



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



**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers**

**Département de biologie**

***Laboratoire de Recherche***

***Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition***

**THESE**

Présentée par : **M<sup>elle</sup> MEDJDOUB AMEL**

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

**En Physiologie et Biochimie de la Nutrition**

Thème

Evaluation des effets métaboliques d'un gavage par les pesticides (Mancozèbe, Métribuzine) chez le rat Wistar.

Soutenue le 03 /07/2013 devant le jury composé de :

<b>Présidente :</b>	<b>M<sup>me</sup> BELARBI MERIEM</b>	Professeur, Université, <b>TLEMCEN</b>
<b>Directrice de Thèse :</b>	<b>M<sup>me</sup> MERZOUK Hafida</b>	Professeur, Université <b>TLEMCEN</b>
<b>Examinatrice:</b>	<b>M<sup>me</sup> BABA AHMED FATIMA ZOHRA</b>	MCA, Université de <b>TLEMCEN</b>
<b>Examinatrice :</b>	<b>M<sup>me</sup> EL KEBIR FATIMA ZOHRA</b>	Professeur, Université d' <b>ORAN</b>
<b>Examineur :</b>	<b>M<sup>r</sup> BABA HAMED BEY</b>	Professeur, Université d' <b>ORAN</b>
<b>Examineur :</b>	<b>M<sup>r</sup> AOUES ABDELKADER</b>	Professeur, Université d' <b>ORAN</b>

**Année Universitaire : 2012-2013**





*A l'âme de mon père  
Qui est toujours présent dans mon cœur*

## *Dédicaces*

*À ma mère*

*À ma grande mère*

*À mes chères sœurs (LAMIA, HIND, YASMINE et NOOR)*

*À mes chers frères*

*À tous ceux que j'aurais oublié de citer mais  
qui existent au fond de mon cœur et de ma pensée*

## ***Remerciements***

C'est avec un réel plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse *Professeur MERZOUK Hafida*, professeur des universités et Directrice du Laboratoire de Recherche Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition. Elle n'a épargné aucun effort pour que ce travail s'effectue dans les meilleures conditions. Je voudrais lui exprimer ma profonde gratitude pour l'accueil bienveillant qu'elle a su me réserver au sein de son équipe de recherche depuis le jour où j'ai commencé la préparation de ma thèse et pour avoir guidé mes pas sur la voie de la recherche scientifique. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour cela. Son soutien s'est avéré déterminant pour mener ce travail à terme.

Si aujourd'hui, je suis parvenue à achever ma thèse, c'est grâce à son encadrement et ses encouragements. Je lui exprime mon admiration pour ses grandes qualités tant scientifiques qu'humaines.

Je suis particulièrement reconnaissante à *Madame Belarbi Meriem* professeur de l'université de Tlemcen pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir acceptée la présidence du jury de ma thèse. Qu'elle soit assurée de ma respectueuse considération.

J'exprime mon estime et mes remerciements aux honorables membres de jury :

Je remercie énormément *Madame Baba Ahmed Fatima Zohra*, Maître de conférence à la Faculté des Sciences d'Université de Tlemcen qui a bien voulu accepter d'examiner mon mémoire de thèse. Je la remercie aussi de m'avoir initié aux cultures cellulaires.

Mes remerciements sincères et respectueux vont au *Madame El Kebir Fatima Zohra*, Professeur de l'université d'Oran, pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme Examinatrice.

J'adresse mes sincères remerciements à *Monsieur Baba Ahmed Bay*, Professeur de l'université d'Oran, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail et d'être examinateur.

Je tiens également à remercier *Mosieur Aoues Abdelkader* Professeur de l'université d'Oran qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être Examineur de ce travail et de participer à ce jury.

Je témoigne également ma reconnaissance sincère à *Mr MERZOUK Sid Ahmed*, pour son dévouement et intérêt à mon projet recherche et soutien scientifique tout au long de ce travail, son implication, ses critiques constructives dans le domaine des statistiques, ses encouragements, qui ont tous contribué à la réalisation d'un travail de grande qualité.

Je remercie *Monsieur Michel Narce*, Professeur de l'université de Bourgogne-Dijon, Je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire de " Lipides, Cancer " à Dijon.

Pour ses précieux conseils de tout ordre, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse lors de mon séjour à Dijon, je remercie tout particulièrement *Monsieur Michael Rjallond*, Maître de conférences à la Faculté des Sciences Gabriel de Dijon à l'Université de Bourgogne. Il m'a appris les différentes techniques de biologie moléculaire. Qu'il trouve ici les marques de ma reconnaissance et de mon respect.

Je remercie très chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, particulièrement :

*Mme Malti Nassima*, pour sa contribution au travail pratique, son dévouement permanent et sa gentillesse sans limite ;

Tous mes meilleurs remerciements à *Monsieur Souleymane Abdoulazize* thésard de l'université de Bourgogne pour son encouragement et ces précieux conseils;

Merci à *Anne Sophie pierre et à Mélaine* doctorante de l'université de Bourgogne-Dijon pour leur soutien précieux en particulier sur le plan technique et méthodologique.

Merci aux membres du laboratoire "Lipides et cancer" de l'université de Bourgogne pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir pendant les quatre ans de collaboration et à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer de près ou de loin tout au long de ces années de thèse.

*Mr GRESTI Joseph & Mme BELLANGER Sandrine*, Ingénieurs à l'Université de Bourgogne pour leur qualité humaine, leur soutien, et leur générosité, merci.

*Monique BAUDOIN, Jéraum BELLANGER*, toujours prêts à me rendre service avec leur bonne humeur permanente, leur sympathie et leur gentillesse extrême ;

Je remercié également mes collègues les thésards et les stagiaires : *Julien* (pour son encouragement et soutien), *Katharina, Maria, Tswane et Sonia*, du laboratoire "lipides et Cancer", je n'oublierai jamais les bons moments qu'on a passé ensemble ;

Que tous mes amis au Département de Biologie à la Faculté SNVTU de Tlemcen (*Nadjate, Djamila, Esma, Nani, Hafida*) trouvent ici l'expression de ma profonde amitié.

Arrivée au terme (déjà la fin !) du parcours universitaire, j'exprime toute ma gratitude à ceux qui m'ont donné goût aux sciences et à la recherche : mes parents et mes enseignants.

Sans eux je ne serais pas là, et surtout je ne serais pas moi-même. Je dédie cette thèse à mes parents.



## TABLES DES MATIERES

### AVANT PROPOS

Introduction.....	1
-------------------	---

### ETAT ACTUELE SUR LE SUJET

I. Les pesticides.....	6
I.1. Définitions des pesticides.....	6
I.2. Classification des pesticides.....	7
I.3. Résidus et indices toxicologiques.....	8
I.3. 1. Limite maximale de résidus (LMR).....	11
I.3. 2. Dose journalière admise (DJA).....	11
I.4. Devenir des pesticides dans l'environnement.....	11
I.4.1-Contamination des eaux.....	14
I.4.2. Contamination des sols.....	14
II. Modes d'exposition de l'homme aux pesticides et effets sur la Santé.....	16
II.1. Mesure de l'exposition.....	16
II.2. Exposition professionnelle.....	16
II.3. Exposition non professionnelle.....	18
II.4. Exposition des enfants.....	19
II.5. Effets des pesticides sur la santé chez l'homme.....	19
II.5.1. Effets cancérogènes.....	20
II.5.2. Effet neurologique.....	23
II.5.3. Effets sur le système endocrinien et la reproduction.....	24
II.5.4. Effets sur le système immunitaire.....	25
II.6. Principaux mécanismes de toxicité des pesticides.....	27

### MATERIEL ET METHODES

#### I. Etude *in vitro*

I. Choix des pesticides.....	29
I.2. Choix des modèles d'études <i>in vitro</i> .....	29
I.2.1. Isolement des splénocytes.....	29
I.2.2. Isolement des lymphocytes humains.....	31
I.3. Préparation des solutions mères des pesticides.....	31
I.4. Test de transformation lymphoblastique (TTL) .....	35
I.4.1. Comptage des splénocytes ou des lymphocytes.....	35
I.4.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire ou splénocytaire par la méthode du MTT.....	36

I.4.3. Dosage des protéines.....	36
I.5. Dosage des Interleukines.....	37
I.5.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2).....	37
I.5.2. Dosage des Interleukines 4 (IL-4).....	37
I.5.3. Dosage de l'interféron $\gamma$ (INF $\gamma$ ).....	39
I.6. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes et des Splénocytes.....	37
I.6.1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes et des splénocytes en présence des différents pesticides.....	38
I.6.2. Détermination de l'activité de Superoxyde dismutase des lymphocytes et des Splénocytes en présence des différents pesticides (SOD; EC 1.15.1.1).....	38
I.6.3. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes en présence des différents pesticides (CAT, EC 1.11.1.6).....	38
I.6.4. Teneurs en hydroperoxydes des lymphocytes et des splénocytes en présence des différents pesticides.....	38
I.6.5. Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes et des splénocytes en présence des différentes pesticides (Méthode de Levine et al., 1996).....	39
II. Etude in vivo : Essais de toxicité chronique.....	39
II.1. Protocole Expérimental.....	39
II.2. Dosage des paramètres biochimiques.....	40
II.2.1. Détermination des teneurs en créatinine sérique.....	40
II.2.2. Détermination des teneurs en urée sérique.....	42
II.2.3. Détermination des teneurs en glucose sérique.....	42
II.2.4. Détermination des paramètres lipidiques et protéiques au niveau du sérum, des lipoprotéines et des organes (le foie, l'intestin, le muscle gastropharyngien, et le tissu adipeux).....	42
II.2.4.1. Séparation des lipoprotéines.....	42
II.2.4.2. Détermination des teneurs en cholestérol et en triglycérides.....	43
II.2.4.3. Détermination des teneurs en protéines totales.....	43
II.2.4.4. Détermination des lipides totaux des organes (le foie, l'intestin, le muscle gastrocnémien, et le tissu adipeux).....	43
II.3. Détermination du statut oxydant/antioxydant.....	43

<b>II.3.1. Dosage de la vitamine C.....</b>	<b>43</b>
<b>II.3.2. Détermination des protéines carbonylées.....</b>	<b>44</b>
<b>II.3.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....</b>	<b>44</b>
<b>III.3.4. Dosage des diènes conjugués plasmatiques.....</b>	<b>44</b>
<b>III.3.5. Dosage de l'activité de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6).....</b>	<b>45</b>
<b>II.3.6. Dosage du Glutathion érythrocytaire réduit (GSH) (Ellman, 1959).....</b>	<b>45</b>
<b>III. Analyse statistique.....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTATS ET INTERPRETATION</b>	
<b>I. Effet des pesticides in vitro.....</b>	<b>46</b>
<b>I.1. Effets des pesticides sur la prolifération des lymphocytes humaines et des Splénocytes de rat.....</b>	<b>46</b>
<b>I.1.1. Effet de Métribuzine sur la prolifération des lymphocytes et des Splénocytes.....</b>	<b>46</b>
<b>I.1.2. Effets du Mancozèbe sur la prolifération des lymphocytes et des Splénocytes.....</b>	<b>46</b>
<b>I.2. Effets des pesticides sur la sécrétion des cytokines.....</b>	<b>46</b>
<b>I.2.1. Effets de Métribuzine sur la sécrétion des cytokines.....</b>	<b>46</b>
<b>I.2.2. Effets du Mancozèbe sur la sécrétion des cytokines.....</b>	<b>48</b>
<b>I.3. Statut oxydant/antioxydant des lymphocytes humaines et des splénocytes de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>48</b>
<b>I.3.1. Effets de Métribuzine sur les teneurs en glutathion, en hydro peroxydes et en protéines carbonylées des lymphocytes et des splénocytes.....</b>	<b>48</b>
<b>I.3.2. Effets du Mancozèbe sur les teneurs en glutathion, en hydro peroxydes et en protéines carbonylées des lymphocytes et des splénocytes.....</b>	<b>52</b>
<b>I.3.3. Détermination de l'activité de la Superoxide dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulées en présence de Métribuzine ou du Mancozèbe.....</b>	<b>52</b>
<b>I.3.3.1. Détermination de l'activité de la Superoxide dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulées en présence de Métribuzine.....</b>	<b>52</b>
<b>I.3.3.2. Détermination de l'activité de la Superoxide dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulées en présence du Mancozèbe.....</b>	<b>55</b>
<b>I.4. Formation des Micronoyaux.....</b>	<b>55</b>

## **IN VIVO**

<b>II. Effet des pesticides chez le rat Wistar.....</b>	<b>57</b>
<b>II. 1. Poids corporel et consommation alimentaire.....</b>	<b>57</b>
<b>II.1. 1.Variation du poids corporel chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>57</b>
<b>II.1.2 Variation de la consommation alimentaire.....</b>	<b>57</b>
<b>II.1.3. Apport énergétique quotidien chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>57</b>
<b>II.2. Paramètres biochimiques sanguins.....</b>	<b>58</b>
<b>II.2.1. Teneurs sériques en glucose, en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou par le Mancozèbe.....</b>	<b>58</b>
<b>II.2.1.1. Teneurs sériques en glucose chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....</b>	<b>58</b>
<b>II.2.1.2. Teneurs sérique en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....</b>	<b>58</b>
<b>II.2.2. Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>58</b>
<b>II.2.2.1. Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>58</b>
<b>II.2.2.2. Teneurs en cholestérol (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>62</b>
<b>II.2.3.Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>64</b>
<b>II.2.3.1. Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>64</b>
<b>II.2.3.2. Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>64</b>
<b>II.2.4.Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe .....</b>	<b>67</b>
<b>II.2.4.1.Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>67</b>
<b>II.2.4.2.Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>67</b>
<b>II.3. Poids et Paramètres biochimiques des organes.....</b>	<b>67</b>
<b>II.3.1. Effets des pesticides sur le poids des organes.....</b>	<b>67</b>

<b>II.3.1.1. Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>67</b>
<b>II.3.1.2. Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>70</b>
<b>II.3.2. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>70</b>
<b>II.3.2.1. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>70</b>
<b>II.3.2.2. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>70</b>
<b>II.3.3. Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>72</b>
<b>II.3. 3.1. Teneurs en cholestérol des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>72</b>
<b>II.3. 3.2. Teneurs en cholestérol des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>72</b>
<b>II.3.4. Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>76</b>
<b>II.3.4.1. Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>76</b>
<b>II.3.4.2. Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>76</b>
<b>II.3.5. Teneurs protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>76</b>
<b>II.3.5.1. Teneurs protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....</b>	<b>76</b>
<b>II.3.5.2. Teneurs protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....</b>	<b>78</b>
<b>II.4. Statut Oxydant/ Antioxydant.....</b>	<b>78</b>
<b>II. 4.1. Teneurs sérique en vitamine C et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe .....</b>	<b>78</b>
<b>II. 4.1.1. Teneurs sérique en vitamine C chez les rats témoins et les rats expérimentaux .....</b>	<b>78</b>

II. 4.1.2. Teneurs en glutathion érythrocytaire chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	81
II. 4.1.3. Teneurs érythrocytaire de la catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats expérimentaux.....	81
II.4.2. Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	81
II.4.2.1. Teneurs en plasmatique en Malondéaldéhyde (MDA) chez les rats témoins et les différents lots de rats expérimentaux.....	81
II.4.2.2. Teneurs en plasmatique en Protéine carbonylées chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	81
II.4.2.3. Teneurs en plasmatique en Diènes conjuguées (DIC) chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	84
II.4.3. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	84
II.4.3.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau du foie chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	84
II.4.3.2. Teneurs en Protéines carbonylées au niveau du foie chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	84
II.4.3.3. Teneurs érythrocytaires en glutathion au niveau du foie chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	87
II.4. 4. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	87
II.4.4.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau du muscle chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	87
II.4.4.2. Teneurs en Protéines carbonylées au niveau du muscle chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	87
II.4.4.3. Teneurs érythrocytaires en glutathion au niveau du muscle chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	87
II.4.5. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de tissu adipeux chez les rats témoins et différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	87
II.4.5.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau de tissu adipeux chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....	87
II.4.3.3.2. Teneurs en protéines carbonylées au niveau de tissu adipeux chez les rats témoins et différents lots de rats expérimentaux.....	98
II.4.5.2. Teneurs érythrocytaire en glutathion au niveau de tissu adipeux chez les	

<b>rats témoins et les rats expérimentaux.....</b>	<b>94</b>
<b>II.4.5.3. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....</b>	<b>94</b>
<b>II.4.6.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau de l'intestin chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....</b>	<b>94</b>
<b>II.4.6.2. Teneurs en protéines carbonylées au niveau de l'intestin chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....</b>	<b>94</b>
<b>II.4.6.3. Teneurs glutathion au niveau de l'intestin chez les rats témoins et les rats expérimentaux.....</b>	<b>101</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSION</b>	
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>116</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>132</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principales familles d'insecticides, de fongicides et d'herbicides.....	9
Tableau 2: Persistance de certains pesticides dans l'eau.....	15
Tableau 3: Pesticides et Cancer chez l'adulte.....	20
Tableau 4: Taille et densité des cellules sanguines.....	30
Tableau 5: Structure et poids moléculaires des pesticides utilisés.....	34
Tableau 6: Rapports TH1/TH2 (INF $\gamma$ /IL-4) en présence des pesticides.....	50
Tableau 7: Statut oxydant/antioxydant des lymphocytes humaines et des splénocytes de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	51
Tableau 8: Activité de la Superoxyde dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulées en présence de Métribuzine ou du Mancozèbe.....	54
Tableau 9: Formation des micronoyaux.....	56
Tableau 10: Poids corporel et consommation alimentaire chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	59
Tableau 11: Teneurs sériques en glucose, en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	60
Tableau 12: Teneurs en protéines (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	67
Tableau 13: Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	74
Tableau 14: Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	76



## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structures chimiques des principales familles de pesticides.....	10
Figure 2: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement .....	12
Figure 3: Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides.....	17
Figure 4: Méthode d'isolement et purification des splénocytes.....	30
Figure 5 : Méthode d'isolement et purification des lymphocytes.....	33
Figure 6 : Protocole expérimental.....	40
Figure 7 : Effets de la Métribuzine ou du Mancozèbe sur la prolifération des lymphocytes et des Splénocytes .....	47
Figure 8: Effets de la Métribuzine sur la sécrétion des cytokines.....	49
Figure 9: Effets du Mancozèbe sur la sécrétion des cytokines.....	51
Figure 10 : Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine .....	61
Figure 11: Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	62
Figure 12 : Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	64
Figure 13 : Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	66
Figure 14 : Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par la Métribuzine.....	69
Figure 15 : Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par le Mancozèbe.....	70
Figure 16 : Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	72
Figure 17 : Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	73
Figure 18 : Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	78
Figure 19 : Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	79

Figure 20 : Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	81
Figure 21 : Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	82
Figure 22 : Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine.....	84
Figure 23 : Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par le Mancozèbe .....	85
Figure 24 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	87
Figure 25 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	88
Figure 26 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	89
Figure 27 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	90
Figure 28: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	91
Figure 29: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	92
Figure 30 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.....	94
Figure 31 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.....	95

## TABLEAUX EN ANNEXE

Tableau A1: Effets de la Métribuzine ou du Mancozèbe sur la prolifération des lymphocytes et des splénocytes.....	132
Tableau A2: Effets de la Métribuzine sur la sécrétion des cytokines.....	133
Tableau A3: Effets du Mancozèbe sur la sécrétion des cytokines.....	134
Tableau A4: Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	135
Tableau A5: Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe .....	136
Tableau A6: Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	137
Tableau A7: Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	138
Tableau A8: Teneurs en protéines totales des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	139
Tableau A9: Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe .....	140
Tableau A10: Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe .....	141
Tableau A11: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	142
Tableau A12: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	143
Tableau A13: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de tissu adipeux chez les rats témoins et différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	144
Tableau A14: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.....	145
Tableau A15 : Composition du Milieu RPMI 1640.....	146

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ACTA: Association de coordination technique agricole.
- ADN: Acide désoxyribonucléique.
- AGPI: Acides gras polyinsaturés.
- BPA: bonnes pratiques agricoles.
- CAT: Catalase.
- CCPA: Conseil Canadien de protection des animaux.
- CD3+: Clusters de différenciation.
- CD5: Cluster de différenciation 5.
- CEC: Commission for environmental cooperation of north America (Commission pour la coopération environnementale de l'Amérique du nord).
- Cemagref: Centre national du machinisme agricole, du génie rural, des eaux et des forêts.
- CH-HDL: Cholesterol-High density Lipoprotein (cholestérol des lipoprotéines de haute densité).
- CH-LDL: Cholesterol-Low density Lipoprotein (cholestérol des lipoprotéines de faible densité).
- CH-VLDL: Cholesterol- Very Low density Lipoprotein (cholestérol des lipoprotéines de très faible densité).
- ConA: Concanavaline A.
- CPP: Comité de la prévention et de la précaution.
- CTL: Cytotoxic T lymphocytes (lymphocytes cytotoxiques).
- D1: Dose sans effet pour les pesticides utilisés (5mg/kg pour le Mancozèbe ; 1,3 mg/kg pour la Métribuzine).
- D2: Dose létale 50/100 (50 mg/kg pour le Mancozèbe ; 13 mg/kg pour la Métribuzine).
- DA: Dinars Algérien.
- DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane .
- DDE: Dichlorodiphényldichloroéthylène .
- DDVP: Dichlorvos pesticide.
- DES: Dose sans effet.
- Dic: Diènes conjuguées.
- DJA: Dose journalière admise.
- DL50/100: Dose létale 50/100.
- DMSO: Diméthylsulfoxyde.
- DNPH: Dinitrophénylhydrazine.
- DTNB: 5,5 '-Dithiobis-(2-nitrobenzoïque).
- EDTA: Acide éthylènediaminetetraacétique.
- ECD: Détecteur par capture d'électron.

- ECH: European commission health (Commission européenne de santé publique).
- E.N.S.P: Annexes de l'atelier santé environnement.
- EOR: espèces oxygénées.
- ET: Ecart type.
- FAO/OMS: Food and agriculture organization of the united nations (Organisation d'alimentation et d'agriculture des nations unies/ Organisation mondiale de la santé).
- Fas/FasL: Voie signalétique FAS.
- FSH: Hormone folliculo-stimulante .
- GC: Chromatographie en phase gazeuse.
- GOD: glucose oxydase.
- GSH: Glutathion réduit.
- GTPWOAUFSP: Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes (Recommandation pour le bien-être des animaux de laboratoire).
- HDL: High-density lipoprotein (lipoprotéins de haute densité).
- HRP: Horseradish peroxidase.
- HYDR : Hydroperoxydes.
- IgA: Immunoglobulines de type A.
- IgE: Immunoglobuline de type E.
- IgG: Immunoglobulines de type G.
- IgM: Immunoglobulines de type M.
- IL-2: Interleukine 2.
- IL-4 : Interleukine 4.
- INERIS: Institut national de l'environnement industriel et des risques.
- INF $\gamma$ : l'Interféron-gamma.
- INRA : Institut national de la recherche agronomique.
- INRS: Institut national de la recherche scientifique.
- IRC: Insuffisance rénale chronique.
- IS: Indice de stimulation.
- IWCPC: International workshop on corp protection chemistry (Atelier international sur la protection de la chimie).
- LAK: lymphokine activated killer (des cellules tueuses activées par la lymphokine)
- LC : Chromatographie en phase Liquide.
- LDL: Low-density Lipoprotéin (lipoprotéine de faible densité).
- LH: Hormone lutéinisante.
- LMR: Limite maximale de résidus.

- LNE: Laboratoire national de méthodologie et d'essais.
- LNH: Lymphome non hodgkinien.
- MDA: Malondialdéhyde.
- M.M: Myélome multiple.
- MN: Micronoyau.
- MS: détecteur par spectrométrie de masse.
- MTT: 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide.
- NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.
- NK: natural killer (cellules tueuses naturelles ou lymphocytes nuls).
- NPD: Détecteur pour capture de l'azote N et le phosphate P.
- OCDE: Organisation for economic co-operation and development (Organisation pour la coopération et le développement économique).
- ONAB: Office national d'aliment de bétails.
- OPDCSET: Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.
- PBS: phosphate buffered saline.
- PCAR: Protéines carbonylées.
- PCE: Perchochloroéthylène.
- POC: Pesticides organochlorés.
- PPP: Produits phytopharmaceutiques.
- PT: protéines totales.
- SBA: Albumine sérique bovine.
- SOD: Superoxide dismutase.
- S.T.M: Sarcome des Tissus Mous.
- TBA: Acide ThioBarbiturique.
- TBTO: Bis(tri-n-butyltin) oxide.
- TCA: Acide Trichloroacétique.
- TCE: Trichloroéthylène .
- T CD4+: lymphocytes T auxiliaires, helpers.
- TCD8+: lymphocytes cytotoxiques CD8+.
- TCD19+: lymphocytes T auxiliaires CD19+.
- TCR: T cell receptor (récepteur des cellules T).
- TG-HDL: Triglycérides-High density Lipoprotein (triglycerides des lipoprotéins de haute densité).
- TG-LDL: Triglycérides-Low density Lipoprotein (triglycerides des lipoprotéins de faible densité).
- TG-VLDL: Triglycérides- Very Low density Lipoprotein (triglyceride des lipoprotéins de très faible densité).

- Th1/Th2: T helper cells1/ T helper cells 2.
- TNB : Acide thionitrobenzoique.
- TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale.
- TPP: Triphenylphosphine.
- TTL : Test de transformation lymphoblastique.
- UIPP: Union des Industries de la Protection des Plantes.
- UK: United Kingdom (Royaum unie).
- USA: United states of America( les états unies).
- UV: Ultra Violet.
- VLDL: Very Low-density Lipoprotein (lipoproteins de très faible densité).



# AVANT PROPOS



## AVANT-PROPOS

Le travail exposé dans cette thèse de doctorat a fait l'objet de publications scientifiques et a été présenté par communications lors des congrès scientifiques internationaux.

## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

**A. Medjdoub**, S.A. Merzouk, H. Merzouk, F.Z. Chiali, M. Narce. (2011). Effects of Mancozeb and Metribuzin on *in vitro* proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.101(1): 27-33.

Hamed YB, **Medjdoub A**, Kara BM, Merzouk H, Villemin D, Narce M. (2012). 5,6-Dihydro-2H-pyranones and 5,6-dihydro-2H-pyridones and their derivatives modulate *in vitro* human T lymphocyte function. *Mol Cell Biochem*. 360(1-2):23-33.

Y. Baba hamed, **A. Medjdoub**, H. Merzouk, M. Narce (2012). Changes of *in vitro* cytokine production induced by  $\delta$ -lactams. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*. 6(64):369-373.

## RÉSUMÉS PUBLIÉS

**Medjdoub A.**, Merzouk H., Bouanane S., Merzouk S., Narce(2012). Mancozeb and Metribuzin modulate *in vitro* lymphocyte proliferation and redox status of human lymphocytes. *Fundamental and clinical pharmacology*. 26(1):1-138.

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Bouanane S., **Medjdoub A.**, Merzouk H., Djelti F. , Baba Ahmed Fz., Benkalfat N.B., Soulimane-Mokhtari N., Narce M. (2011). Effets d'un régime hyperlipidique et hypercalorique sur quelques paramètres du stress oxydatif chez la rate gestante et allaitante. Communication affichée présentée oralement au Congrès international de Nutrition le 22-23 mai 2011 à Oran. Algérie.

Y. Baba hamed, **A. Medjdoub**, H. Merzouk, M. Narce(2012). Changes of *in vitro* cytokine production induced by  $\delta$ -lactams. Communication présentée oralement au congrès international de la WASET le 25-26 Avril 2012 à Paris. France

Medjdoub A., Merzouk H., Bouanane S., Merzouk S., Narce(2012). Mancozeb and Metribuzin modulate in vitro lymphocyte proliferation and redox status of human lymphocytes. Communication affichée présentée au Congrès international de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, P2T (4-6 Avril) 2012 à Dijon.France



# INTRODUCTION

[Tapez un texte]

## INTRODUCTION

Avant l'avènement des produits phytosanitaires, les systèmes de culture étaient conçus pour assurer le meilleur compromis entre le risque phytosanitaire et le potentiel de production de la culture (INRA – Cemagref, 2005). Cependant, les pertes en rendement des productions agricoles dues aux maladies parasitaires très meurtrières, aux ravageurs et aux adventices (ou mauvaises herbes) pouvaient atteindre des proportions importantes (Oerke et Dehne, 1997).

Après la seconde guerre mondiale, les pesticides ont grandement contribué à l'amélioration de la santé publique en permettant, d'une part, d'éradiquer ou de limiter la propagation de maladies parasitaires et en garantissant, d'autre part, une production alimentaire de qualité et dans ce cas, ils ont constitué un progrès considérable dans la maîtrise des ressources alimentaires (OPDCSET, 2009).

De plus, l'agriculture intensive, tournée vers la productivité et le rendement maximal, s'est développée de manière considérable et elle a développé en plus l'utilisation massive des produits phytosanitaires qui sont représentés sur le marché mondial au cours de l'année 2005 par un chiffre de vente qui dépasse 31 milliards de dollars (UIPP, 2006).

D'autre part, certains experts estiment que l'augmentation des rendements des terres agricoles a permis de limiter la déforestation et donc de préserver 50% de la surface de la forêt actuelle en 50 ans (IWCPC, 2005).

Ce traitement par les pesticides est jusqu'à présent le moyen de protection prépondérant, et leur utilisation est devenue indispensable pour atteindre les niveaux de production maximaux et satisfaire une demande de plus en plus accrue des consommateurs en produits alimentaires.

Cependant, les pesticides peuvent aussi être très nocifs, et ils sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement en s'accumulant dans les écosystèmes. Ils sont en effet fréquemment mis en cause dans la dégradation de la qualité des eaux douces souterraines et des eaux côtières, de l'air et du sol, dans la réduction de la biodiversité terrestre constatée dans les zones agricoles et dans les milieux naturels contaminés ou bien encore dans des cas de surmortalité des abeilles et de baisse de production des ruches ( INRA-Cemagref, 2005). Ceci a enclenché une prise de conscience des pouvoirs publics dans le monde. En 1972, les organochlorés sont interdits d'utilisation aux Etats-Unis et en Europe et une réglementation concernant spécifiquement les produits phytosanitaires est mise en place dans les années 80. Par contre, pour les pays en développement, le manque de la conscience publique sur les risques provenant de cette exposition et le manque d'information sur leurs dangers, ainsi que la pauvreté, l'analphabétisme et le manque d'infrastructures de santé dans les milieux ruraux font en sorte que les pesticides soient une menace majeur pour la sécurité alimentaire, la santé et l'environnement (Mc Cauley *et al.*, 2006). Ces produits phytosanitaires sont dans le cadre d'une politique gouvernementale productiviste et à des fins et des volontés exportatrices, une des composantes

## INTRODUCTION

essentielles de la production alimentaire, et leur utilisation est toujours en croissance. De nouvelles matières actives sont continuellement et fréquemment introduites sur le marché.

Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle des pesticides et l'apparition de certaines pathologies dans les populations concernées. Des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne, des problèmes d'infertilité ou encore du système immunitaire affaibli sont plus fréquents chez eux (Alavanja, 2004; Ascherio *et al.*, 2006, Baldi et Lebailly, 2007). La question des risques pour l'homme est donc posée tant au niveau professionnel qu'à celui du consommateur.

