** The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Managem. Scien*, London. vol. 57, n° 2. P :165-176.

**Marieb E. et Hoehn K. (2014).** Anatomie et physiologie humaines. Edition Pearson 6<sup>ème</sup> édition, Montreuil-France. P : 1291.

**Martinez-Garcia F., Regadera J., Cobo P., Palacios J., Paniagua R et Nistal M . (1995).** The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia*. Vol 27, N°4. P :195-206.

**Mensah D-G D J. (2021).** Propriétés antispermatogénétiques de l'extrait éthanolique des graines de *Garcinia kola* (Heckel, Clusiaceae) chez le rat Wistar. Master en Biochimie et Génétique en Santé. *Université d'ABOMEY-CALAVI*. Benin.

**Merihi M. (2008).** « Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin ». (Thèse de Doctorat). *Institut National Polytechnique de Toulouse*. France. P : 123.

**Messiad R., Habes SD. & Soltani N. (2015).** Reproductive effects of a neonicotinoid insecticide (Imidacloprid) in the German Cockroaches *Blattellagermanica* L. (Dictyoptera, Blattellidae). *Journal Entoml and Zool Studies*. vol 3, N°2. P: 01-06.

**Mieusset R., Bujan L. (1995).** Testicular heating and its possible contributions to male infertility: *International Journal of Andrologie*. Vol 18, N°4. P : 169-184.

**Mornet D, Rivier F. (2017).** Quel avenir pour la dystrophine?. *Les cahiers de myologie*. France. N°15. P : 17-21.

**Multigner L, (2005).** Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, risques & santé*. Vol 4, N°3. P : 187-194.

### N

**Nakamori M. and Takahash, M. P. (2011).** The role of  $\alpha$ -dystrobrevin in striated muscle. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol 12, N°3. P :1660–1671.

**Nicolas A., Lucchetti-Migane C., Ben Yaou R., Kaplan J., Chelly J., Leturc F., Barloy-Hubler F. and Le Rumeur E. (2012).** Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. Vol 7, N°1. P :1-15.

**Noblanc A., Kocer A. et Drevet J. (2012).** Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires. *Médecine Science*. Vol 28, N°5. P: 519 – 525.

**Norwood F.L., Sutherland-Smith A.J., Keep N.H. and Kendrick-Jones J. (2000).** The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in

## Références Bibliographiques

---

this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Struct. Lond. Engl.* Vol 8, N°5. P : 481–491.

### O

**Oberlin C., Christian V. et Jean-Louis B. (2004).** Livre précis d'anatomie TOME II. 11<sup>em</sup> édition Lavoisier-Technique et documentation, France. P : 812.

**OMS. (2009).** La classification recommandée par l'OMS de la dangerosité des pesticides & les Directives.

**O'Shaughnessy P. J., Baker P. J., & Johnston H. (2006).** The foetal Leydig cell - differentiation, function and regulation. *international journal of andrology.* vol. 29, n° 1. Royaume-Uni. P : 90-95.

**Ounis L. (2014).** Les anomalies morphologiques responsables des infertilités masculines dans l'Est Algérien : Aspect épidémiologique et génétique. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat en biochimie-biologie cellulaire et moléculaire. Université Constantine 1. P :199.

### P

**Paquet N. & Triffault-Bouchet G. (2020).** Les néonicotinoïdes : état des connaissances de leurs impacts sur les organismes aquatiques. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. *Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques.* P : 52.

**Prins K. W., Humston J.L., Mehta A., Tate V., Ralston E. et Ervasti J.M. (2009)** .Dystrophin is a microtubule-associated protein. *Journal of Cell Biology.* Vol 186, N°3. P :363–369.

**Prudhomme C.H. (2009).** Anatomie Physiologie Biologie. P : 401-461.

### R

**Rathore Hamire S. & Nollet Leo M.L. (2012).** Pesticides : Evaluation of environmental pollution. *Crc press.* London. P : 643.

**Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle BM., Rauh JJ., et Sattelle DB. (2005).** Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience.* vol. 5, n° 3-4. P :119-133.