Jusqu'à présent, le régime alimentaire est une source importante d'exposition de la population générale aux pesticides et à leurs traces très dangereuses présentes dans les denrées (OMS, 2004). Parmi les différentes études examinant les effets de faibles quantités de pesticides, pendant des périodes longues, certaines ont montré des effets significatifs *in vitro* et *in vivo* (Sanderson *et al.*, 2002).

Afin de minimiser l'exposition humaine aux résidus de pesticides, les gouvernements européens ont établi plusieurs contrôles réglementaires concernant leur utilisation et le niveau de leurs résidus présent dans les denrées. Malheureusement, aucune analyse de ce genre n'a été faite jusqu'à présent en Algérie. L'usage alarmant des pesticides dans de nombreux domaines a fait de notre pays l'un des plus grands utilisateurs des pesticides et en grandes quantités. Ainsi environ 400 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie dont la majorité est largement utilisée par les agriculteurs (Bouziani, 2007). La production et le commerce des pesticides ainsi que le nombre de tonnes utilisées dans le pays sont évalués selon le Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement en 2006 dans le cadre de la production (Fabrication - poudre: 3745 tonnes /an; liquide: 2617 10<sup>3</sup> litres/an; insecticides: 13676 boîtes/an) et dans le cadre d'importation (8927 tonnes/ an; Importation valeur 4418 10<sup>6</sup> DA contre Exportation valeur 7 10<sup>6</sup> DA). Cette utilisation élevée de pesticides doit être remise en question par la prise de conscience de leurs impacts négatifs sur l'environnement et doit se traduire par un renforcement progressif de la réglementation. Les risques sanitaires sont mal évalués, et accrus par le système de culture intensive utilisé en Algérie. Selon certaines études mondiales, 64 % des fruits et 35 % des légumes que nous consommons contiennent des résidus de pesticides, et 6% de ces produits ont une teneur en pesticides supérieure à la limite maximale de résidus (INRA-Cemagref, 2005).

De plus, en Algérie, les laboratoires analysent rarement les produits alimentaires pour déterminer leur teneur en substances chimiques vu le manque d'équipements permettant l'analyse, le contrôle et le suivi de la gestion de ces produits toxiques. C'est ainsi que la moitié des fruits et des légumes dont notamment la pomme de terre, les poivrons, tomates, poireaux, laitues, oranges, fraises, pastèques.....vendus sur les étalages, contiendraient ces substances chimiques. Pire encore,

## INTRODUCTION

des pesticides interdits de commercialisation et d'usage dans l'Union Européenne depuis les années 70 (Merhi, 2008) existent en Algérie. D'autres problèmes comme l'absence de législation pour le contrôle adéquat des pesticides, l'absence de législation sur les conditions de travail et la gestion des polluants, l'accès facile aux substances toxiques, l'absence de système national de surveillance des poisons et de centre d'information qui ont comme mission de conseiller les agriculteurs, l'absence de moyens pour conseiller et renforcer les lois nationales, l'absence des directions de la consommation et de la répression des fraudes et qui veillent à l'application des exigences réglementaires et mènent des actions répressives, le manque d'information et de sensibilisation de l'utilisateur concourent à augmenter le risque lié à la consommation des fruits et légumes contaminés par les pesticides affectant la santé du consommateur. L'exposition aux pesticides se caractérise donc par une multiplicité des voies d'exposition.

Ces substances peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion et par inhalation. En plus de l'exposition directe, les sources de contact peuvent être indirectes : les aliments, l'eau et l'atmosphère. On distingue deux types d'intoxication selon le mode d'exposition: les intoxications aiguës et chroniques.

L'exposition aux pesticides est l'un des facteurs de risque qui favorise l'augmentation du stress oxydatif en produisant des radicaux libres oxygénés. Ce risque du stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de la plupart des voies pathologiques (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003). Si la théorie reliant le stress oxydatif à l'exposition aux pesticides est correcte et si le stress oxydatif est augmenté chez les agriculteurs consommateurs de pesticides, alors on est en droit de s'attendre à une augmentation du risque d'apparition de la plupart des maladies humaines (Gamet-Payraastre, 2008).

A l'état de santé, il existe un équilibre entre les radicaux libres, spécialement les réactions d'oxydation produites et nos défenses, les antioxydants (Hamzaoui, 2009). Tout déséquilibre entraîne un état de stress oxydatif. Les radicaux libres sont des dérivés instables et toxiques de l'oxygène qui réagissent et dégradent l'ADN, les lipides et les protéines. Ils sont augmentés par certaines situations comme le stress, le tabac, l'alcoolisme, l'exercice physique mal géré, etc. Les principales sources de formation de ces radicaux libres peuvent être physiques (UV, radiations ionisantes) ou chimiques (polluants, drogues, médicaments, pesticides) ou biologiques (virus, bactéries, réaction immunologique, fuite des électrons, métabolisme).

Déterminer le statut oxydant/antioxydant d'un individu devient actuellement un sujet de priorité en terme de prévention contre l'apparition de certaines pathologies. Chez les agriculteurs utilisateurs de pesticides et les consommateurs, le stress oxydatif peut exister et être intense provoquant une altération de la santé à long terme. Néanmoins, il ressort qu'au cours de cette période, des cancers et d'autres affections du système lymphohématopoïétique chez l'adulte ont fait l'objet de plusieurs

## INTRODUCTION

investigations scientifiques dont certaines ont montré une augmentation du risque pour les travailleurs les plus exposés (Cancers professionnels).

Plusieurs auteurs ont utilisé des modèles animaux afin de déterminer les effets toxiques des pesticides, et l'évolution de ces modèles expérimentaux contribue à réduire l'incertitude en analyse de risque relative aux faibles doses de pesticides, tant pour les travailleurs que pour la population générale.

Marinowic *et al.* (2012) ont testé l'effet d'un insecticide le  $\beta$ -cyfluthine sur une lignée de poisson *Bryconamericus iheringii* (Characidae) qui a conduit à des dommages au niveau de l'ADN (génétoxicité). Une autre étude menée sur l'effet du bendiocarbe chez les lapins montre une diminution du volume des testicules avec une diminution des spermatozoïdes suite à l'exposition (Krockova *et al.*, 2012).

Seo *et al.* (2012) a testé l'effet du Trichloroéthylène (TCE) et le Perchloroéthylène (PCE) dans l'eau de boisson des souris de type (ICR) pendant 2 à 4 semaines, entraînant des réactions allergiques de type I. L'application répétée de la Warfarine chez les rats a entraîné des lésions tissulaires avec augmentation du Malondialdéhyde et modifications de l'épiderme (Popov *et al.*, 2011). Stepnik *et al.* (2005) a montré une immunotoxicité chez les souris qui ont reçu de l'Arséniate dans l'eau de boisson.

A coté de toutes ces altérations métaboliques, le système immunitaire constitue la cible primordiale pour de nombreux pesticides. On distingue deux phénomènes particuliers : L'immunosuppression ou la diminution des réponses immunitaires favorise la susceptibilité aux infections et/ou le développement de certains cancers, et plus particulièrement ceux qui sont associés aux activités agricoles (LNH, leucémies, myélome multiple, mélanomes, cancer de l'estomac, des lèvres, du cerveau) (Rakitsky *et al.*, 2000; McCarrol *et al.*, 2002). Le second phénomène est l'immunopotentialisation qui provoque une augmentation excessive des réponses immunitaires responsables de crises d'allergie, d'asthme, de rhinites, d'anaphylaxie, et qui est observé chez les ouvriers ou personnes exposées aux pesticides.

Divers systèmes expérimentaux ont servi à élucider les mécanismes d'action des pesticides, mais depuis quelque temps l'expérimentation toxicologique et les études de toxicités diverses dépendent de plus en plus des modèles cellulaires.

Les caractéristiques cellulaires des lymphocytes fournissent des avantages uniques pour l'exécution de tout plan expérimental et l'interprétation des résultats. Plusieurs études récentes ont utilisé les lymphocytes pour trouver le lien entre les pesticides et les dommages détectés au niveau de l'ADN (la génétoxicité) (Mosesso *et al.*, 2012). Une autre étude de Shelley *et al.* (2012) a élucidé l'effet direct de différentes concentrations d'Atrazine sur la viabilité des lymphocytes et leur rôle immunosuppresseur sur la prolifération lymphocytaire. Katika *et al.* (2012) a vérifié l'effet



## INTRODUCTION

immunosuppresseur du Bis (tri-n-butyltin) oxyde (TBTO) sur les cellules Jurkat T (une lignée de lymphocytes humaine), la diminution de glutathion réduit, et l'apoptose. Ces observations mettent l'accent sur le stress oxydatif et l'immunomodulation.

Le but général de cette thèse est d'étudier les toxicités de certains pesticides couramment utilisés pour le traitement phytosanitaire des denrées alimentaires (la pomme de terre) de la région de l'ouest Algérien, le Mancozèbe (Fongicide) et la Métribuzine (Herbicide). Pour cela, les effets des pesticides sur la prolifération des lymphocytes humains et des splénocytes de rats sont déterminés in vitro. De plus, la détermination in vivo des effets des pesticides est réalisée chez le rat Wistar, animal de laboratoire choisi pour les essais toxicologiques. L'ensemble de cette étude permet de mettre en évidence le risque sanitaire lié aux résidus de pesticides. De plus, l'importance du système expérimental lymphocytaire et du modèle expérimental "rat Wistar" sont mis en relief pour la définition des perturbations du métabolisme, des paramètres du stress oxydatif et du système immunitaire in vitro et in vivo suite à l'exposition aux pesticides.



# **ETAT ACTUEL SUR LE SUJET**

## **I. Les pesticides**

### **I.1. Définition des pesticides**

Le terme "pesticides" est une appellation générique couvrant toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) qui éliminent les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole afin d'améliorer les rendements et la qualité des productions agricoles, ou bien dans d'autres applications (INRA-Cemagref, 2005).

Le vocable pesticide regroupe à la fois les produits phytopharmaceutiques destinés à un usage agricole et les biocides anciennement dénommés « pesticides à usage non agricole ».

La réglementation européenne et mondiale ne reconnaît pas l'appellation pesticides mais elle définit précisément les notions de "produits phytopharmaceutiques" et de "biocides" :

**Produits phytopharmaceutiques (PPP)** (au sens de la Directive 91/414/CE) qui les définit comme étant : les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentes sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et destinées à :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action ;
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance) ;
- assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que les substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs ;
- détruire les végétaux indésirables, ou ;
- détruire des parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

**Les biocides** (au sens de la directive 98/8/CE) : les produits dénommés anciennement « pesticides à usage non agricole » sont maintenant appelés « produits biocides ». Ils concernent les substances actives et des préparations contenant une ou plusieurs substances actives destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique. Les biocides sont destinés à des usages domestiques, par exemple dans des applications comme la protection du bois contre les champignons ou les termites, les insecticides ménagers, les produits antiparasitaires (anti-acariens, antipuces), etc. (INRA-Cemagref, 2005).

Leur immense succès dans les applications agricoles afin d'optimiser la productivité des denrées a entraîné une étendue rapide de leur production et utilisation. Mais, vu leurs propriétés toxicologiques, ubiquité, persistance, présence et concentration dans la chaîne alimentaire, ils constituent un véritable danger, et sont actuellement considérés parmi les principaux polluants environnementaux, à l'origine de résidus toxiques dans l'air, le sol et l'eau (Urban et Cook, 1986;

Baril *et al.*, 2005). Leur utilisation massive dans les secteurs agricoles, industriels et médicaux constitue donc une réelle menace mondiale. L'intérêt public croissant à propos des risques liés à leur utilisation a généré un support pour le développement de méthodes alternatives non chimiques, la recherche continue de nouvelles méthodes analytiques pour contrôler les résidus (Takino *et al.*, 2004), et la mise en place de strictes réglementations (FAO/OMS, 2004).

Ceci s'est traduit par une restriction de l'homologation de nouvelles substances, une interdiction de certaines molécules très rémanentes comme les pesticides organochlorés, et le respect des Bonnes Pratiques Agricoles (BPA) pour leur application (FAO/OMS, 2004). Toutefois, et malgré les efforts déployés dans tous les sens et les solutions établies et mises en œuvre, les résidus toxiques et les mélanges multirésidus très dangereux persistent toujours dans les denrées alimentaires et l'environnement (Akiyama *et al.*, 2005; Aulakh *et al.*, 2006). Or, l'utilisation intensive de ces produits dépend d'une stratégie de production et commercialisation des denrées alimentaires et leur bénéfice vis-à-vis de la qualité et la quantité des denrées disponibles au consommateur est évident. Pour les pays en voie de développement, en l'absence de ces moyens efficaces de lutte, la diminution de la protection alimentaire pourrait être dramatique (Geahchan et Daou, 1995).

Par conséquent, et face à cette dualité bénéfice-risque, la protection de la santé humaine contre l'exposition aux pesticides demeure une préoccupation majeure, et le problème de résidus toxiques reste d'actualité.

## **I.2. Classification des pesticides**

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe. 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 qui les compose. L'index de l'ACTA qui référence les principaux produits autorisés et commercialisés mentionnait 489 substances actives en 2005 et 2600 préparations commerciales. De plus, les variétés et les quantités utilisées diffèrent selon les pays où ils sont utilisés. Néanmoins, les systèmes de classification sont universels.

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées: les herbicides, les fongicides et les insecticides. À celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématicides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides (contre les taupes), les molluscicides (contre les limaces et les escargots essentiellement), les corvicides et les corvifuges (contre les oiseaux ravageurs de culture et surtout

les corbeaux) et enfin les répulsifs. Le Tableau 1 montre les principales familles des insecticides, herbicides et des fongicides (El bakouri, 2006).

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires. Les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes, les triazines et les urées substituées. Les structures chimiques caractéristiques de certaines de ces familles sont présentées dans la Figure 1 (Raoul *et al.*, 2005).

Ce deuxième système de classification ne permet pas de définir de manière systématique un composé. Certains pesticides peuvent en effet être composés de plusieurs familles chimiques.

### **I.3. Résidus et indices toxicologiques**

Selon le Codex Alimentarius (FAO/OMS, 2004), un résidu de pesticide est toute substance (dérivé, métabolite, impureté...) présente dans les aliments, les produits agricoles ou les aliments pour animaux par suite de l'utilisation d'un pesticide.

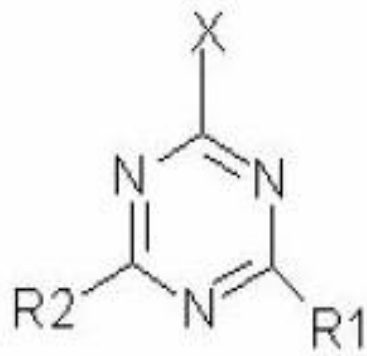
Les résidus de pesticides sont le souci permanent de la communauté scientifique et des organisations de santé publique à travers le monde. La surveillance des résidus de pesticide est un outil clé pour assurer la conformité avec la réglementation et contrôler le respect des Bonnes Pratiques Agricoles (Picó *et al.*, 2004). Un Résidu toxique signifie évidemment tout résidu pouvant avoir une importance sur le plan toxicologique dans la marge des doses résiduelles ; il n'y a pas de composé toxique mais plutôt des doses toxiques (Abhauer, 1990). Pour cela, de nombreuses méthodes hautement sophistiquées ont été mises au point pour détecter, identifier et mesurer les multirésidus contaminant des matrices de différentes natures (Baril *et al.*, 2005).

Le contrôle est une tâche assez complexe étant donné qu'il existe actuellement plus de 8500 formulations commerciales comprenant environ 1000 matières actives, qui constituent à leur tour une source de plusieurs centaines de produits de dégradation. Les procédures classiques habituellement appliquées, consistent essentiellement en un prétraitement tel que l'extraction par un solvant organique, ensuite la purification par les colonnes chromatographiques, suivis par une analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) ou liquide (LC) couplée à différents types de détecteurs spécifiques pour les différentes propriétés physicochimiques des molécules : par capture d'électron (ECD), pour l'azote et le phosphore (NPD) et par spectrométrie de masse (MS) ou autres (Trösken *et al.*, 2005).

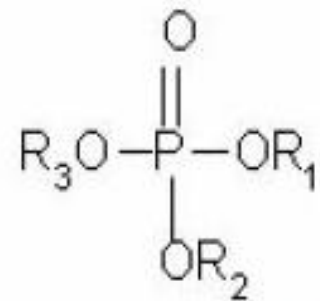
Les différentes méthodes utilisées ont souvent reporté la présence de résidus, parfois à des niveaux alarmants mais le plus souvent inférieurs aux normes. Toutefois, l'étude des résidus constitue une partie intégrante du processus d'évaluation du risque, permettant d'explicitier la probabilité continue

**Tableau 1** : Principales familles d'insecticides, de fongicides et d'herbicides (El bakouri, 2006)

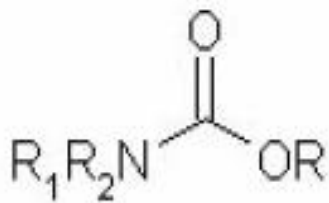
Insecticides	Herbicides	Fongicides
	Minéraux	
Composés arsenicaux Soufre Composés fluorés Dérivés de mercure Dérivés de sélénium Composés à base de silice Quartz, magnésie Huiles de pétrole	Sels de NH <sub>4</sub> , de Ca, de Fe de Mg, K, Na Sous forme de sulfates, de nitrates Chlorures, chlorates,...	Sels de Cuivre A base de soufre Composés arsenicaux Huiles minérales
Organiques		
Organochlorés Organophosphorés Carbamates	Phytohormones Dérivés de l'urée Carbamates Triazines et Diazines Dérivés de pyrimidines Dérivés des dicarboximides Dérivés de l'oxyquinoleine Dérivés des thiadiazines et Thiadiazoles	Carbamates et Dithiocarbamates Dérivés du benzène Dérivés des quinones Amides Benzonitriles Toluidines organophosphorés
Divers		
Pyréthroïde de synthèse Produits bactériens Répulsifs	Dicamba Pichlorame Paraquat	Carboxines Chloropicrine Doguanide Formol



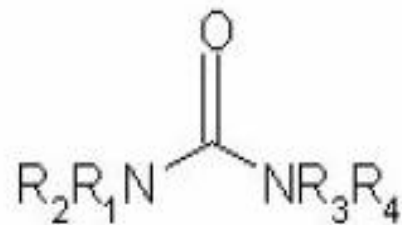
Triazines



Organophosphorés



Carbamates



Urées

**Figure 1** : Structures chimiques des principales familles de pesticides (Raoul *et al.*, 2005 ).

d'exposition et d'assurer que les doses journalières admises ne soient pas dépassées (Abhauer, 1990). La dose journalière ingérée d'un certain pesticide étant obtenue en multipliant le niveau de résidus de ce pesticide trouvé dans la denrée considérée, par la quantité journalière consommée de cette dernière ; et en additionnant avec toutes les valeurs ainsi obtenues pour ce pesticide dans les autres denrées (FAO/OMS, 2004). En outre, l'information apportée par le dosage des résidus, à part l'évaluation directe de l'exposition humaine, fournit une estimation de l'ampleur du risque sanitaire en général (Blasco *et al.*, 2002).

### **I.3.1. Limite maximale de résidus (LMR)**

Les LMR de pesticides correspondent aux quantités maximales attendues, établies à partir des bonnes pratiques agricoles (BPA) fixées lors de l'autorisation de mise sur le marché du produit phytosanitaire. Elles reflètent l'utilisation des quantités minimales nécessaires pour protéger efficacement les cultures et qui aboutissent à des niveaux de résidus acceptables, c'est-à-dire sans effet sur la santé. Donc, c'est la concentration en résidus la plus élevée légalement acceptable pour que les denrées alimentaires restent commercialisables. Les LMR s'expriment en milligramme de résidus par kilogramme de produit alimentaire (Cluzeau *et al.*, 2000). Quand les pesticides sont appliqués suivant les BPA, les LMR ne sont en général pas dépassées. Au contraire, des écarts aux BPA peuvent entraîner la présence de résidus nocifs entraînant des risques sanitaires.

### **I.3.2. Dose journalière admise (DJA)**

C'est la quantité d'une substance pouvant être quotidiennement consommée au cours d'une vie entière sans présenter le moindre risque ou effet secondaire (Cluzeau *et al.*, 2000).

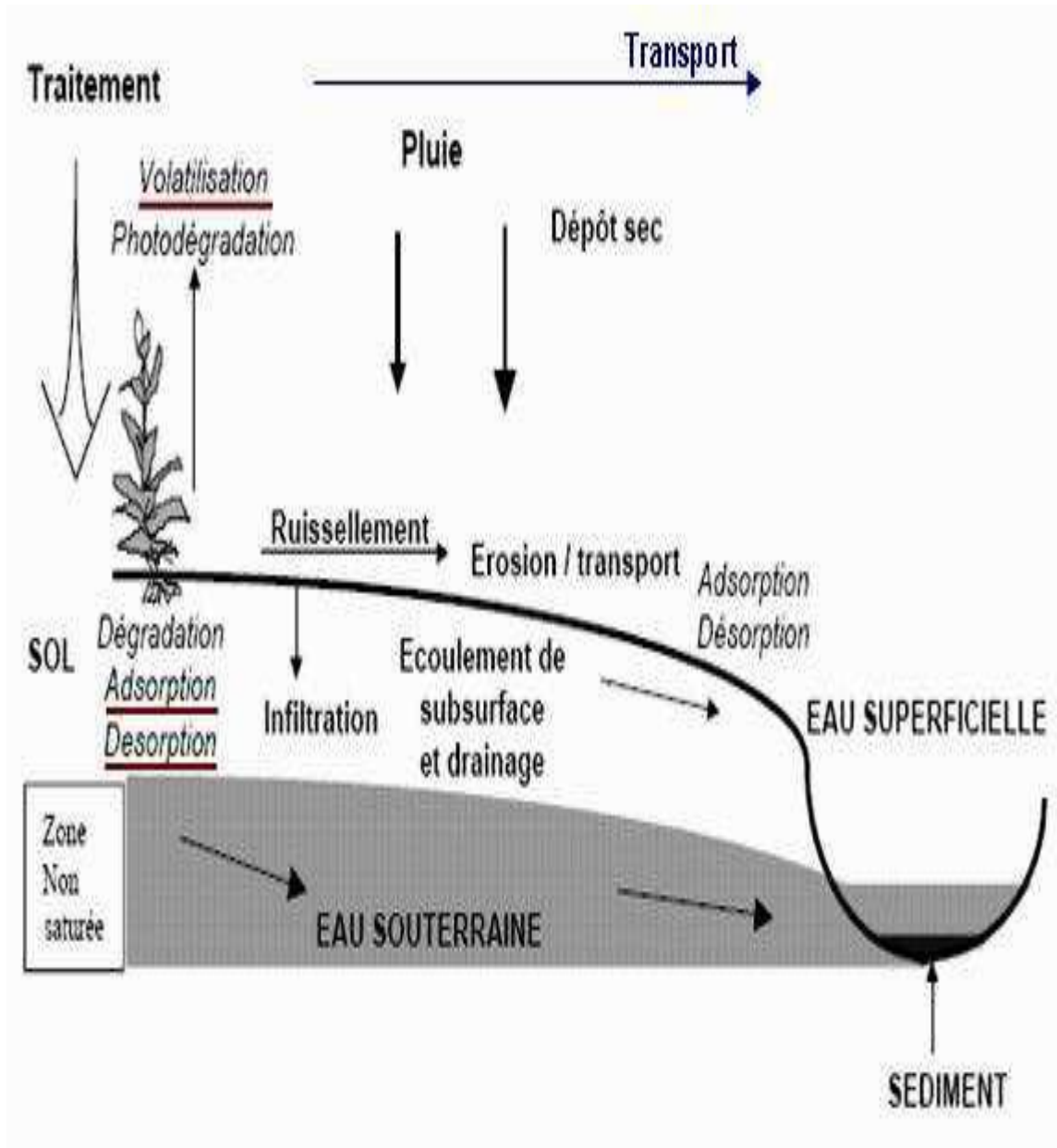
Elle est déterminée en divisant la dose sans effet (DSE) de l'animal le plus sensible par 100, la dose sans effet étant déduite d'après des études toxicologiques menées à long terme sur les animaux. Elle s'exprime en milligramme (ou microgramme) de résidus par kilogramme de poids corporel. Ce facteur de sécurité est augmenté si la substance a un effet toxique irréversible (500 pour des néphrotoxiques, 5000 pour des cancérogènes) (Derache, 1986).

## **I.4. Devenir des pesticides dans l'environnement**

Les pesticides ont été depuis près d'une cinquantaine d'années mis en évidence dans tous les compartiments environnementaux qui n'ont subi aucun traitement. Ils ont été retrouvés dans les eaux de rivières, les nappes phréatiques, l'air, les eaux de pluie, mais aussi dans les fruits, les légumes, les céréales et les produits d'origine animale (Pimentel, 1995).

Ils peuvent alors être soumis à différents processus (Figure 2) (INERIS, 2005) :





**Figure 2** : Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement (INERIS, 2005).

## ETAT ACTUEL SUR LE SUJET

- le transfert d'application des pesticides aux sols et aux récoltes croissantes,
- la lixiviation des pesticides principalement dans les eaux souterraines (Van Der Werf, 1996),
- la photo-dégradation (Marcheterre *et al.*, 1988),
- la dégradation par le phénomène d'hydrolyse aqueuse (Colin, 2000) ou de biodégradation grâce aux micro-organismes présents dans le sol (Wolfe *et al.*, 1990),
- la dérive des pesticides provenant d'un champ adjacent,
- le transport des pesticides dans les cours d'eau, les fleuves et les lacs,
- les effluents d'industrie de pesticides rejetés dans les fleuves, les cours d'eau et absorbés par les sols et qui peuvent être transférés aux récoltes (Paterson *et al.*, 1990).

Généralement, les pertes des produits phytosanitaires par les processus physiques sont souvent les plus importantes. Parmi eux, il arrive que la volatilisation soit le processus dominant le contrôle de la dispersion de certains produits phytosanitaires dans l'environnement (Paterson *et al.*, 1990), ainsi que leur durée de vie réelle dans la zone de traitement. Les pertes par volatilisation peuvent atteindre 80 à 90% de la quantité appliquée (Van Der Werf, 1996).

Dans le cas spécifique de traitements en serre, des concentrations élevées ont pu être observées juste après l'application, ces concentrations peuvent rester à un niveau significatif pendant plusieurs jours après le traitement (INERIS, 2005 ; Raoul *et al.*, 2005).

Cette contamination peut aussi atteindre l'air intérieur non seulement suite à leur application ou leur stockage dans les logements mais également du fait du transport des produits utilisés à l'extérieur (agriculture, jardins, parcs) par l'intermédiaire des chaussures, des vêtements, des animaux domestiques ou par l'air.

Une campagne de mesure a évalué l'exposition des enfants à certains pesticides présents dans l'environnement intérieur (INERIS, 2005). L'étude a été menée sur 130 enfants âgés de 6 et 7 ans et répartis en Ile-de-France. Des multiples prélèvements ont été effectués (air, poussières sur les sols du domicile, des résidus cutanés et des recueils d'urines) et les mesures ont porté sur 31 composés actifs parmi lesquels des insecticides, herbicides ou fongicides sélectionnés en fonction de leur utilisation, de leur toxicité et de leur rémanence. Les résultats ont montré qu'au moins un produit de type pesticide était présent dans 94% des foyers, en premier lieu des insecticides (93% des cas), notamment des pyréthriinoïdes et des organophosphorés, suivis par des fongicides pour plantes (30% des cas) et des herbicides (32% des cas). Parmi les pesticides les plus fréquemment retrouvés dans l'air figure le lindane (dans 88% des logements), un insecticide neurotoxique, bien qu'interdit de tout usage en France (Bouvier *et al.*, 2006).

#### **I.4.1. Contamination des eaux**

Une des conséquences environnementales majeures de l'agriculture intensive actuelle est la dégradation de la qualité des eaux. Cette dégradation se traduit, pour les eaux de surface comme pour les eaux souterraines, par une pollution liée à la dissémination des intrants agricoles que sont les produits phytosanitaires, les engrais minéraux azotés et phosphatés ou encore les effluents d'élevage. Les pesticides peuvent facilement pénétrer dans le sol et les sources d'eau.

Ces molécules peuvent être soumises à des réactions d'hydrolyse ou d'oxydo-réduction qui sont fonction de leur persistance. Les produits très peu soluble dans l'eau ou qui se trouvent en suspension, résistent beaucoup plus aux phénomènes de dégradation en milieu aqueux. Le Tableau 2 montre la persistance dans l'eau de 10 catégories de pesticides (El bakouri, 2006).

Par ailleurs, dans certaines régions, une part significative de la contamination des eaux peut parfois provenir du dépôt de substances transportées par voie aérienne ou beaucoup plus fréquemment découler d'usages autres qu'agricoles, qu'il s'agisse du désherbage des infrastructures de transport ou industrielles, des parcs et jardins ou bien d'utilisations domestiques (Revitt *et al.*, 2002; Blanchoud *et al.*, 2004).

#### **I.4.2. Contamination des sols**

La contamination des sols par différentes substances, dont les pesticides, a été reconnue comme l'une des principales menaces qui pèsent sur les sols. Ces derniers peuvent provenir des activités agricoles ; mais également des activités d'entretien des espaces verts et jardins ou de désherbage des réseaux routiers et ferrés. La vitesse d'infiltration des pesticides dans le sol dépend du sol (humidité, taux de matière organique, pH) et du pesticide (CEC, 2002).

Il est connu que les insecticides organochlorés sont assez persistants dans l'environnement et certains, bien qu'interdits d'usage peuvent rester présents dans le sol pendant plusieurs années (lindane, alpha-HCH). A l'heure actuelle les insecticides utilisés (organophosphorés, pyréthrinoïdes, carbamates et autres) se dégradent rapidement, par contre les herbicides sont assez persistants dans les sols et leurs produits de dégradation sont souvent stables.

La pollution chronique par certaines substances minérales persistantes (cuivre dans les fongicides employés en viticulture) et l'existence éventuelle de "résidus liés" (non extractibles par les méthodes classiques d'analyse) pose la question du risque environnemental à long terme, notamment dans le cas d'une réallocation des terres agricoles à d'autres usages (Chaignon *et al.*, 2003). Ce risque est illustré par le cas du chlordécone, utilisé de 1972 à 1993 en Guadeloupe et Martinique pour la lutte contre le charançon de la banane; resté stocké dans les sols, il pollue depuis plusieurs années les eaux et peut contaminer les productions dans certaines zones (INRA-Cemagref, 2005). D'autres

**Tableau 2 :** Persistance de certains pesticides dans l'eau (El bakouri, 2006)

Famille des pesticides	persistance
Organochlorés	2 à 5 ans
Dérivés de l'urée	4 à 10 mois
Triazines	3 à 18 mois
Acides benzoïques	3 à 12 mois
Amides	2 à 10 mois
Toluidines	6 mois
Nitriles	4 mois
Carbamates	2 à 8 semaines
Acides aliphatiques	3 à 10 semaines
Organophosphorés	7 à 84 jours

sources de contamination des sols proviennent des industries produisant et/ou procédant au stockage des substances phytosanitaires.

## **II. Modes d'exposition de l'homme aux pesticides et effets sur la Santé**

Les crises sanitaires récentes obligent à mieux comprendre et articuler les liens entre agriculture, environnement et santé publique. Le risque des pesticides pour l'homme se situe à l'interface de ces trois domaines. Il s'agit d'un risque global intégratif, qui naît du cumul des expositions auquel est soumis un être vivant.

Les voies dermique, respiratoire (pour les utilisateurs directs de produits phytosanitaires par exemple) et orale peuvent être sollicitées. Il concerne à la fois les professionnels et le grand public. Des problèmes de résidus dans les légumes, les fruits, etc., sont aussi mis en évidence car les aliments constituent une voie majeure d'exposition en raison de leurs niveaux plus élevés de contamination (E.N.S.P, 2000). La Figure 3 résume les modes d'exposition possibles de l'environnement et de l'homme aux pesticides (CPP, 2002).

### **II.1. Mesure de l'exposition**

La diversité des produits et des pratiques et l'évolution des matières actives entraînent des difficultés méthodologiques considérables qui limitent l'estimation de l'exposition aux pesticides. Par ailleurs, la mesure des expositions peut être influencée par les situations exceptionnelles, voire accidentelles. Il est difficile de dissocier les effets propres à chaque substance active. Les produits sont souvent utilisés en mélange et les formulations peuvent aussi contenir d'autres produits toxiques (adjuvants ou autres formulant) (Zeljezic *et al.*, 2006).

Certains outils permettant d'estimer les expositions aux pesticides ont été décrits :

- des outils biologiques tels que le dosage direct des pesticides ou de leurs métabolites dans les compartiments biologiques (e.g, urines), ou la recherche d'effets précoces (génotoxicité).
- des modèles prédictifs, surtout appliqués aux professionnels, prenant en compte les méthodes d'application, les moyens de protection, ...
- la reconstitution des expositions anciennes au moyen de matrices activités-expositions construites idéalement par type de culture et par région.

### **II.2. Exposition professionnelle**

Le risque professionnel semble plus accru que le risque moyen lié à l'alimentation. Les exploitants agricoles s'exposent relativement plus en manipulant des produits avant, pendant et après traitement

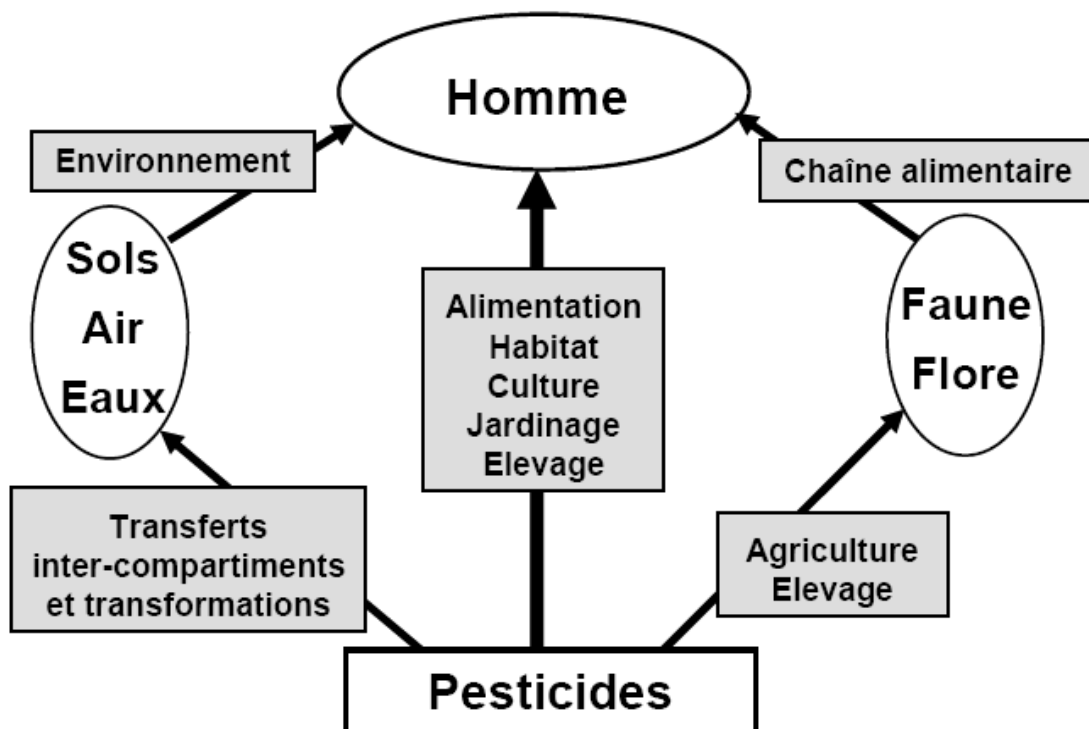


Figure 3 : Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (CPP, 2002).

et s'exposent potentiellement plus aux pesticides que via l'alimentation uniquement (Allot *et al.*, 2004).

De plus, l'exposition professionnelle aux pesticides des agriculteurs est très variable et complexe selon les exploitations agricoles. Elle est le plus souvent saisonnière et correspond à une succession de journées d'utilisation de produits chimiquement différents au cours de la saison et souvent également au cours d'une même journée (CPP, 2002).

La reconstitution de l'exposition est également compliquée par l'évolution des pratiques agricoles au cours du temps. En général, l'exposition est essentiellement cutanée, à moindre mesure aérienne et secondairement orale (repas, tabac,... sur le lieu de travail).

L'absorption des pesticides par la peau est révélée comme la voie d'exposition la plus significative en milieu agricole (Jakubowski et Trzcinka-Ochocka, 2005).

Par ailleurs, bien que les équipements de protection individuelle (gants, masques, combinaisons) constituent les principales mesures de prévention mises en œuvre afin de réduire l'exposition des professionnels, Baldi *et al.* (2006) ont mené une étude nommée PESTEXPO visant à caractériser l'exposition et la contamination réelle des viticulteurs par des produits phytosanitaires (des fongicides dithiocarbamates), et ils ont montré l'insuffisance de l'efficacité de ces équipements, car le port d'une combinaison de protection n'évitait pas totalement la contamination cutanée des opérateurs. Par contre, la contamination orale était relativement très faible. Cette problématique permet d'une part de constater que des efforts sont encore à faire pour améliorer les mesures de prévention au milieu professionnel et d'autre part de montrer l'importance de la voie cutanée comme voie d'exposition critique au niveau professionnel (Jakubowski et Trzcinka-Ochocka, 2005). Les mauvaises pratiques agricoles peuvent donc accentuer les risques aigus et accroître les effets chroniques dus à l'exposition aux pesticides.

### **II.3. Exposition non professionnelle**

Peu d'études ont évalué l'exposition de la population non professionnelle aux pesticides. Pour le grand public, divers facteurs viennent contribuer à l'exposition générale aux pesticides : proximité d'une zone de traitement, usage domestique mal maîtrisé (traitements insecticides dans les maisons par exemple), mauvaises pratiques de jardinage (exposition lors du traitement et via l'autoconsommation) et l'ingestion de pesticides via l'alimentation.

La consommation alimentaire de pesticides se fait via l'eau, les produits animaux (lait, viande, poisson, etc.) ou végétaux et peut être aigue ou chronique. La connaissance précise du risque "pesticides" global pour le grand public nécessite de renseigner indépendamment les

différentes solutions d'exposition. Les expositions sont multiples car chaque facteur agit sur l'intensité du risque et les facteurs peuvent se combiner entre eux (CPP, 2002). Selon l'OMS (2004), la principale source d'exposition pour les non professionnels est l'alimentation. D'après les évaluations, l'alimentation contribuerait à 80 % de l'exposition contre 10 % pour l'eau (OMS, 2004).

#### **II.4. Exposition des enfants**

Les enfants semblent être plus vulnérables aux pesticides que les adultes. Leur comportement et leur système en développement font en sorte qu'ils sont plus exposés et plus sensibles aux effets potentiels des pesticides (Chen *et al.*, 2003).

L'exposition de l'enfant aux pesticides peut avoir lieu très tôt, *in utero* via le placenta suite à l'exposition de la mère (Saunders *et al.*, 2004), mais également après la naissance, soit directement par exposition aux contaminations domestiques (pesticides utilisés dans la maison ou le jardin ou habiter dans une zone agricole) ou via le lait maternel et l'alimentation (CEC, 2002; Jurewicz *et al.*, 2006), soit indirectement pour les enfants de parents professionnellement exposés (e.g, agriculteurs). Il est à noter que l'alimentation est une source d'exposition majeure des enfants aux pesticides organophosphorés (Lu *et al.*, 2008). Quant aux pesticides organochlorés, ils seront essentiellement transmis via le lait maternel (Campoy *et al.*, 2001). En effet, selon une étude réalisée en Allemagne, les concentrations de composés organochlorés (dont le DDT) sont très significativement supérieures ( $p < 0,0001$ ) dans les sérums de nouveau-nés allaités par rapport à ceux recevant du lait commercial (Lackmann *et al.*, 2004).

#### **II.5. Effets des pesticides sur la santé chez l'homme**

Les années 60 marquent le début de l'évolution de la toxicologie par l'interdiction de certains pesticides qui ont été largement utilisés après la mise en évidence de leurs propriétés particulièrement dangereuses (ex : DDT, Lindane). Les risques pour la santé humaine en cas d'exposition aigue à des doses élevées de pesticides sont connus de longue date et ont conduit à la publication de recommandations aux utilisateurs de manière à éviter ces risques (Tellier *et al.*, 2006).

Les effets liés à une intoxication aigue se produisent généralement tout de suite ou peu de temps après une exposition significative à des pesticides. Les malaises généraux peuvent être légers (maux de tête, nausées, et alourdissements, fatigue, perte d'appétit, irritations de la peau et des yeux) ou graves (fatigue chronique, coma, mort). Les symptômes varient selon les types de pesticides en cause (Tellier *et al.*, 2006).



La toxicité chronique est, quant à elle, nettement moins bien connue et beaucoup plus difficile à mettre en évidence. Elle peut être associée à une absorption de faibles quantités de pesticides présents dans différents milieux sur une longue période de temps. Les substances ingérées ne sont pas éliminées, mais sont accumulées dans l'organisme jusqu'à une dose seuil à partir de laquelle vont apparaître les troubles.

De nombreuses études scientifiques indiquent, malgré quelques réserves, que l'exposition chronique aux pesticides est susceptible d'augmenter l'indice de dérèglement des systèmes reproducteur, endocrinien, immunitaire et nerveux. Certains pesticides peuvent également induire des effets tératogènes ou cancérigènes (Hileman, 1995 ; Bassil *et al.*, 2007). Le Tableau 3 montre les effets de quelques pesticides sur la santé humaine.

### **II.5.1. Effets cancérigènes**

Dans plusieurs études épidémiologiques, une association significative entre l'utilisation des pesticides et activités agricoles a été retrouvée pour certaines localisations tumorales telles que les cancers des lèvres, du cerveau, de l'estomac, de la prostate, des reins mais également la plupart des cancers du système hématopoïétique (leucémie, myélomes multiples et surtout les lymphomes non hodgkiniens) (Repetto et Baliga, 1996).

En Suède, une enquête conduite auprès de 54 hommes atteints de leucémie à tricholeucocytes suggère que cette maladie pourrait être en corrélation avec une exposition à des pesticides immunotoxiques de la famille des organochlorés (Nordstrom *et al.*, 2000).

Les cancers et autres affections du système lymphohématopoïétique chez l'adulte ont montré une augmentation du risque pour les travailleurs les plus exposés (Freeman *et al.*, 2005; Strom *et al.*, 2005). Le mélanome cutané, les sarcomes des tissus mous et le cancer du poumon sont aussi fréquents (Freeman *et al.*, 2005).

D'autre part, des études de corrélations géographiques (ou écologiques) ont suggéré des associations entre l'exposition environnementale (habitations dans des zones polluées ou agricoles) et l'augmentation du risque de mortalité par cancer (tumeurs cérébrales, tumeurs du système hématopoïétique et de la vessie) (Viel *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2008b). De plus, il a été suggéré que certains cancers (le cancer des seins) pourraient être liés à l'exposition à certaines familles de pesticides (les organochlorés, en particulier le DDT) (Romieu *et al.*, 2000).

Dans une revue de la littérature portant sur l'association entre l'exposition chronique aux pesticides et le cancer, Bassil *et al.* ont observé qu'il existe une association positive significative entre l'augmentation du risque des leucémies, des lymphomes hodgkiniens et de certaines tumeurs

**Tableau 3 : Pesticides et Cancer chez l'adulte**

Type d'affection	Nature de l'affection
<b>Lymphome Non Hodgkinien (LNE)</b> (groupe de cancer qui prennent naissance dans les cellules du système lymphatique)	Corrélations entre des herbicides spécifiques (2,4-D) et l'apparition de LNH (Morison <i>et al.</i> , 1992).
<b>Myélome multiple (M.M)</b> (prolifération tumorale monoclonale plasmocytaire localisée essentiellement au niveau de la moelle osseuse)	Jusqu'à 5 fois plus de risque de contracter un M.M chez les utilisateurs d'herbicides (Viel et Richardson, 1993).
<b>Leucémie (Cancer du sang)</b>	Corrélation entre l'utilisation des herbicides 2,4-D et atrazine et la leucémie chez les hommes d'origine hispanique (Mills, 1998).
<b>Sarcome des tissus mous (STM)</b>	Le développement de S T M est fréquemment lié dans la littérature scientifique à l'exposition aux herbicides phenoxy (Kogevinas <i>et al.</i> , 1995).
<b>Tumeurs du cerveau</b>	La mortalité par cancer du cerveau et l'exposition aux pesticides utilisés dans les vignes sont statistiquement liées (Viel <i>et al.</i> , 1998).
<b>Cancers gastro-intestinaux</b>	L'exposition aux pesticides organochlorés est liée à une variété de cancers gastro-intestinaux. Les professionnels exposés au DDT ont jusqu'à 7 fois plus de risque de développer un cancer du pancreas (Garabrant <i>et al.</i> , 1992).
<b>Cancer de l'appareil urinaire</b>	Le fait d'être exposé aux pesticides agricoles a été corrélé avec un risque accru de cancer du rein (Forastriere <i>et al.</i> , 1993).
<b>Cancer des testicules</b>	Les enfants dont les parents ont une activité agricole ont une plus forte proportion de cancers des testicules. Les affections peuvent apparaître chez l'enfant ou le jeune adulte (Kristensen <i>et al.</i> , 1996).
<b>Cancer de la prostate</b>	Corrélation entre l'exposition aux pesticides et le cancer de la prostate (Van Der Gulden et Vogelzang, 1996).
<b>Cancer de la thyroïde</b>	Une région du Minnesota où sont largement utilisés les fongicides du type Manebe et Mancozèbe a un taux de cancer de la thyroïde trois fois supérieur à la normale ( Schreinemachers <i>et al.</i> , 1999).

## ETAT ACTUEL SUR LE SUJET

solides en particulier les cancers du cerveau et de la prostate et l'exposition chronique (professionnelle ou domestique) aux pesticides (Bassil *et al.*, 2007).

Les cancers sont, après les accidents, la deuxième cause de décès chez les enfants âgés de 1 à 14 ans (Nasterlack, 2007). Les plus fréquents sont les leucémies, suivies par les tumeurs cérébrales puis les lymphomes.

Actuellement, les scientifiques estiment que les facteurs génétiques seraient responsables de 10 % au maximum des cancers infantiles et que 70 à 80 % seraient induits par des substances chimiques (Nasterlack, 2007).

Bien que les résultats de la plupart des études disponibles tendent vers une association positive entre l'exposition aux pesticides et l'apparition de cancers chez l'enfant, cette relation semble pour certains confuse et non fiable (Infante-Rivard et Weichenthal, 2007).

C'est aussi l'exposition et l'usage des parents des pesticides agricoles ou ménagers qui a fait l'objet des premières recherches scientifiques qui prospectent une association éventuelle entre divers cancers infantiles et l'exposition des parents (Smith *et al.*, 2005; Rudant *et al.*, 2007).

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées dans ce domaine. Il a été montré que l'incidence des cancers cérébraux était augmentée chez les enfants suite à l'exposition professionnelle des parents (Michaelis *et al.*, 1996) ; en particulier, l'exposition du père (Feychting *et al.*, 2001), mais également celle de la mère pendant la grossesse (Efird *et al.*, 2003). De plus, l'exposition professionnelle des parents a été associée à des cancers hématopoïétiques chez les enfants (Smith *et al.*, 2005; Rudant *et al.*, 2007).

D'autre part, il a été montré que le fait d'habiter dans une zone agricole pourrait augmenter l'incidence des leucémies de l'enfant (Reynolds *et al.*, 2002).

L'utilisation domestique des pesticides a également été associée à certains cancers de l'enfant comme par exemple des tumeurs cérébrales (Pogoda et Preston-Martin, 1997) et des cancers hématopoïétiques tels que des leucémies (Ma *et al.*, 2002). D'autres études confirment que l'usage, par la mère avant et après la naissance d'insecticides et d'herbicides dans la maison et le jardin augmente le risque de leucémie et des lymphomes non hodgkiniens (Meinert *et al.*, 2000; Rudant *et al.*, 2007). D'autres relations positives, moins significatives statistiquement, ont été observées entre l'exposition aux pesticides et l'apparition de cancers de l'enfant comme par exemple des rétinoblastomes et des cancers des tissus mous (Flower *et al.*, 2004) ou des os (le sarcome d'Ewing) (Valery *et al.*, 2002), des cancers rénaux (Pearce et Parker, 2000), testiculaires (Rodvall *et al.*, 2003) et des cancers de cellules germinales (Chen *et al.*, 2005). Certaines études n'ont pas permis de relier entre l'exposition des enfants aux pesticides et le développement de cancers, comme par exemple des cancers du cerveau et des leucémies (Heacock *et al.*, 2000; Feychting *et al.*, 2001).

Les résultats de ces études ne sont pas tous concluants, car certains scientifiques mettent en évidence l'intervention d'une multiplicité de facteurs environnementaux et génétiques, et non seulement l'exposition aux pesticides pour l'apparition du cancer chez les enfants et qui vient compliquer l'analyse rendant la relation cause-effet très difficile à établir (Infante-Rivard et Weichenthal, 2007; Nasterlack, 2007). Mais ils sont, dans leur ensemble, interpellant et, pour de nombreux scientifiques, le rôle des pesticides est hautement plausible dans le développement de cancers chez le jeune enfant.

### **II.5.2. Effets neurologiques**

Les effets neurologiques d'intoxications aiguës survenant à doses importantes chez les utilisateurs (surtout les agriculteurs) par certains pesticides sont aujourd'hui bien connus. Les organophosphorés, carbamates, organochlorés, pyréthrinoides, herbicides, fongicides et fumigants sont capables d'induire des paresthésies et des convulsions à des doses massives. Les dérivés de l'urée sont associés à différentes altérations tels que des troubles neurologiques centraux et une polyneuropathie. Les anciens organochlorés (comme le DDT) peuvent entraîner des convulsions épileptiformes. Il existe pour certains des arguments toxicologiques bien établis comme le cas des organophosphorés et inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (Kamel et Hoppin, 2004).

Compte tenu de la possibilité d'effets chroniques pour des expositions modérées, il apparaît intéressant d'étudier l'existence de symptômes neurologiques dans les populations agricoles, et des troubles neurocomportementaux et neurodégénératifs (Baldi *et al.*, 2001; Baldi *et al.*, 2003b). L'Agricultural Health Study offre une telle opportunité tel que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, mais également des troubles du système nerveux périphérique (troubles neuromoteurs et neurosensoriels) (Baldi *et al.*, 2003a; Cole *et al.*, 1998). Une enquête épidémiologique, « Phytoneer », réalisée en Gironde (France), met en évidence que l'exposition des ouvriers viticoles aux pesticides altère leurs performances aux tests neurocomportementaux (Baldi *et al.*, 2001). De plus, plusieurs études écologiques et épidémiologiques ont montré une relation entre le risque de développer la maladie de Parkinson et l'utilisation professionnelle des pesticides (Ascherio *et al.*, 2006; Elbaz et Tranchant, 2007) avec une implication importante des herbicides et des insecticides et en particulier les organochlorés, organophosphorés et carbamates (Brown *et al.*, 2006; Hancock *et al.*, 2008). Cependant, les données concernant les pesticides à usage domestique sont moins concluantes et contradictoires (Firestone *et al.*, 2005).

Une revue des études toxicologiques à long terme effectuées chez les animaux montre que les altérations neurocomportementales, cognitives, affectives et physiologiques sont associées à l'exposition à des pesticides essentiellement inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (carbamates et

organophosphorés) et uniquement aux doses pouvant provoquer une inhibition de cette enzyme (Moser, 2007).

En revanche, il existe peu d'études épidémiologiques concernant les conséquences de l'exposition aux pesticides sur le développement neuronal chez l'enfant. Néanmoins, selon certains auteurs, l'exposition in utero aux pesticides organochlorés pourrait entraîner des altérations au niveau cognitif comme des retards au niveau psychomoteur (Ribas-Fito *et al.*, 2003). D'autres études ont montré que l'exposition chronique aux pesticides serait potentiellement associée à un retard dans le développement des enfants (surtout la coordination motrice et l'effet sur la mémoire) (Keifer *et al.*, 1996).

De plus, le Chlorpyrifos a montré des effets délétères sur le développement du système cholinergique cérébral chez des enfants exposés in utero et ceci même à très faibles doses considérées sans aucun effet sur la santé (Qiao *et al.*, 2003).

### **II.5.3. Effets sur le système endocrinien et la reproduction**

Aujourd'hui, les chercheurs affirment l'hypothèse selon laquelle une exposition aux pesticides pourrait être à l'origine d'une grande variété d'effets délétères sur l'organisme tels des cancers (du sein, de la prostate et des testicules), des atteintes de la fonction reproductrice (problèmes de fertilité masculine, malformations de l'appareil génital masculin) ainsi que des effets sur le système immunitaire et sur la fonction thyroïdienne. Plusieurs pesticides, parmi lesquels des insecticides (DDT, Endosulfan, Dieldrine, Methoxychlore, Dicofol, Toxaphène), des nématicides (Aldicarbe), des herbicides (Alachlore, Atrazine, Nitrofène, 2,4D), des fongicides (Mancozèbe, Vinchlozoline) figurent sur la liste des perturbateurs endocriniens. Certaines de ces molécules sont aujourd'hui interdites mais peuvent néanmoins toujours être présentes dans notre environnement (Cravedi *et al.*, 2007).

Plusieurs études se sont intéressées aux effets des pesticides sur la reproduction, en particulier sur la fertilité masculine. Les pesticides peuvent agir au niveau de la spermatogénèse via des altérations des hormones ou des effets génotoxiques. Une étude a montré une baisse significative du nombre et de la qualité des spermatozoïdes chez des ouvriers exposés au Chlordécone, un pesticide xéno-oestrogène (Shelby *et al.*, 1996). D'autres études ont souligné l'effet des métabolites d'un fongicide, la Vinchlozoline, sur la reproduction chez les rats (Anway *et al.*, 2005). Cet effet affecte non seulement des rats exposés in utero mais également ceux des générations ultérieures. Ces effets étaient corrélés à une transmission épigénétique (Anway *et al.*, 2005). Une autre étude menée chez les rats exposés à la vinchlozoline pendant la période périnatale a montré des hypospadias, des testicules ectopiques, la formation de poches vaginales, une agénésie prostatique et un non développement des mamelons (Lintelmann *et al.*, 2003). Des propriétés anti-androgéniques

(augmentation du taux de FSH) ont également été constatées chez des professionnels formulant ce produit (INRS, 2002).

Par ailleurs, une étude réalisée auprès des agriculteurs travaillant en serre au Danemark, a montré une relation inverse entre la concentration de spermatozoïdes, d'une part, et l'intensité de l'exposition ou le nombre d'années d'activité en serre, d'autre part (Abell *et al.*, 2000). De plus, des études de type cas-témoins chez des hommes consultant pour infécondité du couple montrent que l'exposition aux pesticides constitue un facteur de risque significatif pour la qualité du sperme (Bigelow *et al.*, 1998; Oliva *et al.*, 2001).

Dans une revue de la littérature (entre 1996 et 2006), Perry conclut que si la relation entre l'exposition aux pesticides et la qualité du sperme paraît bien établie, aucune conclusion quant à un effet génotoxique des pesticides au niveau des spermatozoïdes ne peut être avancée à cause du faible nombre d'études disponibles (Perry, 2008).

Chez les enfants, la littérature disponible parle d'une puberté précoce associée à l'exposition aux organochlorés, d'une perturbation des hormones thyroïdiennes et sexuelles associée aux organophosphorés, pyréthrinoïdes ou éthylène-bis-dithiocarbamates (Colborn *et al.*, 1993). D'autres études associent des perturbations endocriniennes à des pesticides spécifiques, tels que Manèbe ou Zinèbe et un effet antithyroïdien, ou Vinchlozoline ou Procymidone ou DDT et effet anti-androgénique chez l'enfant (Damstra, 2002; Landrigan *et al.*, 2003; Garry, 2004).

Une étude indique que des modifications géniques et épigénétiques, telles que des mutations entraînant une instabilité génétique ou une suppression de l'apoptose des cellules germinales, peuvent être transmises à partir du père dans le fluide séminal et montre ainsi l'impact de l'exposition paternelle dans l'apparition des pathologies sur le développement *in utero* de l'enfant mais également de son système endocrinien et reproductif (Cordier, 2008).

#### **II.5.4. Effets sur le système immunitaire**

Les pesticides sont capables d'agir sur le système immunitaire selon différents mécanismes entraînant des pathologies immunitaires plus fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte. Cependant, les résultats des études épidémiologiques sont contradictoires. Certaines études ont montré que l'exposition chronique aux pesticides peut jouer un rôle dans le développement de certaines pathologies respiratoires comme l'asthme et la bronchite chronique (Salameh *et al.*, 2006). D'autre part, l'exposition de l'enfant aux pesticides organochlorés (en particulier DDE :Dichlorodiphényl cholorethylene, métabolite du DDT abondant dans les organismes vivants) a été associée à des altérations d'ordre immunologique, comme par exemple une augmentation des immunoglobulines IgE, et développement d'otites chroniques et d'asthmes bronchiques (Karmaus *et al.*, 2001). Ces effets ont été observés essentiellement à la suite d'une exposition *in utero* ou via le lait maternel

(Dewailly *et al.*, 2000). De plus, certaines études ont montré des perturbations de la production des cytokines (Phillips, 2000).

Une diminution significative des éosinophiles et des taux sériques d'immunoglobulines E (IgE) avec une augmentation du nombre des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes T CD4+ et T CD19+ est observées chez les viticulteurs exposés à un fongicide largement utilisé, le Mancozèbe, avec une réduction de la libération de TNF- $\alpha$ , et aucun effet n'a été observé pour les IL-4 ou d'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) ( Corsini *et al.*, 2005).

Seth *et al.* (2005) ont étudié les sujets présentant des signes cliniques et biologiques sévères d'intoxication par un insecticide organochloré, le lindane. Avant tout traitement et alors que les concentrations sanguines de lindane étaient élevées chez les patients intoxiqués, les taux sériques d'IgG, IgM, IgA et IgE n'étaient pas différents de ceux des témoins. En revanche, les taux sériques de plusieurs cytokines mesurés par ELISA étaient fortement perturbés, IL-2, IL-4, TNF $\alpha$ , interféron- $\gamma$ . Ces perturbations étaient encore présentes au 10ème jour.

Chez les non professionnels, on dispose actuellement de quelques études épidémiologiques montrant que les pesticides organochlorés altèrent les réponses immunitaires chez les populations qui furent exposées accidentellement à ces substances (Japon, 1968; Missouri, 1971; Italie, 1976; Taiwan, 1979). Ces altérations (diminution des taux sériques d'IgA et d'IgM, baisse des lymphocytes T totaux et des lymphocytes T CD8 +, etc...) et autres symptômes (pigmentation anormale de la peau et des ongles, atteintes du foie, etc...) atteignent particulièrement les enfants; ceux-ci souffrent davantage d'épisodes de bronchite et de pneumonie durant les premiers mois de leur vie que les enfants non exposés (Chang, 1981; Rogan, 1988).

La population des Inuits, esquimaux du Nord Canada, fait aussi l'objet d'un suivi tout particulier. Cette population accuse les taux de concentrations les plus élevés en substances organochlorées, bien qu'elle n'en fasse pas usage. La contamination de cette population s'explique par la consommation élevée de poissons gras et de mammifères marins qui ont accumulé, dans leur graisse, les pesticides organochlorés. Les nouveau-nés et les jeunes enfants souffrent de maladies infectieuses liées à une déficience immunitaire, 80,5% des enfants souffrent d'otites les premières années de leur vie, 59,3% d'infections pulmonaires (Dewailly *et al.*, 2000).

Peu d'études épidémiologiques ont été entreprises, dans la population générale, pour mesurer l'impact des pesticides sur le système immunitaire. Une étude dans le Nord de la Caroline (USA) montre que les personnes habitant près d'un site largement contaminé par les pesticides organochlorés, les solvants et les métaux lourds présentaient des déficiences de leur système immunitaire (Vine, 2001). Les auteurs concluaient que même des valeurs relativement basses de DDE (métabolite du DDT) dans le plasma étaient associées à des changements significatifs dans les marqueurs immunitaires.

Aux USA, l'équipe de Porter (1999) a montré expérimentalement que l'aldicarbe, l'atrazine et les nitrates, des composants habituels des eaux souterraines destinés à la consommation humaine, analysés ensemble et à faibles doses, pouvaient avoir des effets sur le système immunitaire.

Dans le Wisconsin, certaines études ont mis en évidence les anomalies dans les cellules suppressives chez les femmes qui consommaient de l'eau contaminée par de l'aldicarbe (Rappe, 1992)

En Suède, une enquête conduite auprès des hommes atteints de leucémie à tricholeucocytes suggère que cette maladie pourrait être en corrélation avec une exposition à des pesticides immunotoxiques de la famille des organochlorés (Nordstrom, 2000).

Des études expérimentales *in vivo* et *in vitro* ont permis de déterminer l'effet immunotoxique et de comprendre le mécanisme d'action de certains pesticides. Par exemple, l'Atrazine induit une inhibition de la capacité des cellules NK humaines à sécréter des protéines lytiques sans affecter leur liaison avec les cellules cibles et un effet immunomodulateur sur les lymphocytes T et NK humaines (Rowe *et al.*, 2007). Un effet immunomodulateur a été également observé avec des dithiocarbamates (comme le Manèbe) (Whalen *et al.*, 2003). Les études effectuées *in vivo*, ont montré que certains pesticides agissent essentiellement *in utero* en altérant l'activité des macrophages (Theus *et al.*, 1992) et en diminuant la quantité des lymphocytes au niveau de la rate et du thymus foetaux (Filipov *et al.*, 2005) mais également sur des animaux adultes en entraînant une diminution de la production d'immunoglobulines et de la prolifération des lymphocytes T (Fournier *et al.*, 1992).