**Raynaud M. (1973).** Les toxines microbiennes. *Médecine et Maladies Infectieuses.* Vol : 3, N°4. P :141,150.

**Ravel C. & Jaillard S. (2011).** La cellule de Sertoli. *Morphologie.* vol. 95, n° 311. France. P : 151-158.

**Rentschler S., Linn H., Deininger K., Bedford MT., Espanel X. et Sudol M. (1999).** The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem.* Vol 380, N°4. P: 431-442.

Robaire B. et Hermo L. (1988). Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure functions, and thier regulation. *The physiology of reproduction.* Vol 1. P: 999-1080.

**Robaire B., et Viger RS. (1995).** Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of Reproduction.* Vol 52, N°2. P: 226-236.

**Robaire B., Hinton B.T. et Orgebin-Crist M.C. (2006).** The epididymis. In: Neill J.D. (ed.) *Physiol. of Reprod.* third Edition, New York. P: 1071-1148.

**Roger T. (2002).** Contribution à l'étude anatomique de L'appareil Uro-Genital mâle de la grandeau code. Université Cheikh AntaDiop De Dakar. P : 20.

**Rybakova I. N., Amann K. J., and Ervasti, J. M. (1996).** A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *The Journal of Cell Biology.* Vol 135, N°3. P :661–672.

## Références Bibliographiques

---

### S

- Sabourin J., Lamiche C., Vandebrouck A., Magaud C. et Rivet J. (2009).** Regulation of TRPC1 and TRPC4 Cation Channels Requires an  $\alpha 1$ - Syntrophin-dependent Complex in Skeletal Mouse Myotubes. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 284, N°52. P :36248–36261.
- Sadoulet-Puccio H.M. et Kunkel, L.M. (1996).** Dystrophin and Its Isoforms. *Brain Pathol*. Vol 6, N°1. P: 25–35.
- Sadoulet-Puccio H.M., Rajala M. and Kunkel L.M. (1997).** Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. Proceedings of the *National*. Vol 94, N°23. P: 12413–12418.
- Sadoulet-Puccio H.M., Khurana T.S., Cohen J.B. & Kunkel L.M. (1996).** Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum. Mol. Genet*. Vol 5, N°4. P: 489-496.
- Schaafsma A., Limay-Rios V., Baute T., Smith J. et Xue Y. (2015).** Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *PLoS One*. Vol 10, N°2. P : 118-139.
- Seiler P., Cooper T.G. et Nieschlag E. (2000).** Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl*. Vol 23, N°2. P :65-76.
- Shalaby S.E., Farrag A.H. et El-Saed G.S. (2010).** Toxicological potential of thiamethoxam insecticide on albino rats and its residues in some organs. *JASMR*. Vol 5, N°2. P : 165-172.
- Sharma R. et Agarwal A. (2011).** Spermatogenesis: An Overview. Dans *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. A. Zini, et A. Agarwal, ed New York: Springer. Amérique. P: 19–44.
- Shi S.R., Key M.E. & Kalra K.L. (1991).** Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. USA. Vol 39. N°6. P: 741-748.
- Siffroi J. P. (2001).** L'appareil génital masculin (en ligne). *Service d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique Hôpital Teno*. P : 1-45.
- Soler C., Yeung C. H. and Cooper T G. (1994).** Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl*. Vol 17, N°5. P : 271-278.
- Soranzo L., Dadoune J.P. et Fainmaurel M.A. (1982).** Segmentation of the epididymal duct in mouse an ultrastructural study. *Reprod. Nutr. Dev*. vol 22, N°6. P :999-1012.
- Soumis N. (2018).** Les néonicotinoïdes : une menace pour la biodiversité, les écosystèmes et la sécurité alimentaire. (Revue). *Association canadienne des médecins pour l'environnement ACME*. P : 18.
- Soummani M. A. (1991).** Profil épidémiologique des couples infertiles pris en charge par le centre de FIV de CHU Mohamed VI de Marrakech. Université Kadi Ayyad. Algérie-Marrakech. P :116.
- Stone M. R., O-Neil A., Catino D. et Bloch R.J. (2005).** Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. *Molecular Biology of the Cell*. Vol 16, N°9. P :4280– 4293.
- Stromer M.H. (1998).** The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. *Histol Histopathol*. Vol 13, N°1. P : 283-291.
- Syngenta. (2004).** Fiche de Données de Sécurité –Actara 25 WG.