## **II.6. Principaux mécanismes de toxicité des pesticides**

Plusieurs études expérimentales *in vitro* ont permis de montrer que certains pesticides (l'Endosulfan, la Roténone, et les organophosphorés/Chlorpyrifos), peuvent induire un stress oxydant entraînant des perturbations de processus de régulation de la survie et de la prolifération cellulaire comme par exemple certaines voies de signalisation cellulaire (MAPkinase, FAS/TNF) et certaines caspases (Ledirac *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008a; Saulsbury *et al.*, 2008). Il a été montré que des effets neurotoxiques (Drechsel et Patel, 2008; Rio et Velez-Pardo, 2008), immunotoxiques (Li et Kawada, 2006) ainsi que des effets cancérigènes (Antherieu *et al.*, 2007) et génotoxiques (Bagchi *et al.*, 1995; Calviello *et al.*, 2006) étaient liés à une augmentation de la libération d'espèces réactives de l'oxygène en présence des pesticides.

Une augmentation des aberrations chromosomiques *in vitro* chez des lymphocytes humains a été observée en présence de certains pesticides tels que le Carbofuran, seul ou en mélange avec l'Endosulfan et le Monochrotophos (Das *et al.*, 2007). De plus, sur des cellules mammifères, l'Alachlore, le Chlorpyrifos, le Mancozèbe et le Monochrotophos ont provoqué une augmentation



des aberrations chromosomiques et des bases oxydées de type 8-OH-dG ainsi qu'une présence de micronoyaux (Bagchi *et al.*, 1995; Peitl *et al.*, 1996 ; Calviello *et al.*, 2006).

Par ailleurs, certains pesticides comme les carbamates et les organophosphorés provoquent une inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du système nerveux périphérique ou central entraînant une hyperexcitabilité des cellules neuronales et des effets potentiellement neurotoxiques (Moser, 2007). Une inhibition de la neurotransmission provoquée par la diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale a également été liée à une suppression de la sécrétion d'hormones stimulant les gonades (e.g, hormone de stimulation folliculaire (FSH) et hormone lutéinisante (LH)) pouvant entraîner des effets sur la fertilité (Lyons, 2000).

De plus, certains pesticides comme le Lindane, l'Endosulfan, la Dieldrine et l'Eldrine peuvent entraîner une inhibition des récepteurs GABAergiques et une activation des récepteurs glutaminergiques dans les cellules neuronales de mammifères, induisant un syndrome d'hyperexcitabilité qui peut évoluer jusqu'à l'apparition de convulsions (Sunol *et al.*, 2008).

D'autre part, les pesticides peuvent entraîner des effets immunotoxiques en agissant par plusieurs mécanismes. Outre des effets d'inhibition de production d'anticorps, d'interleukines (IL-2), de cellules T et CD5 et des effets d'induction de la fabrication d'auto-anticorps, certains pesticides, en particulier des organophosphorés, ont montré des effets inhibiteurs de l'activité des cellules NK (Natural killer), LAK (Lymphokine Activated Killer) et CTL (Cytotoxic T Lymphocytes). Ces cellules sont responsables de la mort des cellules tumorales ou des cellules infectées et peuvent être inhibées par les organophosphorés selon trois mécanismes tels que l'induction de l'apoptose cellulaire, l'inhibition de leur capacité de sécrétion de substance cytotoxique ou l'inhibition directe de la voie Fas/FasL essentielle pour leur activité (Li et Kawada., 2006). Cependant, la plupart de ces études utilisent des doses relativement fortes et les effets à faibles doses sont moins bien décrits. Par exemple, les pesticides organophosphorés inhibent l'activité acétylcholinestérase uniquement à des doses relativement fortes et observées suite à des expositions aiguës ou accidentelles.

Une étude a pu montrer qu'à faibles doses, certains pesticides organophosphorés sont capables de se lier d'une façon spécifique à des protéines au niveau du cerveau et du thymus. Ces propriétés pourraient être à l'origine de leurs effets neurotoxiques et immunotoxiques à long terme (Carter *et al.*, 2007).

Ainsi, cette revue bibliographique montre qu'il est nécessaire de continuer les études sur les effets de faibles doses de pesticides.

ETAT ACTUEL SUR LE SUJET

ETAT ACTUEL SUR LE SUJET

ETAT ACTUEL SUR LE SUJET



# **MATERIELS ET METHODES**

## **I. Etude *in vitro***

### **I. 1. Choix des pesticides**

Pour notre étude nous avons choisi de définir et de tester les pesticides les plus utilisés sur la pomme de terre en Algérie.

Dans un premier temps, nous avons commencé par une enquête sur le terrain chez les agriculteurs de la pomme de terre dans la région de Tlemcen (Bensakrane, Remchi et Maghnia), et cette démarche nous a conduit à tester 2 pesticides qui figuraient dans la liste des pesticides les plus utilisés par ces agriculteurs. Il s'agissait d'un fongicide (Mancozèbe) qui appartient à la famille des dithiocarbamates et un herbicide (Métribuzine) qui appartient à la famille des triazines.

Afin de mimer l'exposition des consommateurs aux pesticides, les doses étudiées reflètent les doses journalières admissibles (DJA) pour les deux pesticides étudiés. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de tester des concentrations calculées à partir de la DJA, et inférieures à la dose sans effet (DES) (ECH, 2006; 2009).

### **I.2. Choix des modèles d'étude *in vitro***

Pour étudier les effets des deux pesticides (Métribuzine et Mancozèbe) *in vitro*, nous avons travaillé sur des modèles de cellules humaines d'origine lymphocytaire, et des cellules splénocytaires de rats Wistar.

#### **I.2.1. Isolement des splénocytes**

Des rats adultes âgés de 10 à 12 semaines, pesant 250 à 350g sont utilisés pour le prélèvement des rates. L'isolement des splénocytes se fait par écrasement de la rate au dessus d'une grille stérile dans 4ml de RPMI 1640. Après Centrifugation, le culot est solubilisé dans 15 ml d'eau physiologique. Le mélange est incubé dans une boîte de pétri pendant 1h à 37°.

Cette étape permet aux macrophages d'adhérer à la surface de la boîte de pétri. Le surnageant est par la suite récupéré et centrifugé à 4000t/min pendant 5min. Les splénocytes isolées sont prêtes à l'emploi (Figure 4). Les splénocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640 (Tableau A15).

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % (colorant permettant de distinguer les cellules vivantes) et 50µl de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée « Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de  $4.10^6$  cellules/ml.

## MATERIELS ET METHODES

## MATERIELS ET METHODES



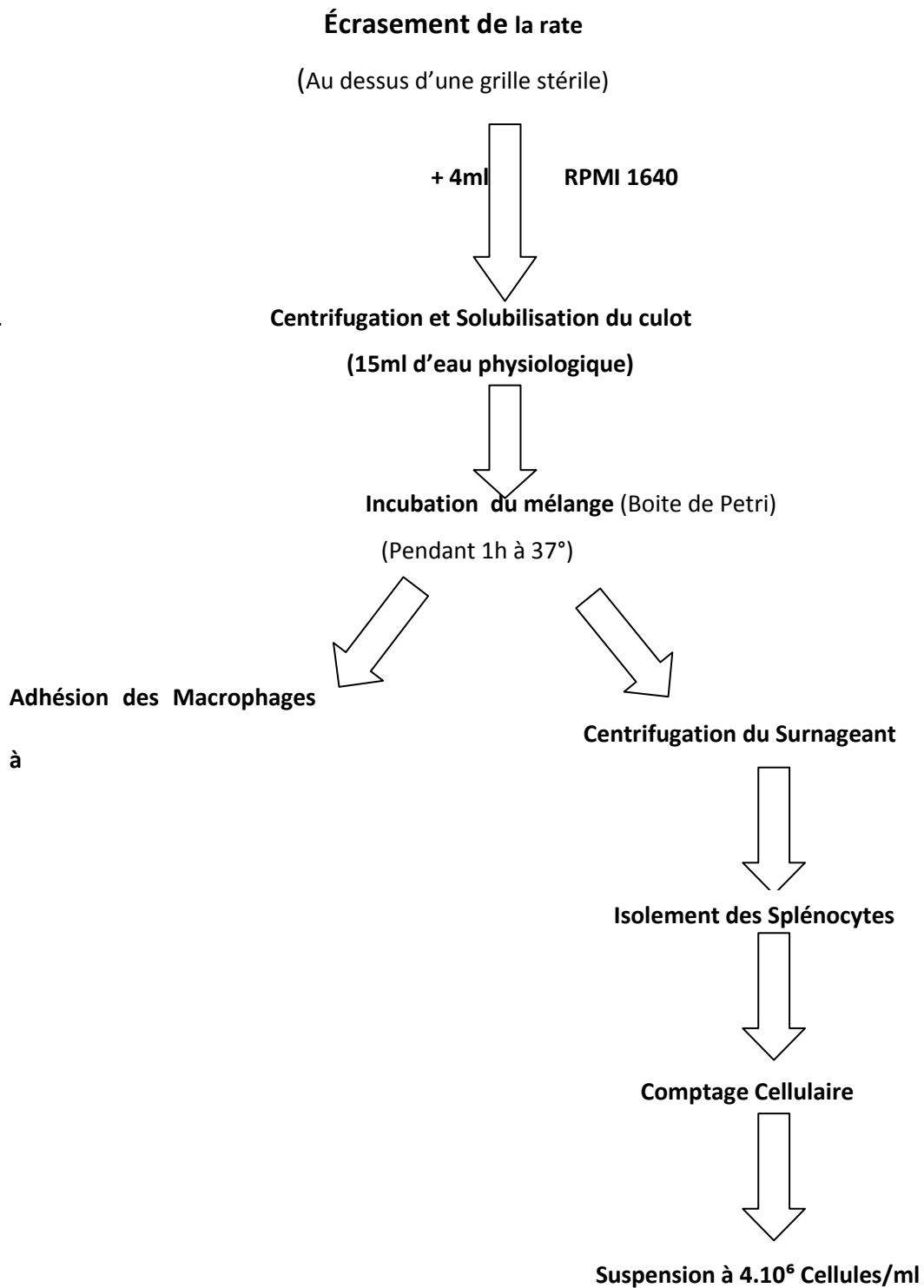


Figure 4: Méthode d'isolement et purification des splénocytes

### **I.2.2. Isolement des lymphocytes humains**

L'isolement des lymphocytes se fait à partir d'un prélèvement sanguin d'hommes volontaires, par centrifugation dans un gradient d'Histopaque (Sigma). L'histopaque, dont la densité est de 1,075, permet l'agrégation des hématies. La migration différentielle durant la centrifugation résulte en la formation de différentes couches contenant les différents types de cellules sanguines. Ainsi, les globules rouges et les granulocytes sédimentent complètement et se retrouvent dans le culot. Les lymphocytes ayant une densité inférieure à celle d'histopaque (Tableau 4) se trouvent à l'interface entre l'histopaque et le plasma après centrifugation. Ils sont par contre contaminés par d'autres cellules à sédimentation lente (Monocytes, plaquettes) (Figure 5). Les lymphocytes sont récupérés de l'interface puis sont lavés pour éliminer les contaminants (Histopaque, plasma, plaquettes,...). Le lavage se fait avec une solution saline équilibrée.

Après mélange et centrifugation, le surnageant est éliminé. Le lavage est recommencé deux fois, et les lymphocytes isolés sont prêts à l'emploi.

Les lymphocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640.


Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % et 50µl de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée «Cellule de Malassez ». Par la suite, la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de  $4.10^6$  cellules/ml.

### **I.3. Préparation des solutions mères des pesticides**

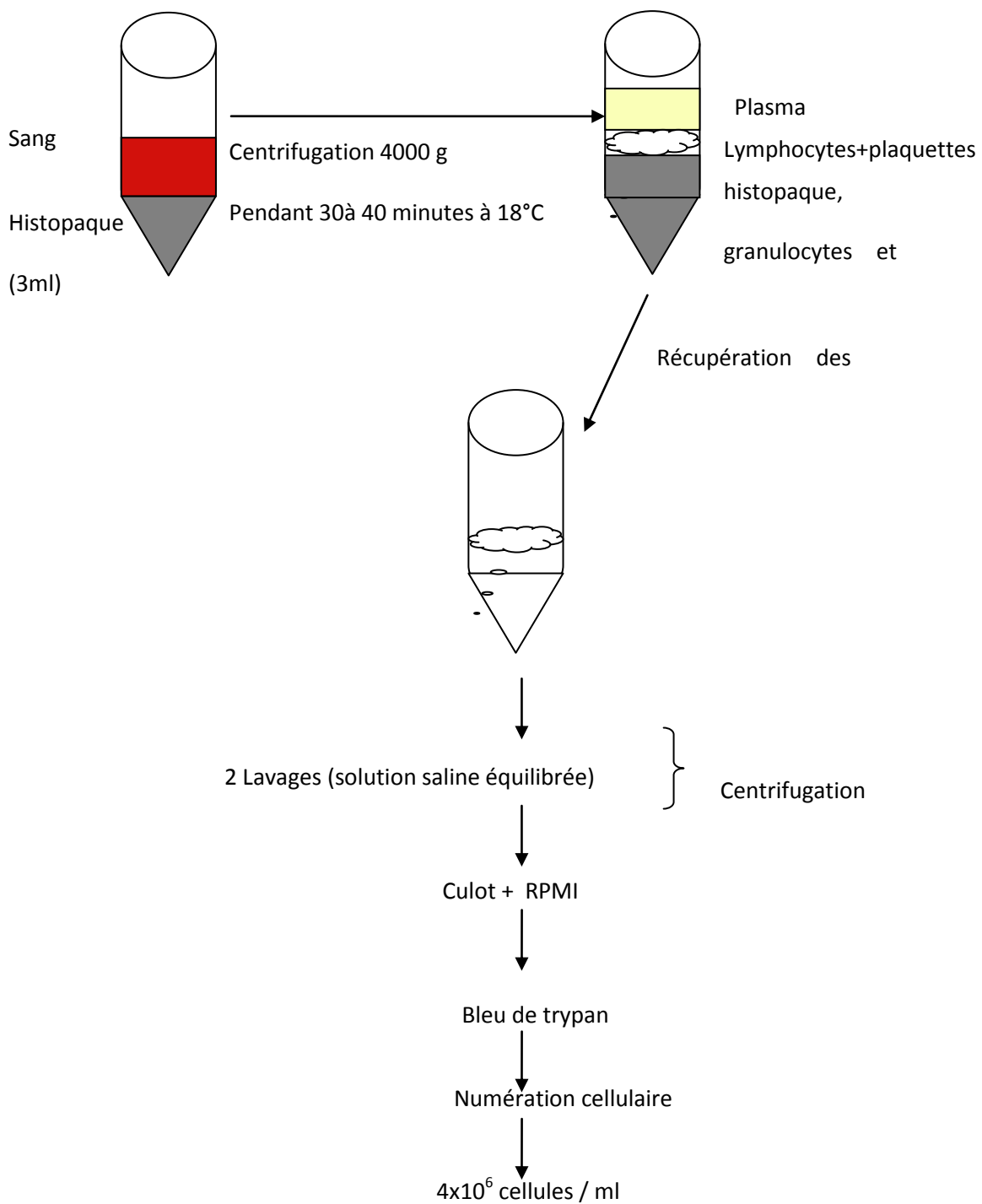
Les deux pesticides Mancozèbe et Métribuzine ont été obtenues de l'institut national d'agronomie Algérien (INRA) qui se trouve à Sidi Bel Abess. La structure chimique et le poids moléculaire de chaque un des deux pesticides sont donnés dans le Tableau 5.

Les pesticides sont solubilisés dans un solvant organique le DMSO (dimethyl sulfoxide) à 1% pour obtenir une solution mère de 10mM. Par la suite, des solutions de concentrations différentes [0µM-10µM-50µM-100µM-250µM -500µM -1mM] sont préparées à partir de la solution mère avec un volume final de 1 ml dans le milieu RPMI 1640. Ces solutions sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C pendant au moins 12 heures avant l'utilisation, pour assurer une bonne solubilisation des pesticides.

**Tableau 4:** Taille et densité des cellules sanguines

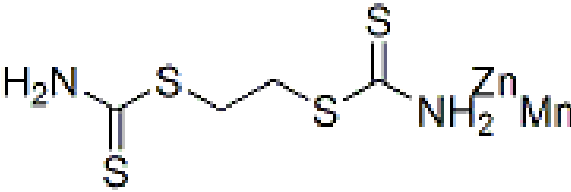
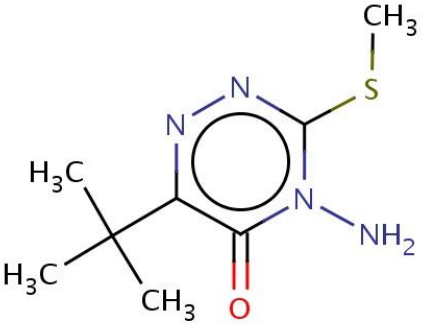
	Taille (µM)	Densité	Vitesse de sédimentation
<b>Globules rouges</b>	7 (6.5-7.5)	1.098 (1.098-1.105)	+
<b>Éosinophiles</b>	12 (12-15)	1.091 (1.087-1.096)	
<b>Neutrophiles</b>	12 (12-15)	1.088 (1.082-1.097)	
<b>Basophiles</b>	9.5 (9-10)	1.078 (1.074-1.082)	
<b>Monocytes</b>	15 (15-20)	1.071 (1.065-1.075)	
<b>Lymphocytes</b>	9 (8-10)	1.063 (1.057-1.067)	
<b>Plaquettes</b>	2-3	1.040	

## MATERIELS ET METHODES



**Figure5 : Méthode d'isolement et purification des lymphocytes**

**Tableau 5** : Structure et poids moléculaires des pesticides utilisés (ECH, 2006; 2009)

pesticides	structure	Poids moléculaire g/mole	Dénomination chimique
Mancozèbe		332,71	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> MnN <sub>2</sub> S <sub>4</sub> Zn Manganèse, ((2 – ((dithiocarboxy) éthyl) amino)
Métribuzine		214,28	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O 4-amino-6-tert-butyle-3-(méthylthio) - 1,2,4-triazine-5(4H)-one

#### **I.4. Test de transformation lymphoblastique (TTL)**

Le TTL permet d'étudier la prolifération in vitro des lymphocytes T stimulés par des agents mitogènes spécifiques. La Concanavaline A (Con A, Sigma, St. Louis, MO, USA), mitogène spécifique des cellules T est utilisée à une concentration finale de 5 µg/ml. Les cultures sont réalisées sur des plaques ELISA de 96 puits à fond plat (Nunc- Elisa).

Les lymphocytes ou les splénocytes sont mis en culture ( $4 \times 10^5$  cellules/puit) dans le milieu RPMI 1640 au quel sont ajoutés le tampon HEPES (25 mM), 10% sérum du veau foetal, L - Glutamine (2mM), 2-mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$  M), pénicilline (100 UI/ml) et streptomycine (100 (µg/ml) en présence ou en absence de la Con A (5 µg/ml).

Les essais sont réalisés en triples. Afin de déterminer les effets des pesticides sur la prolifération in vitro des lymphocytes ou des splénocytes, les cellules sont mises en culture en présence des deux pesticides à différentes concentrations finales [0µM-1µM-5µM-10µM-25 µM -50 µM -100 µM].

Les plaques sont ensuite mises à incuber 48 heures à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

A la fin de l'incubation, les cellules sont prélevées dans une nouvelle plaque Elisa 96 puits. Les puits sont lavés avec le milieu RPMI 1640 afin de récupérer l'ensemble des cellules. La détermination de la prolifération splénocytaire ou lymphocytaire se fait par comptage des cellules (cellule de malassez), confirmée par la méthode du MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] et le dosage des protéines.

La vérification du taux des dommages au niveau de l'ADN se fait selon la méthode de Fenech *et al.* (2003). Après incubation, 20µl de la suspension cellulaire sont prélevés et déposés sur une lame. La fixation se fait par le mélange méthanol/Acide Acétique (3/1, V/V) pendant 5 minutes et la coloration est réalisée par le Giemsa pendant 30 minutes. Après séchage, les observations se font au microscope optique à un grossissement de  $\times 100$  avec l'huile d'immersion.

Les cellules présentant des micronoyaux (noyaux fragmentés) sont comptées sur un ensemble de 200 cellules présentes sur la lame.

Une prise aliquote des suspensions cellulaires est centrifugée à 6000 tours/min pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré pour le dosage des interleukines IL-2 et IL-4, et INF $\gamma$ .

##### **I.4.1. Comptage des splénocytes ou des lymphocytes**

Le comptage des lymphocytes se fait à l'aide de la cellule de Malassez. Le principe est basé sur le décompte au microscope optique des cellules après coloration au bleu de Trypan, contenues dans un volume de suspension cellulaire déterminé et à dilution connue.

##### **I.4.2. Détermination de la prolifération lymphocytaire ou splénocytaire par la méthode du MTT**

## MATERIELS ET METHODES

La méthode du MTT est une méthode colorimétrique basée sur la capacité des enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénase) dans les cellules vivantes de transformer les sels de tétrazolium (couleur jaune) en produits insolubles de formazan (couleur bleue violacée).

La concentration de Formazan obtenue est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire. Cette technique permet de mesurer la viabilité et la prolifération lymphocytaire ou splénocytaire, et les résultats sont parallèles à ceux obtenus par la méthode de référence utilisant la thymidine radioactive incorporée dans l'ADN (Mosmann, 1983). La solution de MTT [3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium bromide] (Sigma, USA) est préparée à une concentration de 5 mg/ml dans le tampon phosphate (PBS, PH 7.5), filtrée puis conservée à 4° C à l'abri de la lumière.

Après isolement des lymphocytes ou des splénocytes, une suspension cellulaire de  $4 \times 10^6$  cellules/ml sert à la préparation de la gamme étalon suite à différentes dilutions.

100µL de suspension cellulaire de la gamme étalon ou des différentes incubations (puits) sont incubés en présence de 10µL de MTT (5 mg/ml) à 37° C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 3 heures. L'addition de 100 µL de HCL 0,04M dans l'isopropanol permet la dissolution des cristaux bleus Formazan. La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 630 nm. La courbe étalon permet d'obtenir directement le nombre de cellules/ml. L'indice de prolifération (IP) est aussi calculé :

$IP = (\text{densité optique des cellules stimulées} / \text{densité optique des cellules non stimulées}) \times 100$   
(Moussa *et al.*, 2000).

**NB : Cellules stimulées:** cellules prélevées des puits après les incubations.

**Cellules non stimulées:** cellules provenant de la suspension cellulaire initiale avant incubation.

### I.4.3. Dosage des protéines

Il se fait selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). Après incubation, récolte des suspensions cellulaires et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes, 50µL de tampon de lyse (NaOH 0,5 N) sont ajoutés au culot cellulaire. Après mélange et centrifugation à 6000 tours/min pendant 5 minutes, 20µL du surnageant sont prélevés pour le dosage des protéines totales.

Pour la gamme étalon, l'albumine sérique bovine (SBA) est utilisée comme standard (sigma chemical company, Saint Louis, MO).

### I.5. Dosage des Interleukines

#### I.5.1. Dosage des Interleukines 2 (IL-2)

Le dosage des interleukines 2 (IL-2) se fait selon le protocole du kit ELISA (R et D System, Oxford, UK) pour IL2. Le principe est basé sur l'utilisation de deux anticorps : un anticorps

## MATERIELS ET METHODES

monoclonal anti-IL-2 et un polyclonal conjugué à la biotine. Un revêtement d'anticorps monoclonal anti- IL-2 est administré dans les micropuits de la plaque ELISA. L'IL-2 présente dans l'échantillon ou le standard, se lie aux anticorps absorbés dans les micropuits. L'anticorps anti- IL2 polyclonal conjugué à la biotine est ajouté et se lie à IL2 capturés par le premier anticorps. L'anti- IL2 conjugué à la biotine non lié est enlevé pendant l'étape de lavage. La streptavidine-HRP est ajoutée et se lie à l'anti- IL2 conjugué à la biotine. Pour l'incubation suivante, la streptavidine-HRP non lié est enlevé durant le lavage, et la solution de substrat réagissant avec le HRP est ajoutée aux puits. Un produit coloré est formé proportionnellement à la quantité des IL2 présents dans l'échantillon. La réaction est terminée par l'addition d'acide et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Une courbe étalon est préparée à partir du standard IL-2 fourni par le Kit de dosage (R et D system, Oxford, UK).

### **I.5.2. Dosage des Interleukines 4 (IL-4)**

Le principe du dosage des interleukines 4 (IL-4) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL-4 et un polyclonal anti- IL-4 conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-2. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard IL-4 (R et D System, Oxford, UK).

### **I.5.3. Dosage de l'interféron $\gamma$ (INF $\gamma$ )**

Le principe du dosage de l'interféron  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-INF $\gamma$  et un polyclonal anti- INF $\gamma$  conjugué à la biotine. La technique utilisée est comparable à celle du dosage des IL-2 et IL-4. La gamme étalon est préparée à partir d'un standard INF $\gamma$  fourni dans le Kit (R et D System Oxford, UK).

## **I.6. Détermination des marqueurs du stress oxydatif au niveau des lymphocytes et des Splénocytes**

### **I.6.1. Détermination du taux de Glutathion des lymphocytes et des splénocytes en présence des différents pesticides**

Le taux de Glutathion (GSH) est mesuré par méthode colorimétrique suivant le protocole du Kit Bioxytech GSH-400 (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA). Les lymphocytes ou les splénocytes sont suspendus dans l'acide métaphosphorique (5%, P/V). Après centrifugation à 3000g pendant 10 min, le surnageant est mélangé au tampon phosphate de potassium contenant l'acide diethylene triamine, Penta-acétique et le lubrol ( pH 7,8). Le chromogène est par la suite ajouté dans le milieu réactionnel. Le mélange est incubé à 25°C pendant 10min à l'abri de la



## MATERIELS ET METHODES

lumière. La lecture se fait à 400nm. Les concentrations en GSH sont obtenues grâce à la courbe étalon préparée avec le GSH standard.

### **I.6.2. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase des lymphocytes et des Splénocytes en présence des différents pesticides (SOD; EC 1.15.1.1)**

L'activité de l'enzyme SOD est mesurée selon la méthode d'Elstner *et al.* (1983) après lyse des lymphocytes et des splénocytes. Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de  $MnCl_2$  et du mercaptoéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu. Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH. La lecture se fait à 540 nm, après incubation de 20 min. L'activité de la SOD est exprimée en Unité/ml ou Unité /mg de protéine.

### **I.6.3. Détermination de l'activité de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes en présence des différents pesticides (CAT, EC 1.11.1.6)**

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat lymphocytaire ou splénocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1974). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de  $H_2O_2$  en fonction du temps. Après incubation, les concentrations du  $H_2O_2$  restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de  $H_2O_2$ . La lecture se fait à 420 nm. L'activité de la catalase est exprimée en Unité/ ml ou en Unité/mg de protéine.

### **I.6.4. Teneurs en hydroperoxydes des lymphocytes et des splénocytes en présence des différents pesticides**

Les hydroperoxydes sont mesurés par l'oxydation d'ions ferriques utilisant le xylénol orange (Fox2 ; kit Peroxi Detect Sigma, USA) en conjugaison avec le ROOH réducteur spécifique de la triphenylphosphine (TPP).

Cette méthode est basée sur une peroxydation rapide transformant le  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  en milieu acide. Les ions  $Fe^{3+}$  en présence du xylénol orange [(O-cresolsulfonphthalein-3',3''-bis (methyliminodiacetic acid sodium)], forment un complexe  $Fe^{3+}$ -xylénol orange. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration plasmatique en hydroperoxydes à une longueur d'onde de 560 nm.

### **I.6.5. Teneurs en Protéines Carbonylées des lymphocytes et des splénocytes en présence des différents pesticides (Méthode de Levine et al., 1990)**

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées dans le lysat lymphocytaire ou splénocytaire par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine. La réaction aboutit à la formation de la dinitrophényl hydrazone colorée. La concentration des groupements carbonylés est déterminée par lecture à des longueurs d'onde de 350 et 375 nm.

## **II. Etude in vivo : Essais de toxicité chronique**

### **II.1. Protocol Expérimental**

Aujourd'hui, une des préoccupations majeures, concerne l'impact d'une exposition à long terme aux faibles doses de pesticides tels qu'ils peuvent être apportés au consommateur via l'alimentation. Afin d'apporter des éléments de réponse, nous avons testé l'effet de deux pesticides *in vivo* chez le rat Wistar.

Des rats Wistar femelles et mâles (âgés de 10 semaines) provenant de l'animalerie de l'université de Tlemcen (Département de biologie) sont utilisés pour l'étude *in vivo*. Le poids de chaque rat est choisi se situant dans un intervalle de  $\pm 20\%$  du poids moyen de tous les animaux utilisés dans cette étude, conformément aux principes régissant la recherche sur les animaux selon l'OCDE et le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) (CCPA, 1993 ; OCDE, 2001).

Les rats sont logés par groupes de 3 animaux de même sexe par cage et maintenus dans une pièce avec un cycle d'éclairage de 12h/jour, à une température de 25° C à 30° C et un taux d'humidité compris entre 60% et 70 %. Tous les rats reçoivent le régime standard (ONAB) et l'eau potable à satiété. Les rats sont marqués pour permettre une identification individuelle. Après 4 jours d'acclimatation, chaque animal a été gavé 3 fois par semaine.

Les pesticides (Mancozèbe, Métribuzine) sont solubilisés dans l'huile d'olive (véhicule) et sont administrés par gavage (1ml) à deux doses différentes : dose 1 (d1) qui correspond à la dose sans effet (DES) et la dose (d2) qui correspond à la dose létale 50 divisée par 100 (DL50/100) (ECH, 2006 ; 2009).

Les différents lots de rats sont répartis comme suit (Figure 6):

☞ 1<sup>er</sup> lot témoin : 6 rats recevant (1jour/2) par gavage de l'huile d'olive (1 ml par 200 g de poids corporel).

☞ 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> lots expérimentaux: 6 rats par lot recevant (1jour/2) par gavage l'huile d'olive contenant les pesticides aux doses : DES ou DL50/100 (1 ml par 200 g de poids corporel).

☞ Ainsi les doses gavées aux différents rats sont :

- Pour le Mancozèbe :

## MATERIELS ET METHODES

- DES: 5 mg/kg/j
- DL50/100: 50 mg/kg/j
- Pour la métribuzine :
- DES : 1,3 mg/kg/j
- DL50/100 :13 mg/kg/j

Les gavages sont réalisés un jour sur deux afin d'éviter le stress des animaux. L'expérimentation dure deux mois. Le poids corporel et la nourriture ingérée sont notés quotidiennement.

À la fin de l'expérimentation, les rats sont pesés puis anesthésiés au chloral à 10% (0,3 ml par 300 g de poids corporel), après 12 h de jeûne. Le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale. Une quantité de sang prélevé est récupérée dans des tubes à EDTA pour les marqueurs Redox et une autre partie est recueillie dans des tubes secs pour les tests biochimiques. Les organes (le foie, le muscle gastrocnémien, l'intestin et le tissu adipeux) sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 9‰, ensuite pesés. Les homogénats sont préparés par broyage des organes dans le tampon PBS (pH=7,4) et passage aux ultrasons.