## Références Bibliographiques

---

### T

**Thibault C. et Levasseur M.C. (2001).** La reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouvelle édition entièrement refondue. France. P: 928.

**Tomizawa M. et Casida J.E. (2003).** selective toxicity of Neonicotinoïds attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*. Vol 48, N°1. P :339-364.

**Tortora, G. J. & Derrickson B. (2007).** Principes d'anatomie et de physiologie. De Boeck Sup 4<sup>ème</sup> édition. Bruxelles. P: 1376.

### V

**Vacca O. (2014).** Potentiel thérapeutique de la dystrophine-dp71 et barrières rétiniennes (Thèse doctorat). Université pierre et Marie Currie-Paris. France. P : 224.

**Vaughan D., Kretz O., Alqallaf A., Mitchell R. 1 Von der Heid J. (2020).** Diminution in sperm quantity and quality in mouse models on Duchenne Muscular Dystrophie induced by a myostatin-based muscle growth promoting intervention. *E.J.T.M M*. Vol 30, N°2. P : 8904.

**Vandebrouck A., Sabourin J., Rivet J., Balghi H. et Sebille S. (2007).** Regulation of capacitative calcium entries by alpha1- syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1- syntrophin. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Vol 21, N°2. P :608–617.

**Veri J.P., Hermo L. et Robaire B. (1993).** Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J Androl*. Vol 14, N°1. P : 23- 44.

### W

**Welsh U. (2002).** Précis d'histologie, cytologie, histologie, anatomie microscopique tournai. Éd médicales internationales. Belgique. P: 260.

**Wilson A H. (2014).** The prostate gland: a review of its anatomy, pathology, and treatment. *JAMA*. Vol 312, N°5. P 562.

### Y

**Yiğit N., Çolak E., Sözen M. & Özkurt S. (1998).** Taxonomy and Karyology of *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) and *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) in Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. vol 22, N°3. P : 203-212.

**Yoshida, M., Hama H., Ishikawa-Sakurai M., Imamura M. and Misuno J. (2000).** Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Human Molecular Genetics*. Vol 9, N°7. P: 1033–1040.

# Annexes

---

## Matériel non biologique

### 1. La molécule testée

Le produit testé dans cette étude est un insecticide de synthèse de la famille des néonicotinoïdes (ARLA,2007) dont la matière active est le Thiaméthoxame communément utilisé en agriculture pour le traitement phytosanitaire des fruits et des légumes. Son nom commercial est l'Actara 25WG (25% de TMX)] (Bourabia-Ait Hamlet,2012).

### 2. Produits utilisés

- Uréthane à 25%.
- Paraformaldéhyde à 4%.
- Ethanol.
- Xylène.
- Paraffine.
- Eau de robinet.
- Hématoxyline.
- Tampon de phosphate saline PBS.
- Tween 20 %.
- Peroxydase d'hydrogène.
- Peroxydase endogène.
- Caséine.
- L'anticorps primaire polyclonal de lapin soit anti-dystrophines.
- Anticorps secondaire anti-IGg de lapin biotinylé.
- Streptavidine-peroxydase.
- Chromogène Diamino-benzidin-tetrahydrochloride (DAB).
- Eukitt®.

### 3. Appareils et consommable

- Une balance de laboratoire.
- Plaque refroidissante.
- Machine à enrobage.
- Microtome.
- Bain marie.
- Plaque chauffante.

## **Annexes**

---

- Lames gélatinées.
- Lamelles.
- Etuve.
- Cassettes.
- Moules.
- Réfrigérateur.
- Microscope optique muni d'un appareil photos, connecté à l'ordinateur.

### **4. Matériel de sacrifice et de dissection**

- Planche à dissection.
- Gants.
- Masque.
- Planche.
- Pince.
- Ciseaux.
- Scalpel.
- Couteau.
- Clamps.
- Aiguille épicroânienne / Cathéters.

## Résumé

Malgré les avertissements des spécialistes concernant les effets néfastes potentiels des pesticides sur la santé humaine et animale, leur utilisation à l'échelle mondiale continue d'augmenter. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact d'une exposition sub-chronique à un insecticide de synthèse de la famille des néonicotinoïdes, le thiaméthoxame (TMX), sur l'expression des dystrophines au niveau du testicule et de l'épididyme chez le rat mâle, en utilisant une étude immunohistochimique avec l'enzyme peroxydase. Notre étude porte sur 12 rats mâles adultes de souche Wistar, répartis de manière aléatoire en 4 groupes contenant chacun 3 rats. Le premier groupe est destiné aux rats témoins (1 ml d'eau/J), tandis que les trois autres groupes sont traités par voie orale avec le produit étudié, le thiaméthoxame, à des doses différentes (DJA : 0,026 mg/kg), (NOAEL :2,6 mg/ kg) et (NOAELx2 :5,2 mg/ kg). Les organes d'intérêt : le testicule et l'épididyme, ont été prélevés et fixés avec du paraformaldéhyde à 4 %. Après la préparation des coupes paraffinées, celles-ci ont été marquées avec un anticorps anti-dystrophine, puis des photos ont été prises et traitées à l'aide du logiciel Axio-Vision pour effectuer une étude histomorphométrique. Les résultats de cette étude ont montré que l'exposition au thiaméthoxame, en particulier à des doses élevées (NOAELx2), provoque des modifications au niveau des testicules et de l'épididyme. Sur le plan histologique, cet insecticide induit une variabilité microscopique importante, telle qu'une augmentation du diamètre des tubes séminifères, un rétrécissement de la surface des noyaux des spermatogonies dans le testicule, une réduction de la surface des canaux épидидymaires, ainsi que l'apparition d'une hyperplasie qui se traduit par une prolifération des cellules dans l'épididyme.

De plus, le marquage des dystrophines est détecté sur diverses structures épидидymaire et testiculaire. L'exposition au TMX entraîne des changements dans la distribution et la localisation des dystrophines des deux organes reproducteurs, à l'exception au niveau des spermatozoïdes et l'épithélium épидидymaire du pôle apical présente une forte intensité de marquage. Ces changements s'accompagnent d'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères ainsi que dans les canaux épидидymaires. En conclusion que le TMX provoque des effets néfastes sur la fonctionnalité et la santé reproductive.

**Mots clés :** Pesticide, Thiaméthoxame, sub-chronique, Testicule, Epididyme, dystrophines, Rat.

## Abstract

Despite warnings from specialists about the potential adverse effects of pesticides on human and animal health, their worldwide use continues to increase. The aim of this study is to evaluate the impact of sub-chronic exposure to a synthetic insecticide of the neonicotinoid family, thiamethoxam (TMX), on dystrophin expression in the testis and epididymis of male rats, using an immunohistochemical study with the enzyme peroxidase. Our study involved 12 adult male Wistar rats, randomly divided into 4 groups, each containing 3 rats. The first group is intended for control rats (1 ml water/J), while the other three groups are treated orally with the product under study, thiamethoxam, at different doses (ADI: 0.026 mg/kg), (NOAEL:2.6 mg/ kg) and (NOAELx2:5.2 mg/ kg). The organs of interest, testis and epididymis, were harvested and fixed with 4% paraformaldehyde. Once the paraffin sections had been prepared, they were labeled with an anti-dystrophin antibody, then photos were taken and processed using Axio-Vision software to perform a histo-morphometric study. The results of this study showed that exposure to thiamethoxam, particularly at high doses (NOAELx2), causes changes in the testes and epididymis. Histologically, this insecticide induces significant microscopic variability, such as an increase in the diameter of the seminiferous tubules, a shrinkage of the surface area of spermatogonial nuclei in the testis, a reduction in the surface area of the epididymal ducts, and the appearance of hyperplasia resulting in cell proliferation in the epididymis. In addition, dystrophin labeling is detected on various epididymal and testicular structures. Exposure to TMX results in changes in the distribution and localization of dystrophins in both reproductive organs, with the exception of spermatozoa, where the epididymal epithelium at the apical pole shows a high intensity of labeling. These changes are accompanied by a decrease in sperm counts in the lumen of the seminiferous tubules and in the epididymal ducts. In conclusion, TMX causes adverse effects on functionality and reproductive health.

**Key words:** Pesticide, Thiamethoxam, sub-chronic, Testis, Epididymis, dystrophins, Rat.