## **II.2. Dosage des paramètres biochimiques**

### **II.2.1. Détermination des teneurs en créatinine sérique**

La créatinine sérique est dosée par la méthode de Jaffé basée sur la réaction de l'acide picrique avec la créatinine en milieu basique formant un complexe coloré en jaune orange. L'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 530 nm (Kit Prochima).

MATERIELS ET METHODES

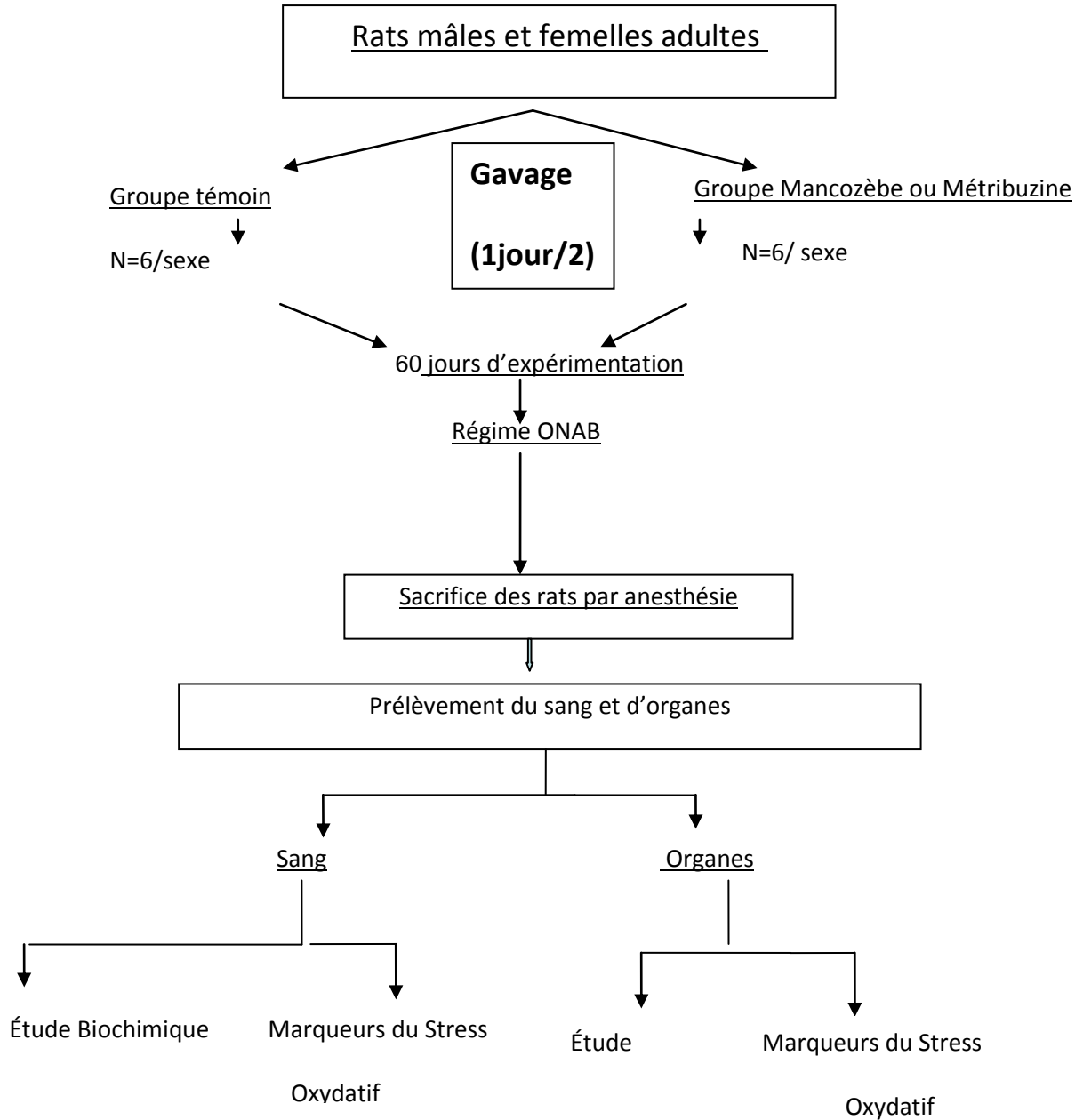


Figure 6: Protocole expérimental

### **II.2.2. Détermination des teneurs en urée sérique**

L'urée sérique est dosée par une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation du diacétylmonooxine et des ions  $Fe^{+3}$  (Kit Prochima). En présence d'ions  $Fe^{+3}$  et d'un réducteur, l'urée réagit avec le diacétylmonooxine pour donner un complexe coloré en rose. La coloration obtenue est proportionnelle à la quantité d'urée présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 525 nm.

### **II.2.3. Détermination des teneurs en glucose sérique**

Le glucose sérique est déterminé par la méthode enzymatique et colorimétrique en présence de la glucose oxydase (GOD). Le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase et de phénol, oxyde un chromogène (le 4- amino-antipyrine) incolore en couleur rouge à structure quinonéimine. La coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en glucose présente dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 505 nm (Kit Prochima).

### **II.2.4. Détermination des paramètres lipidiques et protéiques au niveau du sérum, des lipoprotéines et des organes (le foie, l'intestin, le muscle gastroméien, et le tissu adipeux).**

#### **II.2.4.1. Séparation des lipoprotéines**

Les lipoprotéines totales sont isolées à partir du sérum par précipitation selon la méthode de Burstein et al. (1970,1989). A pH neutre, les poly anions, en présence de cations divalents, peuvent former des complexes insolubles avec les lipoprotéines (lipopolyanions-cations) donc la précipitation se fait grâce aux poly anions qui se combinent aux lipides des lipoprotéines. Généralement, les poly anions utilisés sont les sulfates ( $SO^{3-}$ ), les polysaccharides (héparine) et l'acide phosphotungstique, alors que les cations sont les  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ . L'utilisation du même réactif de précipitation à différentes concentrations, permet de précipiter sélectivement les fractions des lipoprotéines ; et ainsi à concentration de plus en plus élevée, ce réactif permet la séparation à partir du sérum, d'abord des VLDL ensuite des LDL et en dernier des HDL. Ce principe est analogue à celui de l'ultracentrifugation en gradient de densité des lipoprotéines. En effet, lorsque la concentration varie, la densité du milieu varie aussi et permet une précipitation sélective. Les lipoprotéines, précipitées par l'acide phosphotungstique et le  $MgCl_2$  à différentes concentrations, sont par la suite solubilisées grâce à une solution de solubilisation contenant du tampon citrate trisodique et NaCl.

#### **II.2.4.2. Détermination des teneurs en cholestérol et en triglycérides**

## MATERIELS ET METHODES

Le cholestérol total et les triglycérides sont dosés par des méthodes enzymatiques (Kit Prochima), sur le sérum total, les différentes fractions lipoprotéiques, et les homogénats des organes.

### **II.2.4.3. Détermination des teneurs en protéines totales**

Les protéines totales sont dosées sur les fractions de lipoprotéines et sur les homogénats d'organes par la méthode de Lowry et al. (1951) utilisant l'albumine sérique bovine comme standard (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA). En milieu alcalin, le complexe formé par les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et les groupements tyrosine et tryptophane des protéines est réduit par le réactif de Folin. La coloration bleue développée est proportionnelle à la quantité de protéines de l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde de 689 nm. Sur le sérum total, les protéines totales sont déterminées grâce à l'utilisation du réactif de biuret décrit par Gornall *et al.* (1949).

### **II.2.4.4. Détermination des lipides totaux des organes (le foie, l'intestin, le muscle gastrocnémien, et le tissu adipeux).**

L'extraction lipidique se fait à partir des organes par la méthode de Folch *et al.* (1957) après le broyage d'une partie aliquote de l'organe (300 mg) et extraction par un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v). Après évaporation totale du solvant, les lipides totaux sont pesés.

## **II.3. Détermination du statut oxydant/antioxydant**

### **II.3.1. Dosage de la vitamine C**

La vitamine C plasmatique est dosée selon la méthode de Jagota et Dani (1982) utilisant le réactif de Folin et une gamme d'acide ascorbique. Après précipitation des protéines plasmatiques par l'acide trichloroacétique (10%) et centrifugation, le réactif de Folin est ajouté au surnageant. La vitamine C présente dans le surnageant réduit le réactif de Folin donnant une coloration jaune. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en vitamine C à une longueur d'onde de 769 nm présente dans l'échantillon. La concentration est déterminée à partir de la courbe étalon obtenue grâce à une solution d'acide ascorbique.

### **II.3.2. Détermination des protéines carbonylées**

Les protéines carbonylées du plasma ou tissulaires (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine selon la méthode de Levine et al. (1990). Le plasma ou l'homogénat d'organes est incubé 1h à température ambiante en présence de la dinitrophénylhydrazine (DNPH ; préparée dans HCL) ou avec seulement du HCL pour le blanc. Ensuite, les protéines sont précipitées avec l'acide trichloroacétique (TCA) et lavées 3 fois par l'éthanol: ethylacetate 1:1 (v/v) et 3 fois par le TCA.

## MATERIELS ET METHODES

Le culot est solubilisé dans une solution de guanidine.

Les lectures se font à 350 et 375nm. La concentration des groupements carbonylés est calculée selon un coefficient d'extinction ( $E = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **II.3.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)**

Le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique. Ce dosage est réalisé selon la méthode de Draper et Hadley (1990), par un traitement acide à chaud, grâce à l'utilisation de l'acide thiobarbiturique (TBA). Le plasma ou l'homogénat d'organes est incubé 20 minutes à 100°C avec le TBA et l'acide trichloroacétique (TCA). Après incubation, refroidissement et centrifugation à 4000 t/min pendant 10 min, la lecture est réalisée sur le surnageant qui contient le MDA. Le TBA réagit avec les aldéhydes pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA dont l'absorption se fait à 532 nm. La concentration en MDA plasmatique ou tissulaire est calculée en utilisant une courbe étalon de MDA ou le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ( $E=1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 532 nm)

### **III.3.4. Dosage des diènes conjugués plasmatiques**

Les diènes conjugués plasmatiques sont dosés selon la méthode d'Esterbauer et al. (1989). Les diènes conjugués sont considérés comme les produits primaires de l'oxydation lipidique. La lecture de l'absorbance du plasma frais à 234nm marque la présence des diènes conjugués dont la concentration est estimée en utilisant le coefficient d'extinction  $E = 29,50 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; à 234 nm).

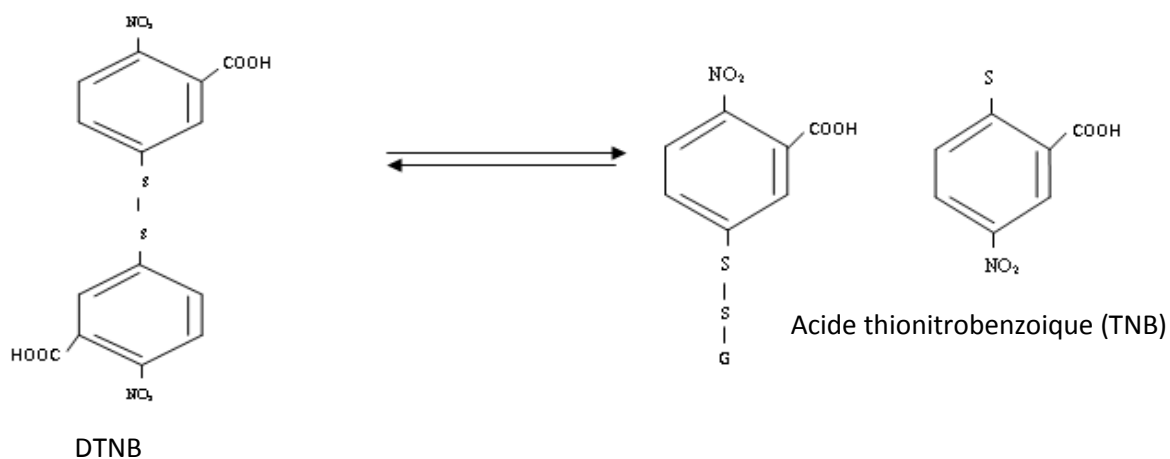
### **III.3.5. Dosage de l'activité de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)**

Cette activité enzymatique au niveau du lysat érythrocytaire est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon la méthode de Aebi (1974).

### **II.3.6. Dosage du Glutathion érythrocytaire réduit (GSH) (Ellman, 1959)**

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé par la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante :

## MATERIELS ET METHODES



Le thionitrobenzoïque (TNB) à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm avec un coefficient d'extinction égal à  $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### III. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, ...) sont significativement différentes.



## MATERIELS ET METHODES

[Tapez un texte]

## **RESULTATS ET INTERPRETATION**

[Tapez un texte]

[Tapez un texte]

[Tapez un texte]

[Tapez un texte]

## **I. Effets des pesticides in vitro**

### **I.1. Effets des pesticides sur la prolifération des lymphocytes humains et des splénocytes de rat.**

La prolifération lymphocytaire et splénocytaire en présence d'agent mitogène, la Con A, est représentée sous forme de l'indice de prolifération en présence ou en absence des pesticides (la Métribuzine ou le mancozèbe) (**Figure 7; Tableau A1 en annexe**).

#### **I.1.1. Effets de la Métribuzine sur la prolifération des lymphocytes et des splénocytes (Figure 7).**

La prolifération des lymphocytes et des splénocytes en présence de la Métribuzine est significativement variable puisque l'indice de prolifération (IP) est différent selon les incubations.

En présence de la Métribuzine à des concentrations entre 1 et 10 $\mu$ M, les proliférations lymphocytaires et splénocytaires sont stimulées puisque les IP sont significativement augmentés comparés à la prolifération basale.

Par contre, la prolifération cellulaire est réduite par la Métribuzine aux concentrations de 25, 50, et 100  $\mu$ M d'une manière dose dépendante aussi bien chez les lymphocytes que chez les splénocytes.

Les variations entraînées par la Métribuzine sont similaires aussi bien chez les lymphocytes que chez les splénocytes.

#### **I.1.2. Effets du Mancozèbe sur la prolifération des lymphocytes et des splénocytes (Figure 7).**

Le Mancozèbe à 1  $\mu$ M n'a aucun effet sur la prolifération lymphocytaire par rapport à la prolifération basale. Par contre, il entraîne une réduction significative de la prolifération des lymphocytes aux concentrations plus élevées (de 5-10  $\mu$ M).

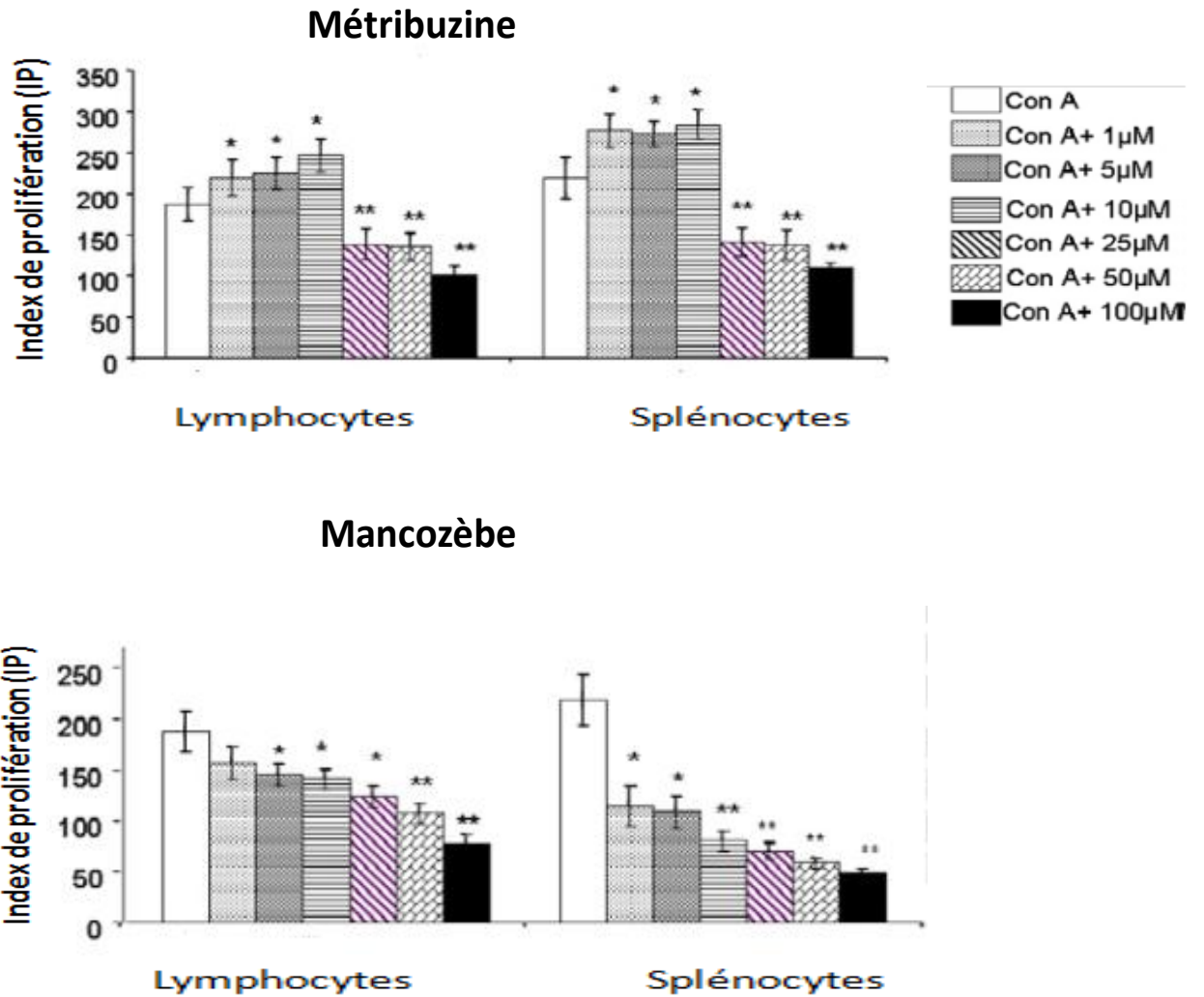
Le Mancozèbe entraîne une chute significative des proliférations splénocytaires quelque soit la concentration utilisée (1 à 100  $\mu$ M) par rapport à la prolifération basale. Cette inhibition induite par le Mancozèbe est dose-dépendante aussi bien chez les lymphocytes que chez les splénocytes de rats. Les splénocytes de rat sont plus sensibles au Mancozèbe que les lymphocytes humains.

### **I.2. Effets des pesticides sur la sécrétion des cytokines (Figures 8 et 9; Tableaux A2 et A3 en annexe et Tableau 6)**

#### **I.2.1. Effets de la Métribuzine sur la sécrétion des cytokines (Figure 8 et Tableau 6)**

La sécrétion des cytokines (IL2, INF $\gamma$  et IL4) en présence de la Métribuzine dans les cultures des lymphocytes ou des splénocytes est significativement différente.





**Figure 7: Effets de la Métribuzine ou du Mancozèbe sur la prolifération des lymphocytes et des splénocytes.**

Les cellules ont été incubées en présence de la concanavaline A (ConA, 5 µg / ml), la Métribuzine ou le Mancozèbe (1-100 µM) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple à partir de 8 sujets sains et des rates de 8 rats. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de (LSD) afin de déterminer les différences significatives. \* indique différence significative par rapport à l'incubation avec l'agent mitogène seul (ConA) : \* P< 0,05 et \*\*P<0,001.

## RESULTATS ET INTERPRETATION

En présence de la Métribuzine dans les cultures de lymphocytes ou de splénocytes à faibles concentrations (1, 5 et 10 $\mu$ M), les sécrétions des cytokines sont significativement augmentées comparées aux proliférations basales.

Par contre, aux concentrations plus élevées de Métribuzine (25, 50, 100  $\mu$ M), les sécrétions des cytokines sont progressivement et significativement réduites comparées aux valeurs obtenues dans la prolifération basale.

La Métribuzine présente un effet dichotomique sur la sécrétion des trois cytokines dépendant des concentrations utilisées.

Le rapport Th1/Th2 représenté par le rapport INF $\gamma$ /IL4 ne varie pas en présence de la Métribuzine dans les cultures lymphocytaires aux concentrations comprises entre 1 et 50  $\mu$ M. Par contre, ce rapport présente une augmentation significative en présence de la Métribuzine à 100  $\mu$ M (**Tableau 6**).

### **I.2.2. Effets du Mancozèbe sur la sécrétion des cytokines (Figure 9 et Tableau 6)**

Les sécrétions des cytokines (IL2, INF $\gamma$  et IL4) par les lymphocytes ou les splénocytes est significativement réduite en présence du Mancozèbe quelque soit la concentration utilisée comparées aux valeurs obtenues avec la prolifération basale.

La réduction de la sécrétion des cytokines induite par le Mancozèbe est dose dépendante aussi bien chez les lymphocytes humains que chez les splénocytes de rats.

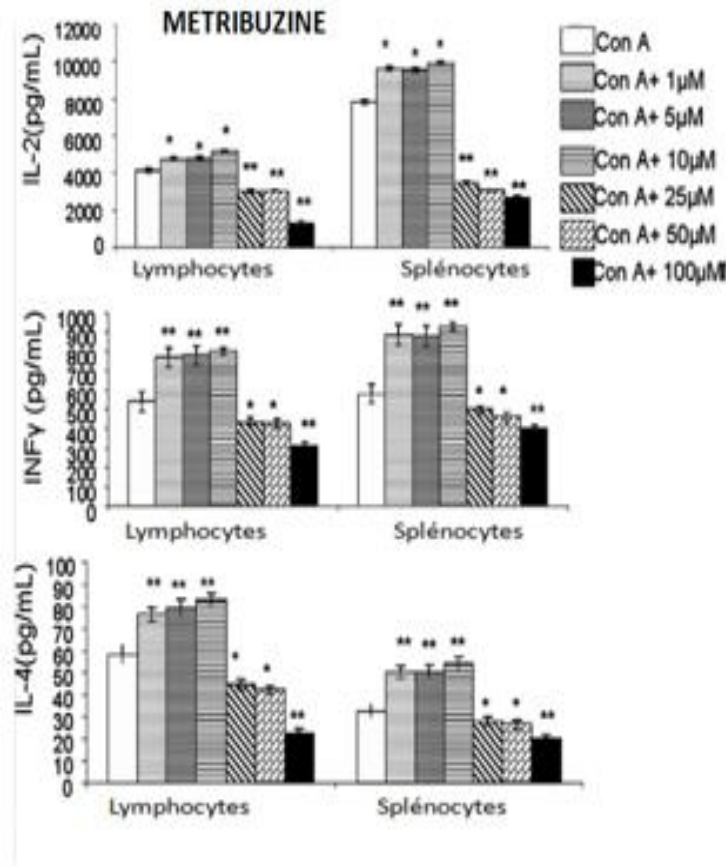
Le rapport Th1/Th2 est significativement augmenté avec les concentrations croissantes du Mancozèbe dans les cultures des lymphocytes humains ou des splénocytes de rats; la plus forte valeur du rapport Th1/Th2 est obtenue avec la plus forte concentration du Mancozèbe en culture 100 $\mu$ M (**Tableau 6**).

### **I.3. Statut oxydant/antioxydant des lymphocytes humains et des splénocytes de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe**

#### **I.3.1. Effets de la Métribuzine sur les teneurs en glutathion réduit, en hydro peroxydes et en protéines carbonylées des lymphocytes et des splénocytes (Tableau 7)**

Les teneurs en glutathion réduit (GSH), en hydroperoxydes et en protéines carbonylées au niveau des lymphocytes et des splénocytes ne présentent aucune variation significative en présence de faibles concentrations de Métribuzine de (0-10  $\mu$ M) comparées à la prolifération basale.

En présence de la Métribuzine à des concentrations plus fortes (25-100  $\mu$ M), les teneurs en GSH des lymphocytes et des splénocytes de rats sont significativement diminuées par rapport à la prolifération basale.



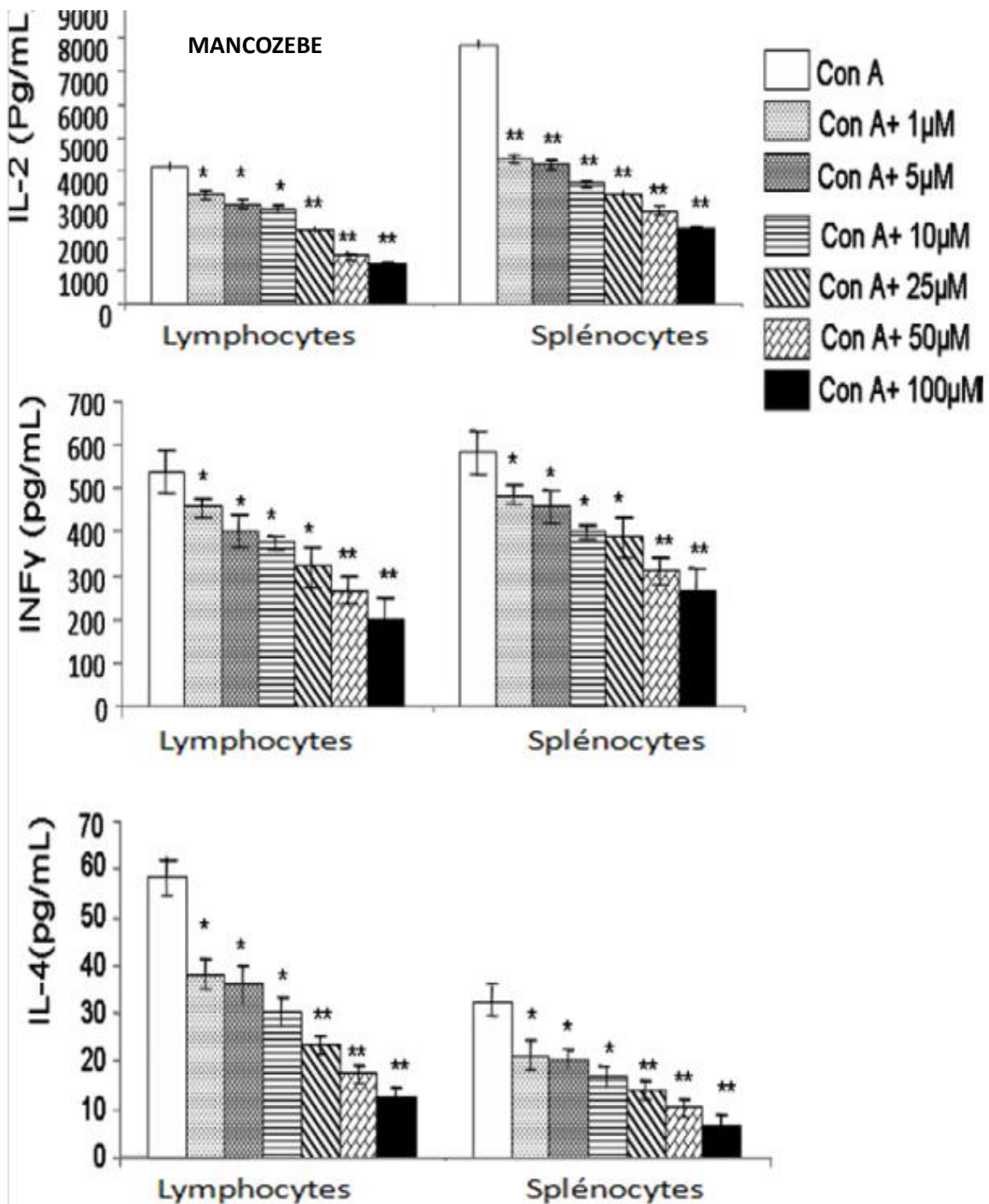
**Figure 8: Effets de la Métribuzine sur la sécrétion des cytokines**

Les cellules ont été incubées en présence de la concanavaline A (ConA, 5 μg / ml), la Métribuzine (1-100 μM) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple à partir de 8 sujets sains et des rates de 8 rats. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de (LSD) afin de déterminer les différences significatives. \* indique différence significative par rapport à l'incubation avec l'agent mitogène seul (ConA) : \*P< 0,05 et \*\*P<0,001.

**Tableau 6: Rapports TH1/TH2 (INF $\gamma$ /IL-4) en présence des pesticides**

	<b>Mancozèbe</b>		<b>Métribuzine</b>	
	lymphocytes	Splénocytes	Lymphocytes	Splénocytes
<b>INF<math>\gamma</math>/IL-4</b>				
ConA	9,25 $\pm$ 0,86 <sup>d</sup>	17,80 $\pm$ 1,33 <sup>d</sup>	9,25 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup>	17,80 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup>
ConA+ 1 $\mu$ M	11,95 $\pm$ 0,62 <sup>c</sup>	22,79 $\pm$ 1,25 <sup>c</sup>	10,11 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>	17,72 $\pm$ 1,42 <sup>b</sup>
ConA+ 5 $\mu$ M	11,20 $\pm$ 0,64 <sup>c</sup>	22,45 $\pm$ 1,31 <sup>c</sup>	9,86 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>	17,50 $\pm$ 1,31 <sup>b</sup>
ConA+ 10 $\mu$ M	12,39 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	23,90 $\pm$ 1,27 <sup>c</sup>	9,70 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	17,25 $\pm$ 1,27 <sup>b</sup>
ConA+25 $\mu$ M	13,73 $\pm$ 1,17 <sup>b</sup>	27,50 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	9,75 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	17,67 $\pm$ 1,34 <sup>b</sup>
ConA+50 $\mu$ M	15,30 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	29,70 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	10,08 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup>	17,19 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>
ConA+100 $\mu$ M	16,05 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	39,81 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	13,80 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>	20,03 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>

Les cellules ont été incubées en présence de la concanavaline A (ConA, 5  $\mu$ g / ml), la Métribuzine ou le Mancozèbe (1-100  $\mu$ M) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  ET des incubations réalisées en triple à partir de 8 sujets sains et des rates de 8 rats. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de (LSD) afin de déterminer les différences significatives. <sup>a, b, c, d</sup> indiquent des différences significatives entre les incubations.



**Figure 9: Effets du Mancozèbe sur la sécrétion des cytokines**

Les cellules ont été incubées en présence de la concanavaline A (ConA, 5 μg / ml), le Mancozèbe (1-100 μM) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple à partir de 8 sujets sains et des rates de 8 rats. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de (LSD) afin de déterminer les différences significatives. \* indique différence significative par rapport à l'incubation avec l'agent mitogène seul (ConA) : \*P< 0,05 et \*\*P<0,001.

## RESULTATS ET INTERPRETATION

Par ailleurs, la Métribuzine aux concentrations variant entre 25-100  $\mu\text{M}$  entraîne une augmentation hautement significative des teneurs lymphocytaires et splénocytaires en hydroperoxydes et en protéines carbonylées par rapport à la culture basale.

### **I.3.2. Effets du Mancozèbe sur les teneurs en glutathion réduit, en hydro peroxydes et en protéines carbonylées des lymphocytes et des splénocytes (Tableau 7)**

Le Mancozèbe aux concentrations de 1, 5, et 10 $\mu\text{M}$  n'entraîne aucune variation significative des teneurs en GSH lymphocytaire et splénocytaire par rapport à la prolifération basale.

Par contre, les concentrations plus élevés du Mancozèbe (25 jusqu'à 100 $\mu\text{M}$ ) entraînent une réduction significative des teneurs en GSH lymphocytaire et splénocytaire par rapport à la prolifération basale.

Cette réduction des teneurs en GSH entraînée par le Mancozèbe est dose-dépendante aussi bien chez les lymphocytes humains que chez les splénocytes de rats.

Les teneurs en hydroperoxydes et en protéines carbonylées varient significativement entre les différentes cultures lymphocytaires et splénocytaires .

Les concentrations du Mancozèbe utilisées (1 jusqu'à 100  $\mu\text{M}$ ) dans les cultures des lymphocytes et des splénocytes induisent des augmentations significatives des teneurs en hydroperoxydes et en protéines carbonylées comparées aux proliférations basales.

Cette augmentation des teneurs en hydroperoxydes et en protéines carbonylées entraînée par le Mancozèbe est dose-dépendante, aussi bien chez les lymphocytes humains que chez les splénocytes de rats.

### **I.3.3. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulés en présence de la Métribuzine ou du Mancozèbe**

#### **I.3.3.1. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulés en présence de la Métribuzine (Tableau 8)**

L'activité de la catalase lymphocytaire et splénocytaire ne présente aucune variation en présence de la Métribuzine dans un intervalle de concentrations entre 1-10 $\mu\text{M}$  par rapport aux valeurs de la prolifération basale.

Par contre, aux concentrations entre 25 et 100  $\mu\text{M}$  de Métribuzine, les activités de la catalase présentent une augmentation significative par rapport à la culture basale.

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) au niveau des lymphocytes et des splénocytes est peu sensible à la Métribuzine. En effet, les activités SOD lymphocytaires et splénocytaires ne

**Tableau 7. Statut oxydant/antioxydant des lymphocytes humains et des splénocytes de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe**

RESULTATS ET INTERPRETATION

	<b>Mancozèbe</b>		<b>Métribuzine</b>	
	Lymphocytes	Splénocytes	Lymphocytes	Splénocytes
<b>GSH (nM/10<sup>6</sup>cells)</b>				
ConA	14,50 ± 2,11 <sup>a</sup>	16,75 ± 1,02 <sup>a</sup>	14,50 ± 2,11 <sup>a</sup>	16,75 ± 1,02 <sup>a</sup>
ConA+ 1µM	14,11 ± 2,02 <sup>a</sup>	16,33 ± 1,66 <sup>a</sup>	13,26 ± 1,54 <sup>a</sup>	16,02 ± 1,22 <sup>a</sup>
ConA+ 5µM	14,15 ± 1,65 <sup>a</sup>	15,73 ± 1,54 <sup>a</sup>	13,54 ± 1,32 <sup>a</sup>	15,78 ± 1,31 <sup>a</sup>
ConA+ 10µM	14,24 ± 1,28 <sup>a</sup>	15,42 ± 1,43 <sup>a</sup>	13,18 ± 1,26 <sup>a</sup>	15,62 ± 1,30 <sup>a</sup>
ConA+25µM	12,05 ± 1,01 <sup>b</sup>	13,41 ± 1,27 <sup>b</sup>	10,02 ± 1,03 <sup>b</sup>	13,11 ± 1,11 <sup>b</sup>
ConA+50µM	10,73 ± 1,03 <sup>c</sup>	13,22 ± 1,31 <sup>b</sup>	9,45 ± 1,02 <sup>b</sup>	12,35 ± 1,27 <sup>b</sup>
ConA+100µM	9,36 ± 1,10 <sup>c</sup>	13,07 ± 1,02 <sup>b</sup>	7,73 ± 0,76 <sup>c</sup>	10,45 ± 1,05 <sup>c</sup>
<b>HYDP(nM/10<sup>6</sup>cells)</b>				
ConA	1,72 ± 0,13 <sup>f</sup>	2,08 ± 0,21 <sup>e</sup>	1,72 ± 0,13 <sup>c</sup>	2,08 ± 0,21 <sup>c</sup>
ConA+ 1µM	2,67 ± 0,22 <sup>e</sup>	3,42 ± 0,25 <sup>d</sup>	1,78 ± 0,22 <sup>c</sup>	2,22 ± 0,23 <sup>c</sup>
ConA+ 5µM	3,44 ± 0,30 <sup>d</sup>	3,68 ± 0,32 <sup>d</sup>	1,80 ± 0,25 <sup>c</sup>	2,31 ± 0,15 <sup>c</sup>
ConA+ 10µM	3,83 ± 0,25 <sup>d</sup>	4,56 ± 0,34 <sup>c</sup>	1,86 ± 0,16 <sup>c</sup>	2,27 ± 0,27 <sup>c</sup>
ConA+25µM	4,52 ± 0,26 <sup>c</sup>	5,22 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,11 ± 0,32 <sup>b</sup>	3,55 ± 0,31 <sup>b</sup>
ConA+50µM	5,22 ± 0,18 <sup>b</sup>	5,61 ± 0,22 <sup>b</sup>	3,42 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,67 ± 0,34 <sup>b</sup>
ConA+100µM	6,78 ± 0,24 <sup>a</sup>	7,03 ± 0,30 <sup>a</sup>	4,47 ± 0,24 <sup>a</sup>	4,31 ± 0,28 <sup>a</sup>
<b>PCAR(nM/10<sup>6</sup>cells)</b>				
ConA	2,36 ± 0,45 <sup>g</sup>	1,44 ± 0,25 <sup>f</sup>	2,36 ± 0,45 <sup>c</sup>	1,44 ± 0,25 <sup>c</sup>
ConA+ 1µM	3,40 ± 0,33 <sup>f</sup>	2,75 ± 0,31 <sup>e</sup>	2,48 ± 0,33 <sup>c</sup>	1,56 ± 0,26 <sup>c</sup>
ConA+ 5µM	4,33 ± 0,41 <sup>e</sup>	3,22 ± 0,27 <sup>d</sup>	2,56 ± 0,35 <sup>c</sup>	1,58 ± 0,21 <sup>c</sup>
ConA+ 10µM	5,66 ± 0,28 <sup>d</sup>	3,59 ± 0,32 <sup>d</sup>	2,68 ± 0,27 <sup>c</sup>	1,76 ± 0,31 <sup>c</sup>
ConA+25µM	6,83 ± 0,36 <sup>c</sup>	4,56 ± 0,24 <sup>c</sup>	4,07 ± 0,48 <sup>b</sup>	3,56 ± 0,29 <sup>b</sup>
ConA+50µM	8,45 ± 0,35 <sup>b</sup>	5,82 ± 0,35 <sup>b</sup>	4,63 ± 0,43 <sup>b</sup>	3,81 ± 0,30 <sup>b</sup>
ConA+100µM	9,56 ± 0,40 <sup>a</sup>	6,75 ± 0,37 <sup>a</sup>	5,42 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,84 ± 0,33 <sup>a</sup>

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 8 sujets sains et 8 rates de rats. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, <sup>d</sup>, <sup>e</sup>, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test

**Tableau 8. Activité de la Superoxyde dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulés en présence de Métribuzine ou du Mancozèbe**

<b>Catalase (U/mg)</b>				
ConA	20,50 ± 2,26 <sup>d</sup>	30,53 ± 3,66 <sup>c</sup>	20,50 ± 2,26 <sup>c</sup>	30,53 ± 3,66 <sup>d</sup>
ConA+ 1µM	25,66 ± 1,64 <sup>c</sup>	35,83 ± 3,25 <sup>c</sup>	20,34 ± 2,24 <sup>c</sup>	31,02 ± 2,08 <sup>d</sup>
ConA+ 5µM	32,16 ± 2,11 <sup>b</sup>	43,02 ± 2,77 <sup>b</sup>	20,05 ± 1,88 <sup>c</sup>	30,84 ± 2,53 <sup>d</sup>
ConA+ 10µM	35,74 ± 2,46 <sup>b</sup>	45,92 ± 2,06 <sup>b</sup>	19,87 ± 2,17 <sup>c</sup>	30,22 ± 2,44 <sup>d</sup>
ConA+25µM	42,31 ± 3,05 <sup>a</sup>	56,11 ± 3,20 <sup>a</sup>	38,66 ± 2,46 <sup>b</sup>	42,50 ± 1,75 <sup>c</sup>
ConA+50µM	46,37 ± 3,17 <sup>a</sup>	58,05 ± 3,05 <sup>a</sup>	40,11 ± 1,53 <sup>b</sup>	50,03 ± 2,82 <sup>b</sup>
ConA+100µM	48,22 ± 3,08 <sup>a</sup>	60,33 ± 3,66 <sup>a</sup>	49,53 ± 2,61 <sup>a</sup>	60,62 ± 2,21 <sup>a</sup>
<b>SOD (U/mg)</b>				
ConA	89,32 ± 6,63 <sup>b</sup>	122,27 ± 8,46 <sup>b</sup>	89,32 ± 6,63 <sup>b</sup>	122,27 ± 8,46 <sup>b</sup>
ConA+ 1µM	88,56 ± 5,44 <sup>b</sup>	120,34 ± 6,72 <sup>b</sup>	91,11 ± 7,02 <sup>b</sup>	121,50 ± 7,77 <sup>b</sup>
ConA+ 5µM	88,63 ± 5,68 <sup>b</sup>	125,72 ± 7,23 <sup>b</sup>	90,34 ± 6,88 <sup>b</sup>	120,06 ± 8,25 <sup>b</sup>
ConA+ 10µM	87,46 ± 6,33 <sup>b</sup>	122,05 ± 8,05 <sup>b</sup>	91,50 ± 8,45 <sup>b</sup>	122,42 ± 8,50 <sup>b</sup>
ConA+25µM	90,50 ± 6,02 <sup>b</sup>	124,26 ± 7,26 <sup>b</sup>	102,74 ± 8,28 <sup>b</sup>	125,63 ± 8,02 <sup>b</sup>
ConA+50µM	92,25 ± 4,26 <sup>b</sup>	130,11 ± 6,81 <sup>b</sup>	100,32 ± 8,55 <sup>b</sup>	130,84 ± 7,64 <sup>b</sup>
ConA+100µM	132,44 ± 5,38 <sup>a</sup>	168,28 ± 6,50 <sup>a</sup>	155,57 ± 6,43 <sup>a</sup>	173,11 ± 6,33 <sup>a</sup>

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 8 sujets sains et 8 rates de rats. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, <sup>d</sup>, <sup>e</sup>, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).



## RESULTATS ET INTERPRETATION

présentent aucune variation en présence de la Métribuzine à 1-50  $\mu\text{M}$ , avec une hausse significative seulement à 100  $\mu\text{M}$  par rapport à la prolifération basale.

### **I.3.3.2. Détermination de l'activité de la Superoxyde dismutase et de la Catalase des lymphocytes et des splénocytes stimulées en présence du Mancozèbe (Tableau 8).**

Les activités de la catalase lymphocytaire sont significativement augmentées en présence du Mancozèbe à des concentrations croissantes (1-100  $\mu\text{M}$ ). Cette augmentation concerne aussi bien les lymphocytes humains que les splénocytes de rat.

Le Mancozèbe à un intervalle de concentrations de 1 à 50  $\mu\text{M}$  n'entraîne aucune variation des activités de la superoxyde dismutase des lymphocytes et des splénocytes de rats par rapport à la prolifération basale.

Cependant, le Mancozèbe à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  entraîne une augmentation significative des activités SOD au niveau des lymphocytes et des splénocytes comparés à la prolifération basale.

### **I.4. Formation des Micronoyaux (Tableau 9)**

Quelque soit le pesticide utilisé (la Métribuzine ou le Mancozèbe) à des concentrations comprises entre 1 et 25  $\mu\text{M}$ , aucune variation des fréquences d'apparition de micronoyaux n'est décelée au niveau des lymphocytes et des splénocytes.

Cependant, aux concentrations plus élevées des deux pesticides (50 à 100  $\mu\text{M}$ ), les fréquences de la formation des micronoyaux sont significativement augmentées aussi bien chez les lymphocytes humains que chez les splénocytes.

**Tableau 9. Formation des micronoyaux**

MN (%)	Lymphocytes	Splénocytes
<b>Mancozèbe</b>		
ConA	4 ± 2 <sup>c</sup>	5 ± 2 <sup>c</sup>
ConA+ 1µM	5 ± 2 <sup>c</sup>	6 ± 1 <sup>c</sup>
ConA+ 5µM	6 ± 1 <sup>c</sup>	5 ± 1 <sup>c</sup>
ConA+ 10µM	7 ± 1 <sup>c</sup>	7 ± 1 <sup>c</sup>
ConA+25µM	7 ± 2 <sup>c</sup>	7 ± 1 <sup>c</sup>
ConA+50µM	15 ± 2 <sup>b</sup>	20 ± 2 <sup>b</sup>
ConA+100µM	26 ± 3 <sup>a</sup>	32 ± 4 <sup>a</sup>
<b>Métribuzine</b>		
ConA	4 ± 2 <sup>c</sup>	5 ± 2 <sup>c</sup>
ConA+ 1µM	6 ± 2 <sup>c</sup>	7 ± 3 <sup>c</sup>
ConA+ 5µM	6 ± 1 <sup>c</sup>	7 ± 2 <sup>c</sup>
ConA+ 10µM	7 ± 2 <sup>c</sup>	7 ± 1 <sup>c</sup>
ConA+25µM	7 ± 1 <sup>c</sup>	8 ± 1 <sup>c</sup>
ConA+50µM	12 ± 1 <sup>b</sup>	18 ± 2 <sup>b</sup>
ConA+100µM	18 ± 2 <sup>a</sup>	26 ± 3 <sup>a</sup>

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des valeurs obtenues après les différentes incubations chez 8 sujets sains et 8 rates de rats. <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>, <sup>d</sup>, <sup>e</sup>, indiquent les différences significatives obtenues entre les différentes incubations (p< 0,05). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA suivi par le test (LSD).

## **II. Effets des pesticides chez le rat Wistar**

### **II.1. Poids corporel et consommation alimentaire**

#### **II.1.1. Variation du poids corporel chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Tableau 10)**

Les poids corporels des rats sont significativement différents quelque soit le pesticide utilisé et quelque soit la dose testée de Métribuzine (D1=1,3mg/kg/j ou D2=13mg/kg/j) ou du Mancozèbe (D1=5mg/kg/j ou D2=50mg/kg/j). Les poids corporels des rats traités par les pesticides sont significativement diminués par rapport aux poids des rats témoins.

La dose D1 de Métribuzine entraine une réduction de poids similaire à celle de la dose D2 chez les rats mâles et femelles.

Par contre, la chute de poids entraînée par le Mancozèbe est dose dépendante aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles. En effet, les rats traités par la dose D2 de Mancozèbe ont un poids corporel plus faible que celui des autres lots.

#### **II.1.2. Variation de la consommation alimentaire (Tableau 10)**

Au cours de la période d'expérimentation (60 jours), la consommation alimentaire chez les rats témoins et chez les rats expérimentaux traités par les pesticides varie significativement entre les différents lots.

La consommation alimentaire exprimée en (g/j/rat) est significativement diminuée par le traitement aux deux doses de Métribuzine chez les rats mâles et femelles. La réduction est similaire pour D1 et D2 comparée aux valeurs obtenues chez les témoins.

Le traitement par le Mancozèbe entraine aussi une réduction de la consommation alimentaire, plus importante avec la dose D2 comparée à la dose D1 aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

#### **II.1.3. Apport énergétique quotidien chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Tableau 10)**

Quelque soit la dose testée (D1 ou D2) de Métribuzine, l'apport énergétique quotidien chez les rats expérimentaux est significativement diminué chez les rats mâles et femelles. Chez les rats expérimentaux (mâles ou femelles) traités par le Mancozèbe, l'apport énergétique quotidien est significativement plus faible comparé à celui des rats témoins. La valeur la plus faible est obtenue avec la dose D2 du Mancozèbe.

## **II.2. Paramètres biochimiques sanguins**

### **II.2.1. Teneurs sériques en glucose, en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou par le Mancozèbe (Tableau 11)**

#### **II.2.1.1. Teneurs sériques en glucose chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Tableau 11)**

Les rats expérimentaux (mâles ou femelles) traités par la D1 ou la D2 de Métribuzine présentent une augmentation significative du taux sérique de glucose par rapport à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est similaire chez les rats mâles et femelles recevant la dose D1 ou D2.

Cependant, les rats expérimentaux (mâles ou femelles) recevant la dose D1 du Mancozèbe ne montrent aucune variation significative des teneurs sériques en glucose comparées aux valeurs de leurs témoins respectifs.

La dose D2 du Mancozèbe entraîne une augmentation significative du taux sérique de glucose chez les rats expérimentaux mâles ou femelles par rapport aux autres lots de rats.

#### **II.2.1.2. Teneurs sériques en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Tableau 11).**

Quelque soit la dose testée de Métribuzine chez les rats expérimentaux (mâles ou femelles), les teneurs sériques en créatinine et en urée sont significativement augmentées par rapport à leurs rats témoins.

La dose D2 de Métribuzine entraîne une augmentation des teneurs sériques en urée et en créatinine plus importante que la dose D1, aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

Par ailleurs, les teneurs sériques en créatinine et en urée ne varient pas significativement entre les rats expérimentaux recevant la dose D1 du Mancozèbe et les rats témoins des deux sexes.

Cependant, la dose D2 du Mancozèbe provoque une augmentation significative des teneurs sériques en urée et créatinine chez les rats mâles et femelles par rapport aux autres lots.

### **II.2.2. Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 10 et 11; Tableau A4 en annexe)**

#### **II.2.2.1. Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine (Figure 10)**

Les teneurs sériques en cholestérol chez les rats traités par la Métribuzine varient significativement entre les différents lots.

Les teneurs en cholestérol sérique sont augmentées significativement chez les rats traités par la Métribuzine aux deux doses (D1 ou D2) comparées aux valeurs obtenues chez leurs rats témoins.

**Tableau 10. Poids corporel et consommation alimentaire chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Poids corporel (g)</b>	366±10,76 <sup>a</sup>	307±19,57 <sup>b</sup>	296±18,53 <sup>b</sup>	296±11,53 <sup>b</sup>	236±6,98 <sup>c</sup>	233±4,35 <sup>c</sup>	0,006
<b>Nourriture ingérée (g/j/rat)</b>	28±1,09 <sup>a</sup>	21,40±1,30 <sup>b</sup>	20,45±2,02 <sup>b</sup>	22,63±1,21 <sup>b</sup>	19,88±0,62 <sup>c</sup>	18,75±1,32 <sup>c</sup>	0,01
<b>Apport énergétique (Kcal/j/rat)</b>	99,56± 3,33 <sup>a</sup>	75,56±4,55 <sup>c</sup>	72,20±3,24 <sup>c</sup>	80,80±3,75 <sup>b</sup>	70,17±3,11 <sup>c</sup>	67,27±2,88 <sup>d</sup>	0,01
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Poids corporel (g)</b>	366±10,76 <sup>a</sup>	284±12,50 <sup>b</sup>	239±10,65 <sup>d</sup>	296±11,53 <sup>b</sup>	257±10 <sup>c</sup>	217±10,70 <sup>e</sup>	0,0001
<b>Nourriture ingérée (g/j/rat)</b>	28±1,09 <sup>a</sup>	20±1,04 <sup>c</sup>	14,50±1,54 <sup>e</sup>	22,63±1,21 <sup>b</sup>	16,08±1,32 <sup>d</sup>	12,61±1,21 <sup>e</sup>	0,001
<b>Apport énergétique (Kcal/j/rat)</b>	99,56± 3,33 <sup>a</sup>	70,50±4,43 <sup>c</sup>	52±4,25 <sup>d</sup>	80,80±3,75 <sup>b</sup>	56,64±3,11 <sup>d</sup>	44,50±4,44 <sup>e</sup>	0,001

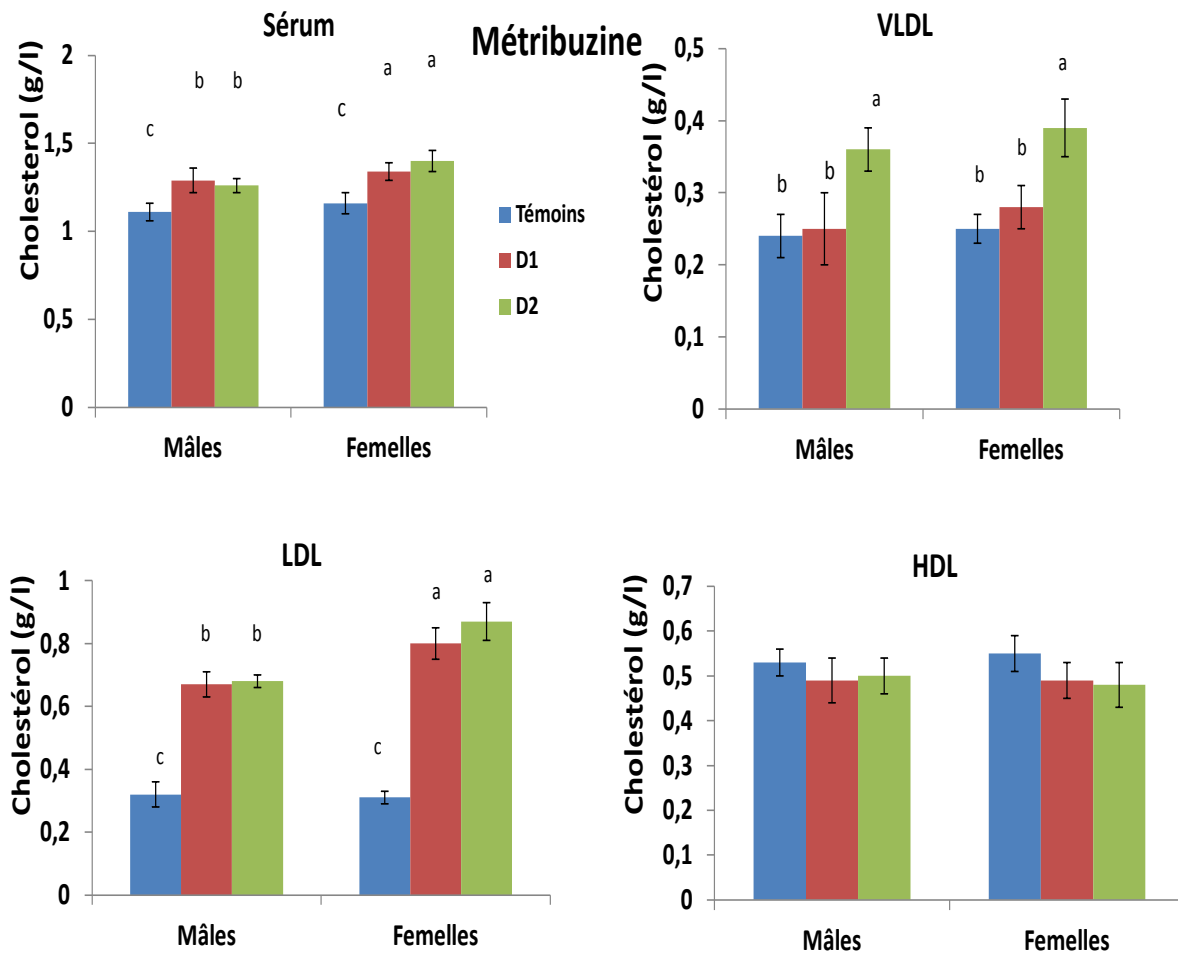
Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

RESULTATS ET INTERPRETATION

**Tableau 11. Teneurs sériques en glucose, en urée et en créatinine chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Glucose (g/L)</b>	1,13±0,18 <sup>c</sup>	2,25±0,21 <sup>a</sup>	2,50±0,23 <sup>a</sup>	1,17±0,16 <sup>c</sup>	2,07±0,16 <sup>b</sup>	2,02±0,13 <sup>b</sup>	0,006
<b>Urée (g/L)</b>	0,24±0,02 <sup>d</sup>	0,57±0,03 <sup>b</sup>	0,67±0,03 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>d</sup>	0,44±0,03 <sup>c</sup>	0,59±0,03 <sup>b</sup>	0,004
<b>Créatinine (mg/L)</b>	14±1,11 <sup>d</sup>	30±1,54 <sup>c</sup>	42±2,07 <sup>b</sup>	12,23±1,52 <sup>d</sup>	50±2,31 <sup>a</sup>	40±1,66 <sup>b</sup>	0,006
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Glucose (g/L)</b>	1,13±0,18 <sup>b</sup>	1,28±0,14 <sup>b</sup>	1,67±0,11 <sup>a</sup>	1,17±0,16 <sup>b</sup>	1,15±0,14 <sup>b</sup>	1,89±0,13 <sup>a</sup>	0,01
<b>Urée (g/L)</b>	0,24±0,02 <sup>b</sup>	0,27±0,03 <sup>b</sup>	0,62±0,03 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>b</sup>	0,25±0,04 <sup>b</sup>	0,58±0,03 <sup>a</sup>	0,01
<b>Créatinine (mg/L)</b>	14±1,11 <sup>b</sup>	15±1,14 <sup>b</sup>	26,24±2,31 <sup>a</sup>	11,23±1,52 <sup>c</sup>	11,65±1,03 <sup>c</sup>	24,14±1,63 <sup>a</sup>	0,01

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P< 0,05).



**Figure 10. Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

## RESULTATS ET INTERPRETATION

L'augmentation des teneurs en cholestérol sérique est similaire aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

Les teneurs en cholestérol des VLDL ne varient pas significativement entre les rats expérimentaux recevant la dose D1 de Métribuzine et les rats témoins des deux sexes. Par contre, chez les rats traités par la dose D2 de Métribuzine, les teneurs en cholestérol des VLDL sont significativement augmentées par rapport aux autres lots.

Par ailleurs, les teneurs en cholestérol des LDL des rats traités par la Métribuzine sont significativement augmentées chez les rats expérimentaux comparés aux témoins, quelque soit la dose utilisée.

Chez les rats traités par la Métribuzine et quelque soit la dose D1 ou D2, les teneurs en cholestérol des HDL ne varient pas significativement aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

### **II.2.2.2. Teneurs en cholestérol (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe (Figure 11)**

Les teneurs en cholestérol des rats traités par le Mancozèbe sont significativement différents. Les teneurs en cholestérol sérique ne varient pas chez les rats traités par la dose D1 de Mancozèbe par rapport à leurs rats témoins.

Cependant, une augmentation significative des teneurs sériques en cholestérol est notée chez les rats mâles et femelles traités par la dose D2 du Mancozèbe par rapport aux autres lots de rats.

Les teneurs en cholestérol des VLDL ne varient pas significativement chez les rats mâles et femelles traités par la dose D1 du Mancozèbe comparés à leurs témoins.

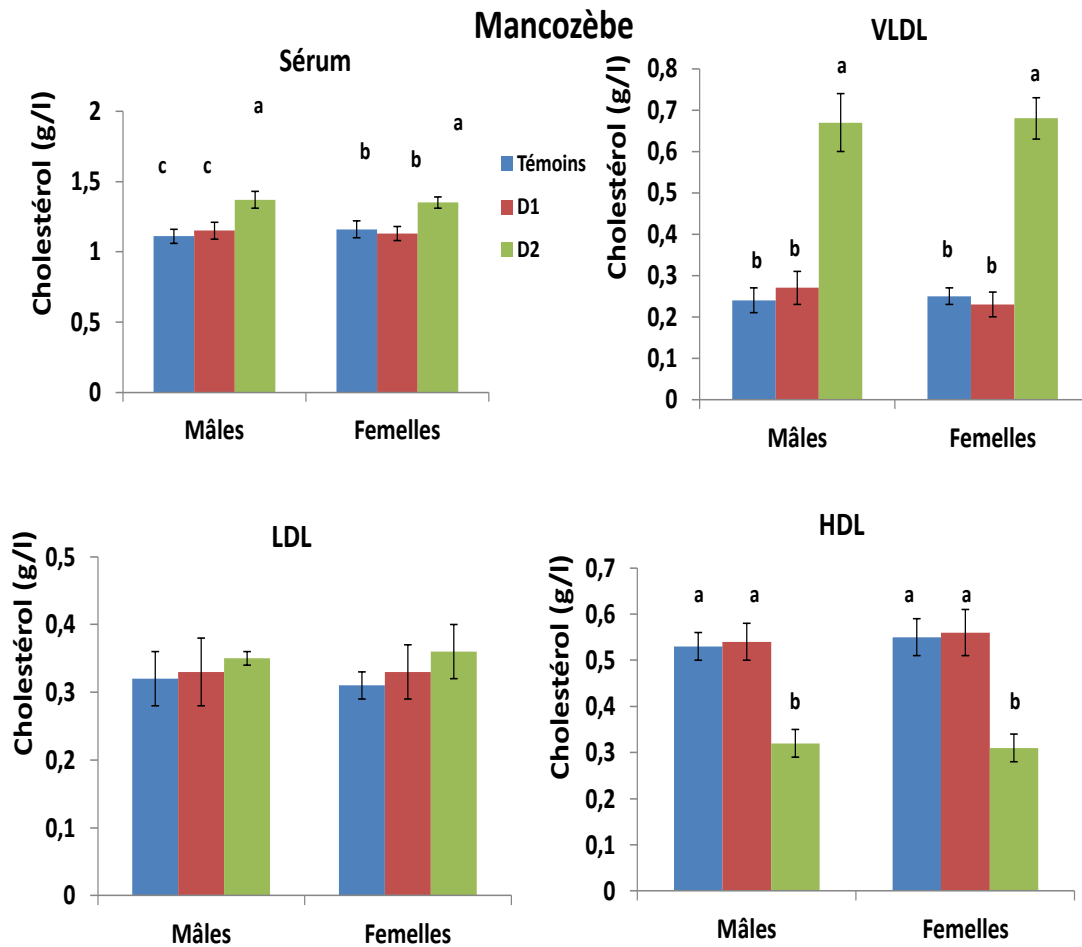
Par contre, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une augmentation significative dans les teneurs en cholestérol des VLDL par rapport aux autres lots de rats.

Les teneurs en cholestérol des LDL ne varient pas chez les rats mâles et femelles traités par le Mancozèbe quelque soit la dose utilisé (D1 ou D2).

Les teneurs en cholestérol au niveau des HDL chez les rats mâles et femelles traités par la dose D1 du Mancozèbe sont similaires à celles des rats témoins.

Par contre, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une chute significative des teneurs en cholestérol des HDL par rapport autres lots de rats.





**Figure 11. Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### **II.2.3. Teneurs en Triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 12 et 13; Tableau A5 en annexe)**

#### **II.2.3.1. Teneurs en Triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine (Figure 12)**

Chez les rats traités par la Métribuzine, les teneurs sériques en triglycérides varient significativement entre les différents lots.

Les teneurs en triglycérides sériques sont significativement augmentées chez les rats mâles et femelles traités par rapport aux rats témoins quelque soit la dose testée. La dose D2 entraîne une augmentation beaucoup plus importante que celle de la dose D1.

Quelque soit la dose testée de la Métribuzine, une augmentation hautement significative des teneurs en triglycérides des VLDL est notée chez les rats mâles et femelles. Cette augmentation entraînée par la Métribuzine est dose-dépendante, aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

Par contre, aucune variation n'a été observée dans les teneurs en triglycérides des LDL et des HDL chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses (D1 ou D2) de Métribuzine par rapport à leurs rats témoins.

#### **II.2.3.2. Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe (Figure 13)**

Les teneurs sériques en triglycérides varient significativement entre les différents lots.

La dose D1 du Mancozèbe utilisée chez les rats mâles et femelles n'entraîne aucune variation dans les teneurs sériques en triglycérides par rapport à leurs témoins.

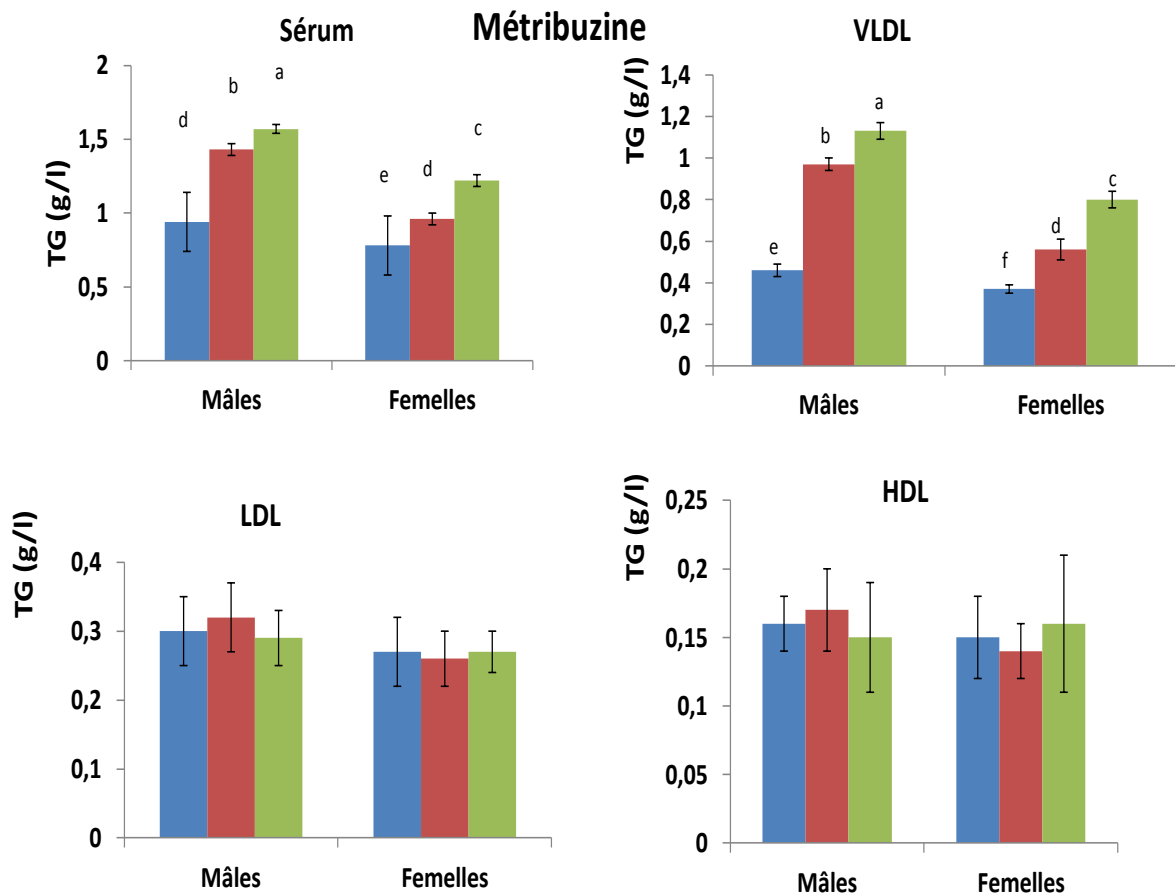
Par contre, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une augmentation significative dans les teneurs en triglycérides sériques comparées aux valeurs obtenues chez les rats témoins.

Chez les rats traités par la dose D1 du Mancozèbe, les teneurs en triglycérides des VLDL ne présentent aucune variation par rapport aux rats témoins.

Cependant, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une augmentation significative des teneurs en triglycérides des VLDL par rapport à leurs témoins. Cette augmentation est similaire chez les lots de rats mâles et les lots de rats femelles.

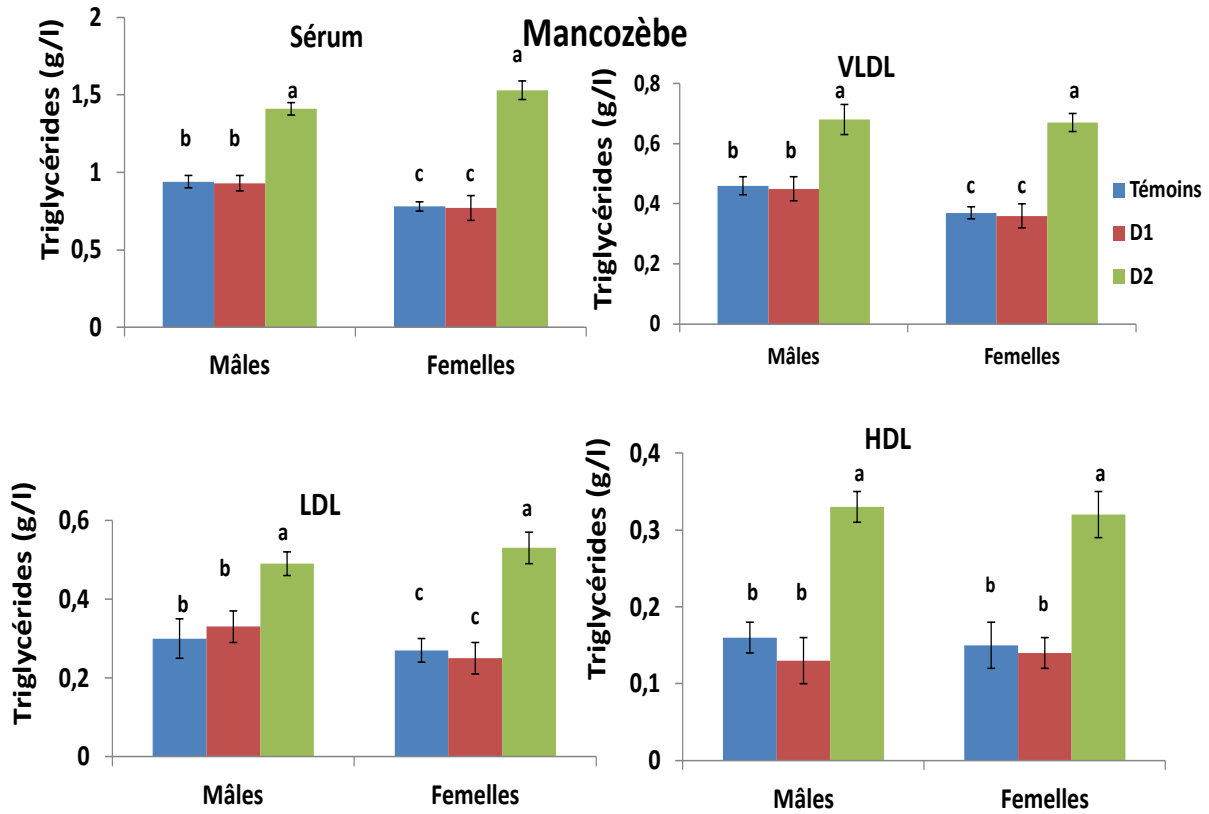
Aucune variation n'est observée dans les teneurs en triglycérides des LDL et des HDL chez les rats traités par la dose D1 du Mancozèbe par rapport aux rats témoins.

Par contre, les teneurs en TG-LDL et en TG-HDL sont augmentées significativement chez les rats traités par la dose D2 du Mancozèbe par rapport aux témoins.



**Figure 12. Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).



**Figure 13. Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

## **II.2.4. Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Tableau 12)**

### **II.2.4.1. Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine (Tableau 12)**

Les teneurs en protéines des VLDL et des LDL chez les rats mâles et femelles traités par la dose D1 de Métribuzine ne présentent aucune variation par rapport aux rats témoins. Cependant, les teneurs en protéines au niveau des VLDL et des LDL sont augmentées significativement chez les rats traités par la dose D2 par rapport aux rats témoins.

Les teneurs en protéines des HDL chez les rats traités par la Métribuzine à la dose D1 sont similaires à celles des rats témoins

Cependant, les teneurs en protéines au niveau des HDL chez les rats traités par la dose D2 de Métribuzine sont significativement diminuées par rapport aux valeurs chez les rats témoins.

### **II.2.4.2. Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe (Tableau 12)**

Les teneurs en protéines des VLDL et des LDL ne varient pas chez les rats traités par les deux doses du Mancozèbe (D1 ou D2) comparés aux rats témoins.

Par ailleurs, les teneurs en protéines des HDL chez les rats traités par la dose D1 du Mancozèbe sont similaires aux valeurs obtenues chez leurs témoins.

La dose D2 du Mancozèbe entraîne une diminution significative du taux des protéines des HDL chez les rats expérimentaux par rapport à leurs témoins.

## **II.3. Poids et Paramètres biochimiques des organes.**

### **II.3.1. Effets des pesticides sur le poids des organes (Figures 14 et 15; Tableau A6 en annexe)**

#### **II.3.1.1. Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par la Métribuzine (Figure 14)**

Les poids des organes chez les rats traités par la Métribuzine sont significativement différents de ceux des rats témoins. La dose D1 de Métribuzine chez les rats mâles et femelles ne provoque aucune modification des poids des foies par rapport aux valeurs témoins. Cependant, la dose D2 de Métribuzine entraîne une augmentation hautement significative des poids des foies par rapport aux témoins.

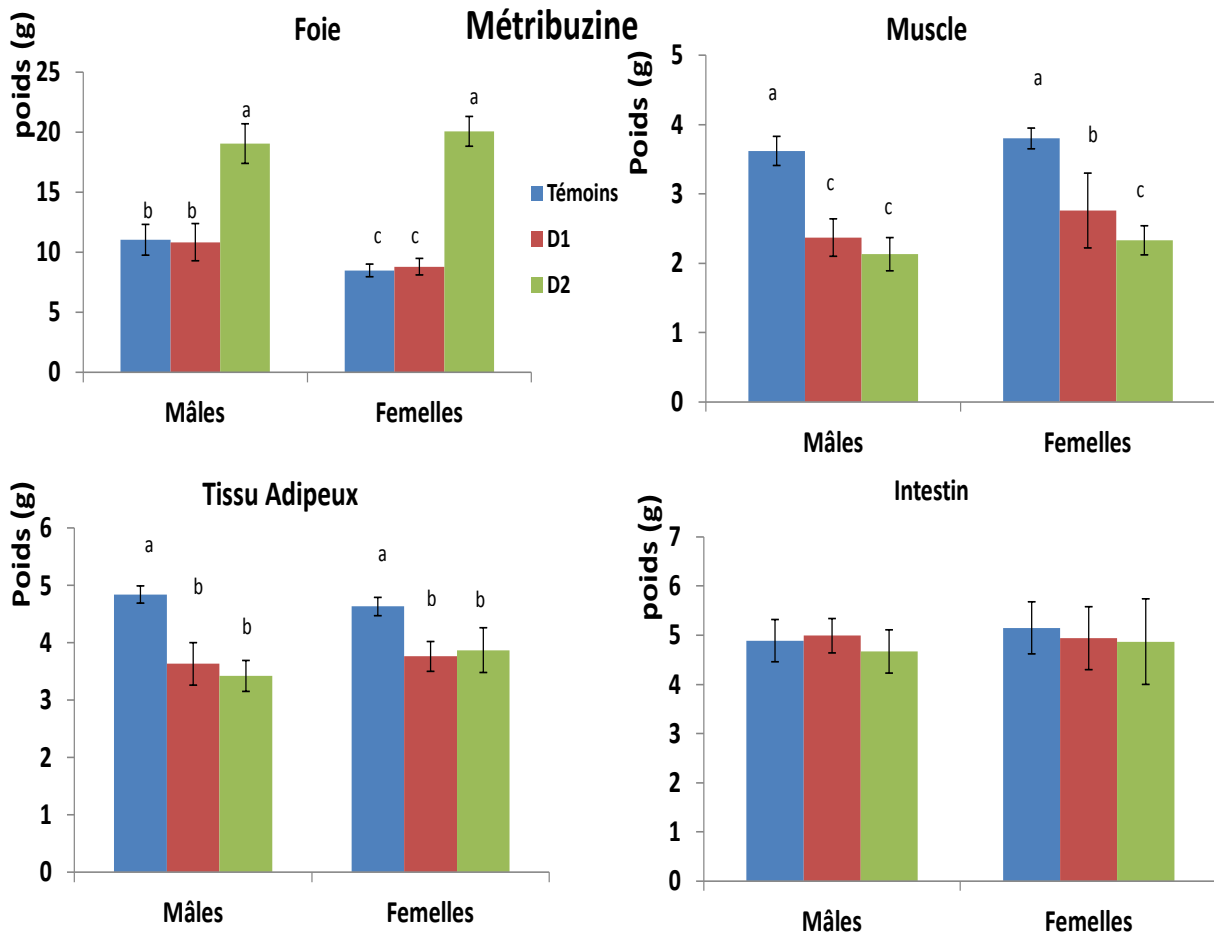
La dose D1 et D2 de Métribuzine entraîne une diminution significative des poids des muscles et des tissus adipeux chez les rats expérimentaux par rapport aux rats témoins. Chez les rats mâles et

RESULTATS ET INTERPRETATION

**Tableau 12. Teneurs en protéines (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par le Métribuzine ou le Mancozèbe**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>VLDL (g/L)</b>	0,37±0,02 <sup>c</sup>	0,44±0,06 <sup>c</sup>	0,83±0,07 <sup>b</sup>	0,38±0,05 <sup>c</sup>	0,43±0,05 <sup>c</sup>	1,29±0,06 <sup>a</sup>	0,004
<b>LDL (g/L)</b>	0,32±0,05 <sup>b</sup>	0,36±0,04 <sup>b</sup>	0,85±0,06 <sup>a</sup>	0,34±0,04 <sup>b</sup>	0,35±0,02 <sup>b</sup>	0,97±0,06 <sup>a</sup>	0,01
<b>HDL (g/L)</b>	0,87±0,06 <sup>a</sup>	0,86±0,06 <sup>a</sup>	0,54±0,04 <sup>b</sup>	0,91±0,07 <sup>a</sup>	0,87±0,02 <sup>a</sup>	0,52±0,03 <sup>b</sup>	0,01
<b>Mancozèbe</b>							
<b>VLDL (g/L)</b>	0,37±0,02	0,39±0,03	0,36±0,04	0,35±0,03	0,38±0,05	0,37±0,06	0,156
<b>LDL (g/L)</b>	0,32±0,05	0,34±0,04	0,37±0,05	0,38±0,07	0,34±0,04	0,36±0,04	0,134
<b>HDL (g/L)</b>	0,87±0,06 <sup>a</sup>	0,85±0,05 <sup>a</sup>	0,47±0,03 <sup>b</sup>	1,03±0,11 <sup>a</sup>	0,91±0,07 <sup>a</sup>	0,52±0,04 <sup>b</sup>	0,01

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j); D2: DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).



**Figure 14. Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

## RESULTATS ET INTERPRETATION

femelles traités par la Métribuzine avec les deux doses (D1 ou D2), le poids de l'intestins reste stable.

### **II.3.1.2. Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par le Mancozèbe (Figure 15)**

Les poids des foies et des muscles ne varient pas significativement entre les rats mâles et femelles traités par la dose D1 du Mancozèbe par rapport aux rats témoins.

La dose D2 du Mancozèbe entraîne une augmentation significative des poids des foies et une diminution significative des poids des muscles par rapport aux valeurs témoins.

Chez les rats mâles et femelles traités par la dose D1 du Mancozèbe, les poids des tissus adipeux sont significativement diminués par rapport à leurs témoins respectifs.

La dose D2 du Mancozèbe entraîne aussi une chute significative des poids des tissus adipeux, plus importante que celle provoquée par la dose D1.

Quelque soit la dose testée du Mancozèbe (D1 ou D2), aucune variation des poids des intestins des rats mâles et femelles n'est notée.

### **II.3.2. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 16 et 17; Tableau A7 en annexe)**

#### **II.3.2.1. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine (Figure 16)**

Chez les rats traités par la dose D1 et D2 de Métribuzine, les teneurs en lipides totaux au niveau du foie sont augmentées significativement et d'une manière similaire que se soit chez les rats mâles que chez les rats femelles comparées aux valeurs obtenues chez les témoins.

Les rats traités par la dose D2 de Métribuzine ont des teneurs en lipides totaux hépatiques plus importantes que celles obtenues avec la dose D1.

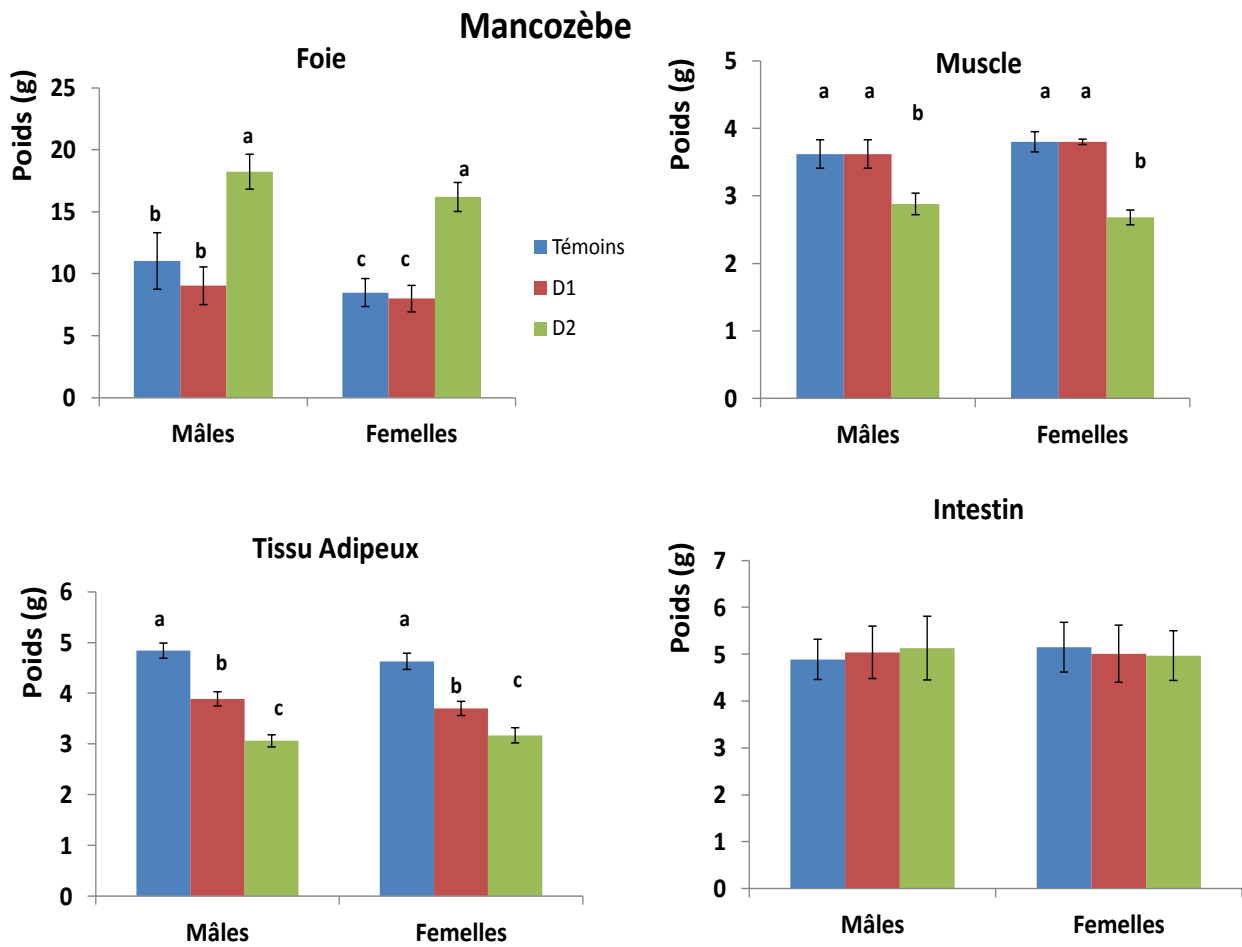
Les teneurs en lipides totaux au niveau du muscle et de l'intestin ne présentent aucune variation chez les rats mâles et femelles traités par la Métribuzine quelque soit la dose utilisée.

Les doses D1 et D2 de Métribuzine chez les rats mâles et femelles entraînent une diminution des teneurs en lipides totaux adipocytaires par rapport à leurs témoins respectifs.

#### **II.3.2.2. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe (Figure 17)**

Les teneurs en lipides totaux au niveau des organes des rats mâles et femelles traités par le Mancozèbe varient significativement entre les différents lots.





**Figure 15. Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

## RESULTATS ET INTERPRETATION

La dose D1 du Mancozèbe n'entraîne aucune variation des teneurs en lipides totaux hépatiques et musculaires aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

Par contre, les teneurs en lipides totaux hépatiques sont significativement augmentées chez les rats mâles et femelles traités par la dose D2 du Mancozèbe par rapport aux valeurs témoins.

Cependant, la dose D2 du Mancozèbe provoque une chute significative des teneurs en lipides totaux du muscle chez les rats mâles et femelles comparés à leurs témoins.

Les teneurs en lipides totaux au niveau du tissu adipeux des rats traités par la dose D1 et D2 du Mancozèbe sont significativement diminuées par rapport aux rats témoins.

Par ailleurs, les teneurs en lipides totaux intestinales ne présentent aucune variation quelque soit la dose du Mancozèbe utilisée.

### **II.3.3. Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Tableau 13)**

#### **II.3.3.1. Teneurs en cholestérol des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine (Tableau 13)**

Les doses D1 et D2 de Métribuzine chez les rats mâles et femelles entraînent une augmentation significative des teneurs en cholestérol hépatique par rapport aux rats témoins ; cette augmentation est plus importante avec D2.

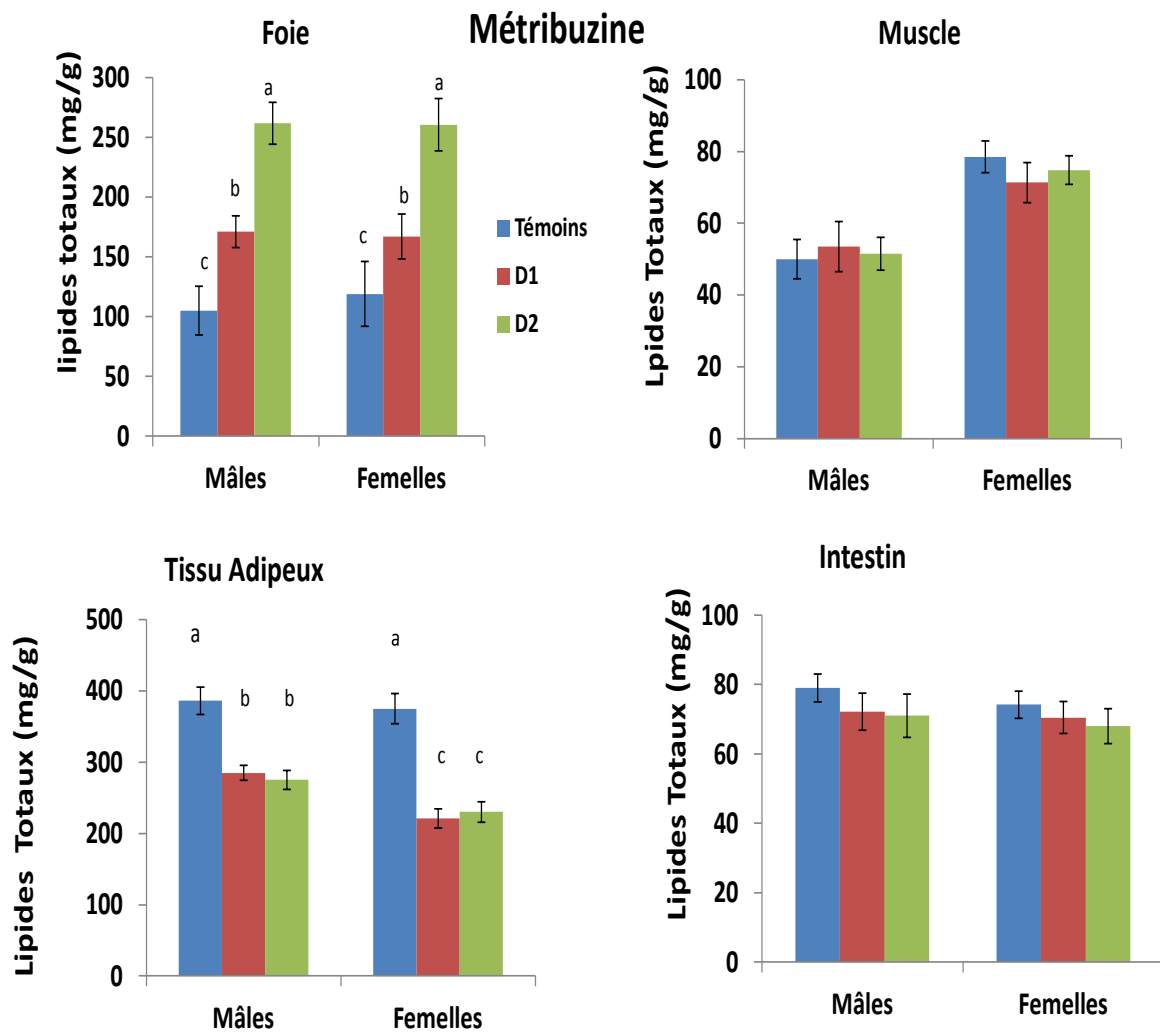
Par ailleurs, aucune variation n'est observée dans les teneurs en cholestérol total des autres organes (muscles, tissus adipeux et intestin) des rats mâles et femelles traités par les deux doses de Métribuzine.

#### **II.3.3.2. Teneurs en cholestérol des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe (Tableau 13)**

Chez les rats traités par la dose D1 du Mancozèbe, aucune modification des teneurs en cholestérol total du foie n'est observée comparées aux valeurs obtenues chez les rats témoins.

Par contre, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une élévation significative des teneurs en cholestérol total hépatique chez les rats traités comparés aux témoins, quelque soit le sexe.

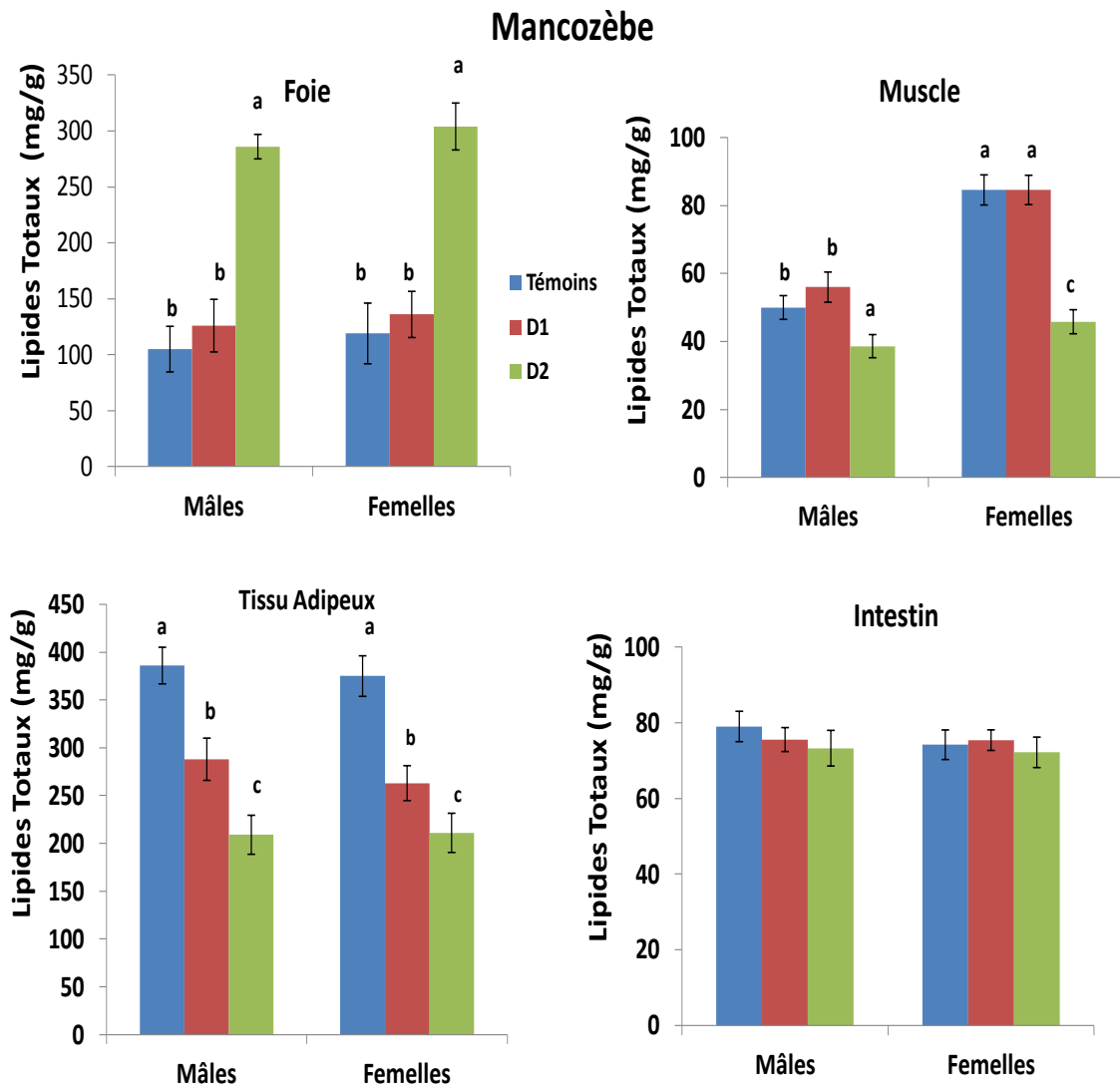
Pour les teneurs en cholestérol total au niveau du muscle et de l'intestin chez les rats traités, aucune variation n'est observée que se soit chez les rats mâles ou chez les rats femelles et quelque soit la dose utilisée. Les teneurs en cholestérol total adipocytaires sont significativement diminuées chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses du Mancozèbe (D1 ou D2) par rapport aux rats témoins. La réduction est plus importante avec la dose D2 du Mancozèbe.



F

**Figure 16. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).



**Figure 17. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

RESULTATS ET INTERPRETATION

**Tableau 13. Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Foie (mg/g)</b>	16±2,55 <sup>c</sup>	27±2,16 <sup>b</sup>	40,61±2,45 <sup>a</sup>	16±1,23 <sup>c</sup>	25,6±1,21 <sup>b</sup>	38,56±2,16 <sup>a</sup>	0,005
<b>Muscle (mg/g)</b>	3,85±0,27	3,72±0,46	3,38±0,56	3,28±0,25	3,64±0,47	3,48±0,56	0,138
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>	9,85±0,46	9,02±1,06	9,80±0,92	10,81±0,49	9,98±0,23	10,25±1,34	0,204
<b>Intestin (mg/g)</b>	6,53±0,67	6,45±0,47	6,59±0,39	5,75±0,58	6 ±0,53	5,84±0,44	0,142
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Foie (mg/g)</b>	16±2,55 <sup>b</sup>	15±1,76 <sup>b</sup>	29±2,18 <sup>a</sup>	16±1,23 <sup>b</sup>	15,67±1,15 <sup>b</sup>	27,98±2,25 <sup>a</sup>	0,01
<b>Muscle (mg/g)</b>	3,85±0,27	3,99±0,23	3,71±0,29	3,28±0,25	3,64±0,22	3,25±0,23	0,127
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>	9,85±0,46 <sup>a</sup>	6,86±0,31 <sup>c</sup>	5,04±0,25 <sup>d</sup>	10,81±0,49 <sup>a</sup>	7,23±0,54 <sup>b</sup>	5,18±0,42 <sup>d</sup>	0,002
<b>Intestin (mg/g)</b>	6,53±0,67	6,58±0,52	6,79±0,66	5,75±0,58	5,86 ±0,62	5,96±0,76	0,136

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

### **II.3.4. Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Tableau 14)**

#### **II.3.4.1. Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine (Tableau 14)**

Les doses D1 et D2 de Métribuzine chez les rats mâles et femelles entraînent une augmentation significative des triglycérides hépatiques par rapport à leurs témoins respectifs ; cette augmentation des triglycérides hépatiques est plus importante avec la dose D2 comparés à celle de la dose D1.

Par ailleurs, aucune variation n'est observée dans les teneurs en triglycérides musculaires et intestinales chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses de Métribuzine.

La dose D1 de Métribuzine chez les rats mâles et femelles entraîne une chute significative des triglycérides adipocytaires par rapport à leurs témoins respectifs.

La dose D2 de Métribuzine entraîne aussi une diminution significative des teneurs en TG adipocytaires plus importante que celle observée avec la dose D1.

#### **II.3.4.2. Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe (Tableau 14).**

Les doses D1 et D2 du Mancozèbe chez les rats mâles et femelles entraînent une augmentation significative des teneurs en triglycérides hépatiques par rapport à leurs témoins respectifs.

La dose D1 de Mancozèbe chez les rats mâles et femelles n'entraîne aucune variation des teneurs en triglycérides musculaires par rapport à leurs rats témoins respectifs.

Cependant, les teneurs en triglycérides musculaires augmentent significativement chez les rats mâles et femelles traités par la dose D2 du Mancozèbe comparés aux autres lots de rats.

Les doses D1 et D2 du Mancozèbe chez les rats mâles et femelles entraînent une diminution significative des TG adipocytaires comparés à leurs témoins respectifs ; variation plus importante avec D2. Par ailleurs, aucune variation n'est observée dans TG intestinaux chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses du Mancozèbe.

### **II.3.5. Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 18 et 19; Tableau A8 en annexe)**

#### **II.3.5.1. Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine (Figure 18)**

Les teneurs en protéines totales au niveau du foie et du muscle chez les rats traités par la Métribuzine sont significativement variables entre les différents lots.

**Tableau 14. Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Foie (mg/g)</b>	45±1,06 <sup>d</sup>	66,05±1,60 <sup>b</sup>	88,08±2,95 <sup>a</sup>	36±1,57 <sup>e</sup>	53,74±1,83 <sup>c</sup>	86±2,24 <sup>a</sup>	0,004
<b>Muscle (mg/g)</b>	20,01±1,53	22,51±2,18	19,31±3,53	23,58±4,28	20,17±2,48	22,35±2,42	0,133
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>	85,44±1,38 <sup>a</sup>	58,3±1,43 <sup>b</sup>	42±1,77 <sup>c</sup>	85±1,39 <sup>a</sup>	40,15±1,81 <sup>c</sup>	33,61±1,55 <sup>d</sup>	0,005
<b>Intestin (mg/g)</b>	23,07±2,45	24,33±1,51	23,30±1,49	22,28±2,71	23,17±1,17	22,43±1,77	0,122
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Foie (mg/g)</b>	45±1,06 <sup>e</sup>	74±1,21 <sup>c</sup>	90,58±1,94 <sup>a</sup>	36±1,57 <sup>f</sup>	65,22±1,83 <sup>d</sup>	81,58±1,12 <sup>b</sup>	0,0001
<b>Muscle (mg/g)</b>	20,01±1,53 <sup>b</sup>	22,65±1,21 <sup>b</sup>	39,4±2,40 <sup>a</sup>	23,58±1,28 <sup>b</sup>	21,87±1,64 <sup>b</sup>	36,58±2,12 <sup>a</sup>	0,004
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>	85,44±1,38 <sup>a</sup>	69±1,62 <sup>b</sup>	50,83±1,95 <sup>d</sup>	85±1,39 <sup>a</sup>	62,6±1,65 <sup>c</sup>	51±1,36 <sup>d</sup>	0,001
<b>Intestin (mg/g)</b>	23,07±2,45	25,71±4,33	24,38±3,17	22,28±2,71	24,17±2,17	22,6±2,31	0,245

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

## RESULTATS ET INTERPRETATION

Les teneurs en protéines hépatiques augmentent significativement chez les rats traités par les doses D1 et D2 de Métribuzine par rapport aux rats témoins. Cet effet est plus marqué avec D2.

Une chute hautement significative des teneurs en protéines musculaires est notée chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses (D1 et D2) de Métribuzine comparées aux valeurs obtenues chez les rats témoins. Cette chute est plus importante chez les rats traités par la dose D2 plus que celle observée avec la dose D1.

Les teneurs en protéines totales adipocytaires et intestinales ne varient pas chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses (D1 et D2) de la Métribuzine.

### **II.3.5.2. Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe (Figure 19)**

Les teneurs en protéines totales au niveau des organes (foie, tissu adipeux et intestin) ne présentent aucune variation significative suite au traitement par les deux doses (D1 ou D2) du Mancozèbe.

Cependant, les teneurs en protéines musculaires sont significativement variables entre les différents lots.

La dose D1 du Mancozèbe chez les rats mâles et femelles n'entraîne aucun changement dans les teneurs en protéines musculaires comparées aux valeurs observées chez leurs témoins respectifs.

Par contre, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une chute significative des protéines musculaires chez les rats traités comparés aux témoins, quelque soit le sexe.

## **II.4. Statut Oxydant/ Antioxydant**

### **II.4.1. Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 20 et 21; Tableau A9 en annexe)**

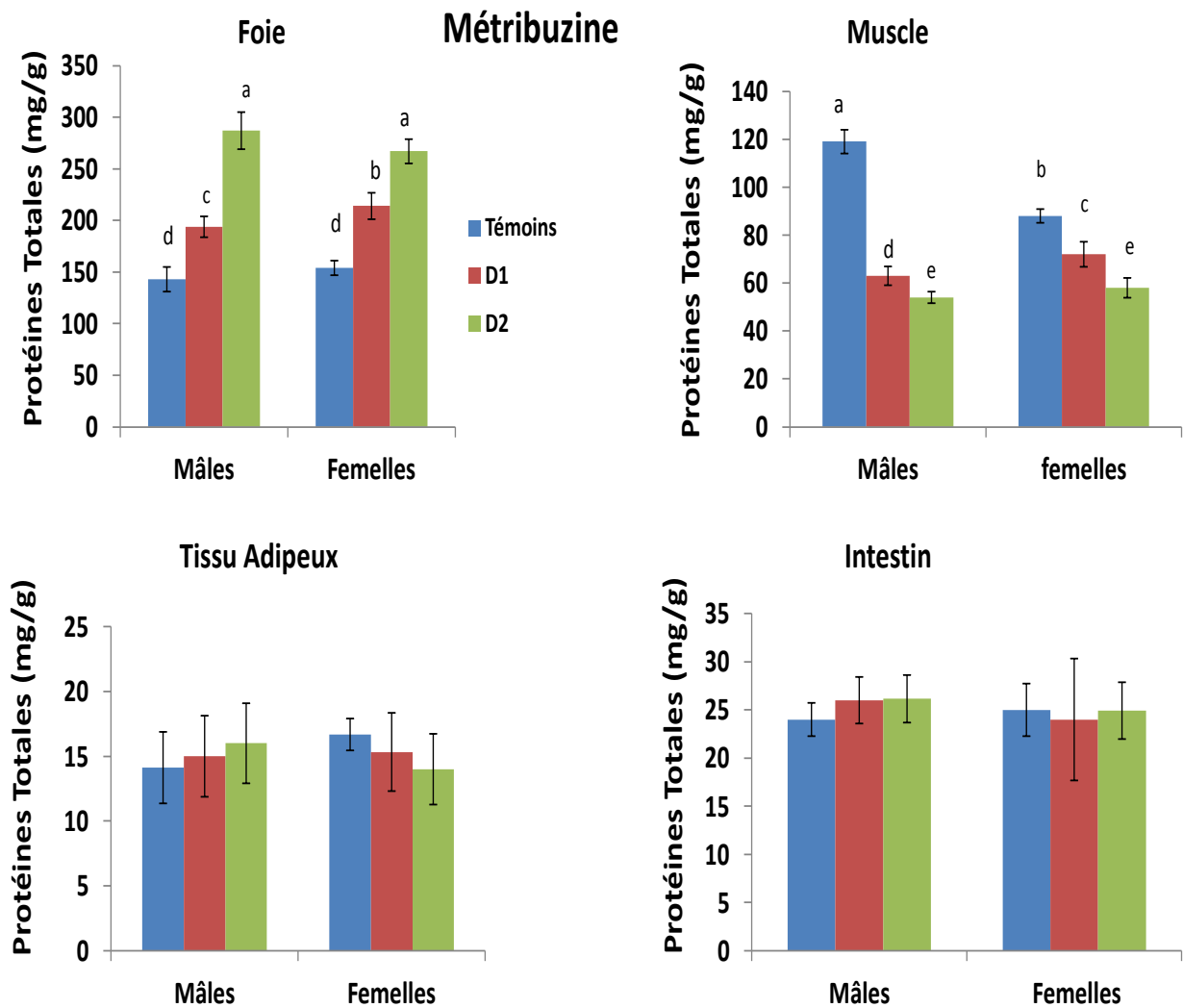
#### **II. 4.1.1. Teneurs sériques en vitamine C chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 20 et 21)**

Les teneurs sériques en vitamine C chez les rats des deux sexes traités par les deux doses de Métribuzine (D1 et D2) sont significativement diminuées par rapport à leurs témoins respectifs.

La dose D1 du Mancozèbe n'entraîne aucun changement des teneurs sériques en vitamine C chez les rats mâles et femelles comparés à leurs témoins respectifs.

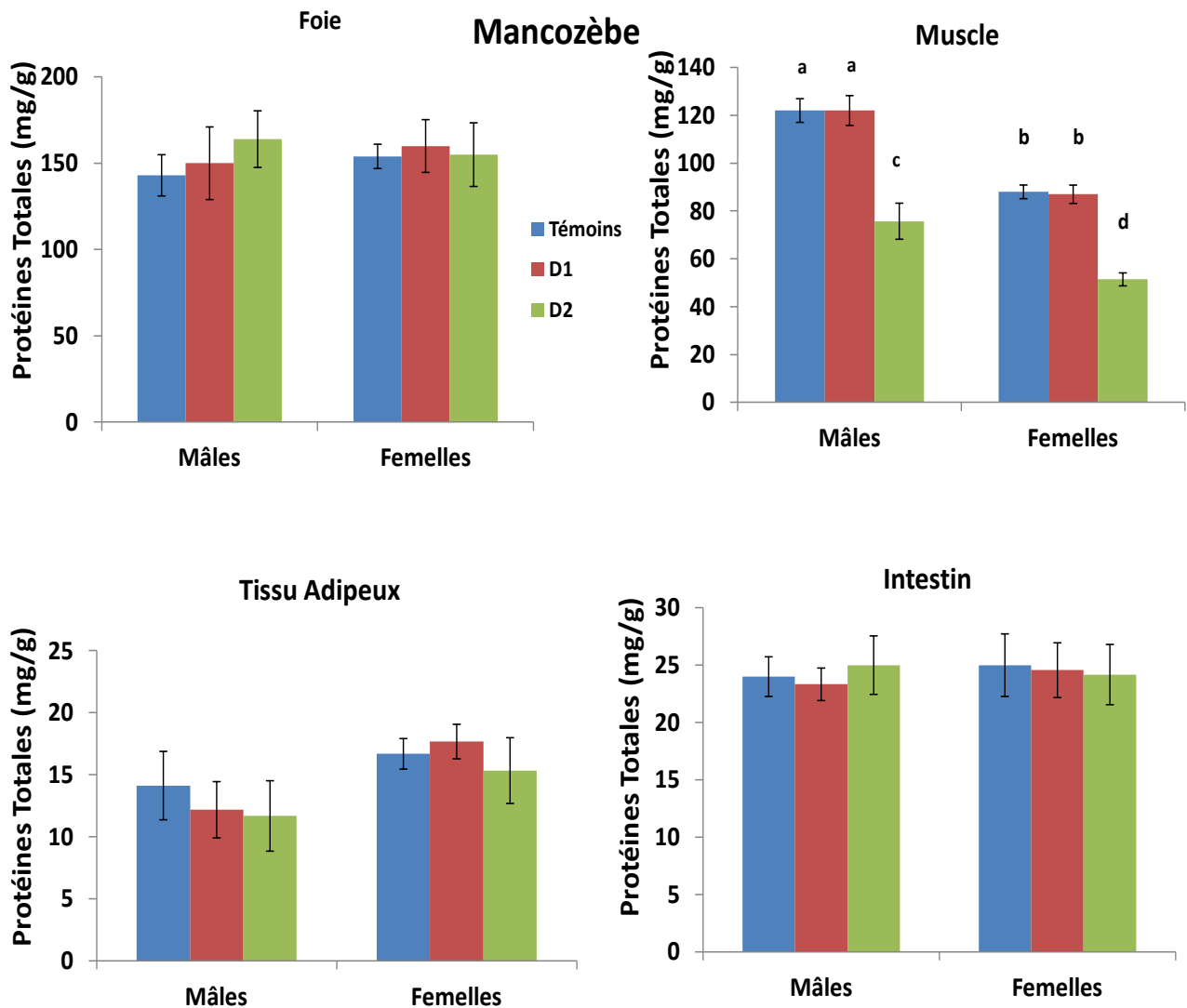
Par contre, chez les rats traités par la dose D2 du Mancozèbe, on a observé une diminution significative des teneurs sériques en vitamine C par rapport à leurs témoins.





**Figure 18. Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j); D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



**Figure 19. Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

#### **II.4.1.2. Teneurs en glutathion érythrocytaire chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 20 et 21)**

Chez les rats traités par les doses D1 et D2 de Métribuzine, les teneurs en glutathion réduit sont significativement diminuées par rapport à leurs témoins.

Chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses (D1 ou D2) du Mancozèbe, les teneurs en glutathion érythrocytaire sont significativement diminuées par rapport à leurs témoins respectifs.

#### **II.4.1.3. Activité érythrocytaire de la catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats expérimentaux (Figures 20 et 21)**

Les rats mâles et femelles traités par l'une des deux doses (D1 ou D2) de Métribuzine ou de Mancozèbe présentent une diminution très significative des activités érythrocytaires de la catalase comparées aux valeurs obtenues chez leurs rats témoins respectifs. Cette chute est beaucoup plus importante avec la dose D2 pour les deux pesticides.

#### **II.4.2. Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 22 et 23; Tableau A10 en annexe).**

##### **II.4.2.1. Teneurs plasmatiques en Malondialdéhyde (MDA) chez les rats témoins et les différents lots de rats expérimentaux (Figures 22 et 23)**

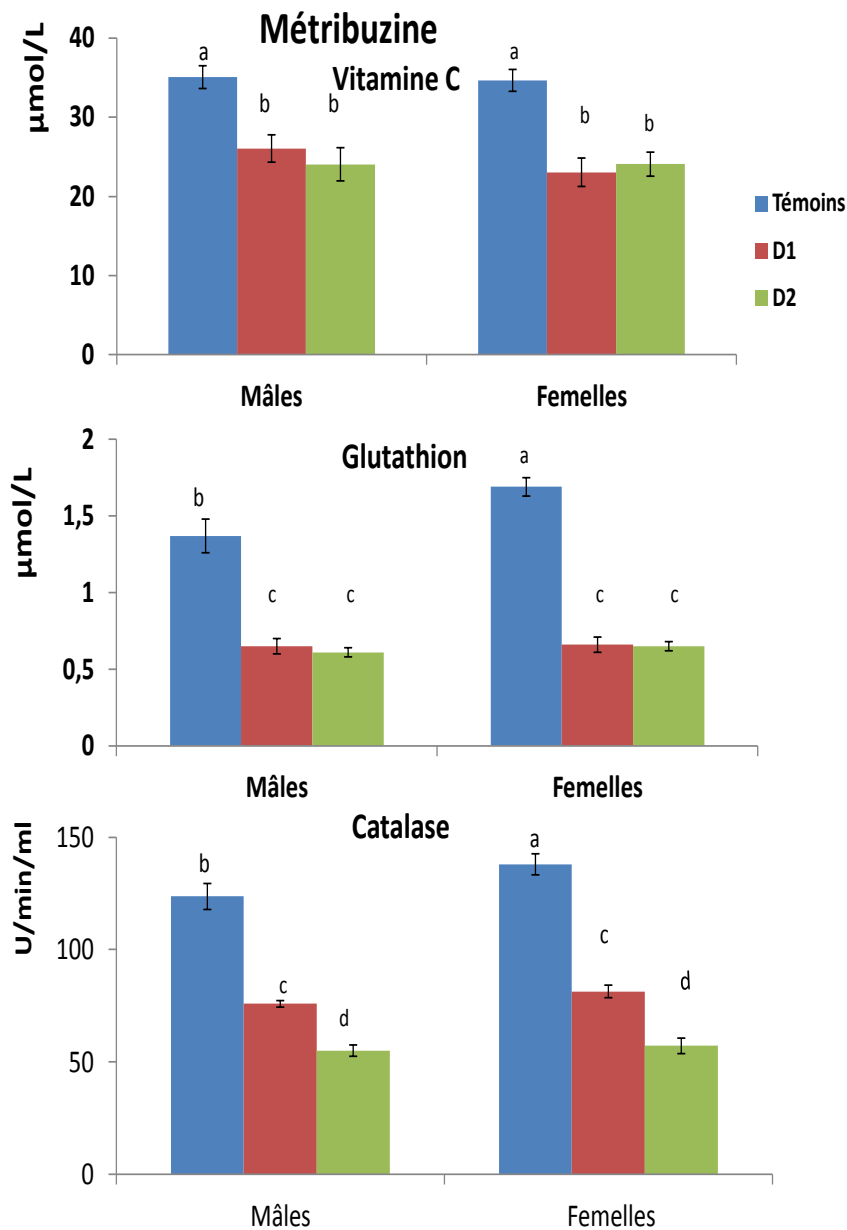
Les teneurs plasmatiques en Malondialdéhyde (MDA) sont significativement différentes chez les rats traités par la Métribuzine et le Mancozèbe.

Chez les rats mâles et femelles traités par la Métribuzine ou par le Mancozèbe et quelque soit la dose utilisée (D1 ou D2), les teneurs plasmatiques en MDA sont significativement augmentées par rapport à leurs témoins respectifs.

La dose D2 pour les deux pesticides entraîne une augmentation du MDA chez les rats des deux sexes plus importante que celle entraînée par la dose D1.

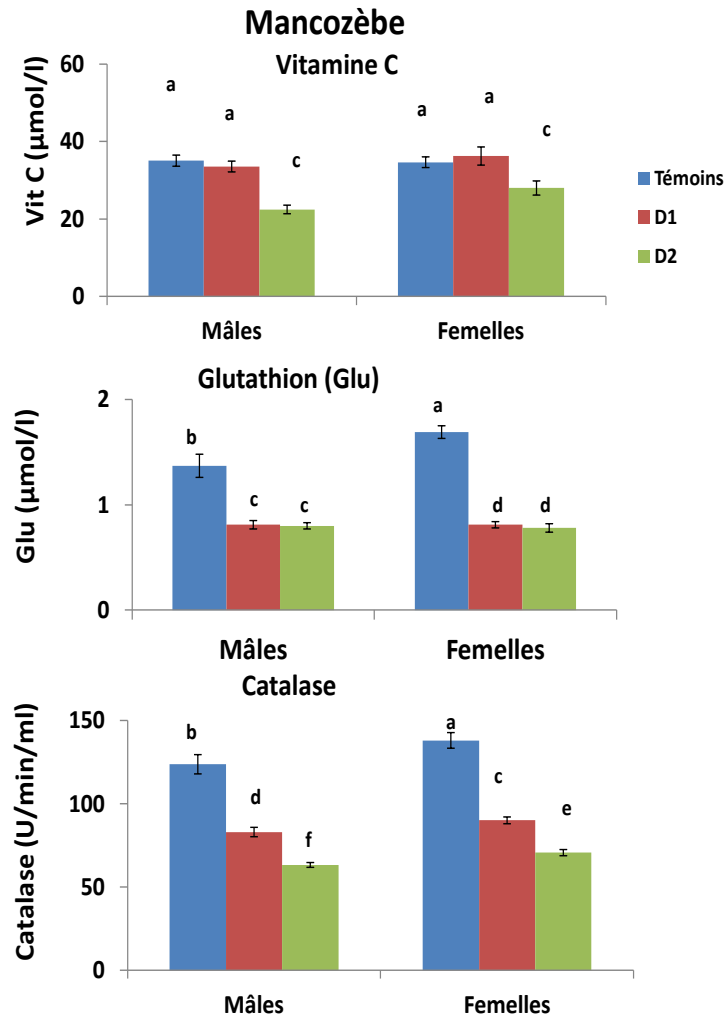
##### **II.4.2.2. Teneurs plasmatiques en Protéines carbonylées chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figure 22 et 23)**

Les rats mâles et femelles traités que se soit avec la Métribuzine ou le Mancozèbe, et quelque soit la dose testée D1 ou D2, présentent des teneurs plasmatiques en protéines carbonylées significativement augmentées comparées aux valeurs témoins. L'effet est plus accentué avec la dose D2.



**Figure 20. Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).



**Figure 21. Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### **II.4.2.3. Teneurs plasmatiques en Diènes conjuguées (DIC) chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 22 et 23)**

Les teneurs plasmatiques en diènes conjuguées chez les rats traités par la Métribuzine varient significativement entre les différents lots.

Les teneurs plasmatiques en diènes conjuguées sont significativement augmentées chez les rats traités par la Métribuzine aussi bien avec la dose D1 que la dose D2.

La dose D2 de la Métribuzine entraîne une augmentation plus importante que celle de la dose D1 chez les rats mâles. Par contre, chez les rats femelles, l'augmentation des teneurs plasmatiques des diènes conjuguées est similaire pour les doses D1 et D2 de Métribuzine.

Les teneurs plasmatiques en diènes conjuguées ne varient pas chez les rats mâles et femelles traités par le Mancozèbe.

### **II.4.3. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 24 et 25 ; Tableau A11 en annexe)**

#### **II.4.3.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau du foie chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 24 et 25)**

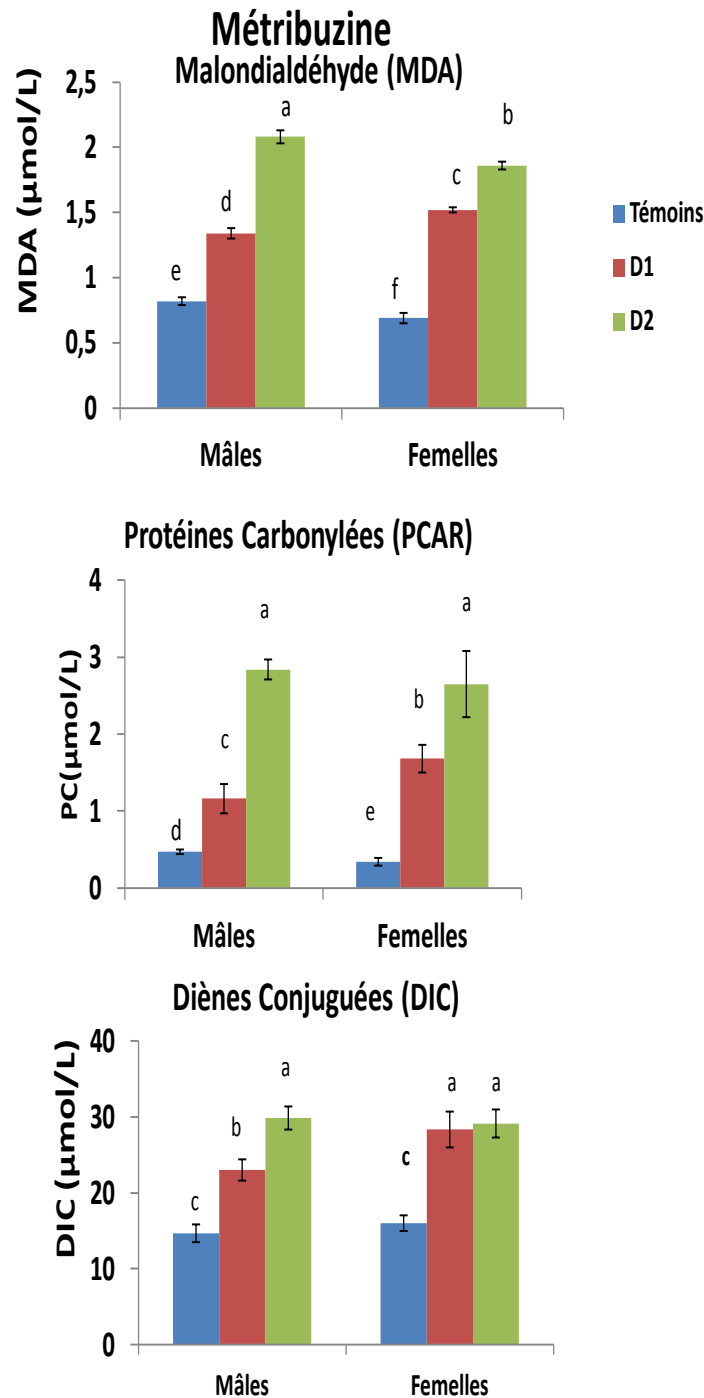
Les teneurs en Malondialdéhyde hépatique chez les rats traités par les pesticides et quelque soit la dose utilisée (D1 ou D2) sont significativement augmentées par rapport à leurs rats témoins respectifs. Pour les deux pesticides, la dose D2 entraîne une augmentation plus importante que celle entraînée par la dose D1.

#### **II.4.3.2. Teneurs en Protéines carbonylées au niveau du foie chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 24 et 25)**

L'analyse des Protéines Carbonylées (PC) hépatiques montre une augmentation significative, quelque soit le type de pesticides utilisé (Métribuzine ou Mancozèbe), et quelque soit la dose testée (D1 ou D2).

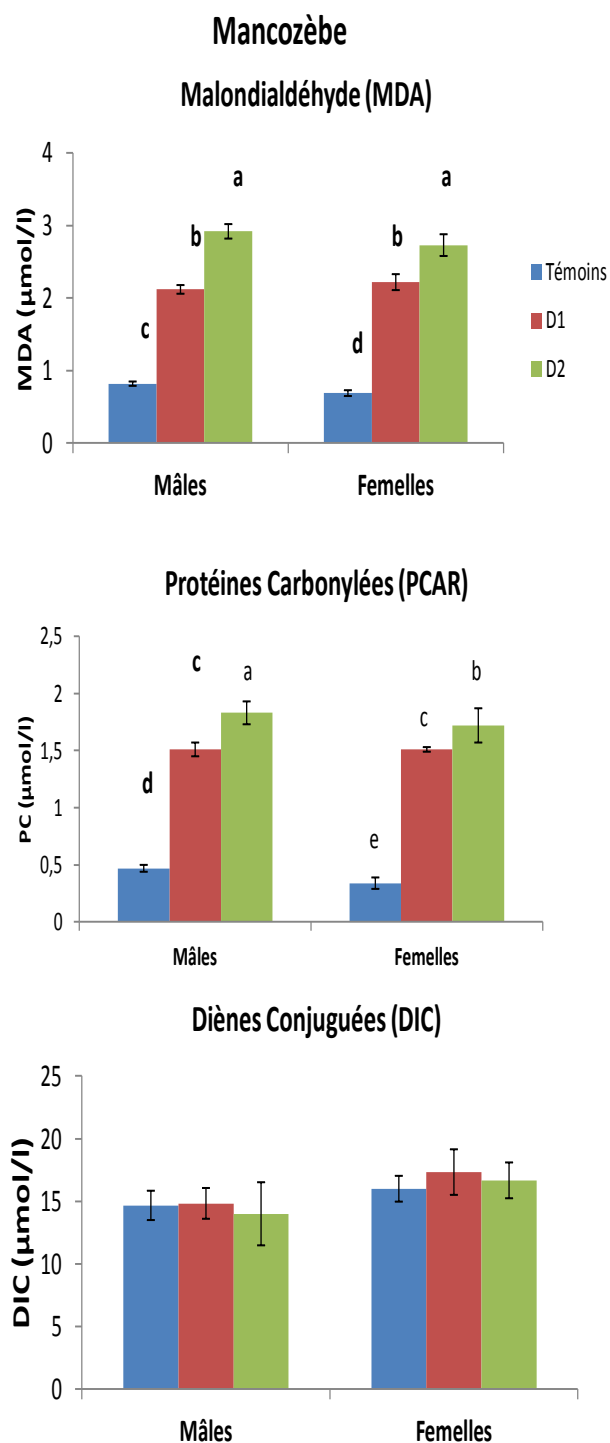
Les doses D1 ou D2 de Métribuzine entraînent une augmentation similaire des teneurs en protéines carbonylées hépatiques aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

Par contre, chez les rats mâles et femelles traités par la dose D2 du Mancozèbe, les teneurs en protéines carbonylées hépatiques sont plus élevées que les résultats obtenues chez les rats traités par la dose D1.



**Figure 22. Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



**Figure 23 : Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



### **II.4.3.3. Teneurs en glutathion au niveau du foie chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 24 et 25)**

Avec les deux types de pesticides, Métribuzine ou Mancozèbe, et avec les différentes doses utilisées (D1 ou D2), les teneurs érythrocytaires en glutathion hépatique sont significativement réduites par rapport aux valeurs obtenues chez les rats témoins.

### **II.4.4. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 26 et 27 ; Tableau A12 en annexe)**

#### **II.4.4.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau du muscle chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 26 et 27)**

Les teneurs en Malondialdéhyde musculaire sont significativement augmentées, quelque soit le type de pesticide utilisé (Métribuzine ou Mancozèbe) chez les rats mâles et femelles, et quelque soit la dose testée (D1 ou D2) par rapport aux valeurs témoins.

#### **II.4.4.2. Teneurs en Protéines carbonylées au niveau du muscle chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 26 et 27)**

Les Protéines Carbonylées (PC) musculaires montrent une augmentation significative, quelque soit le type de pesticide utilisé (Métribuzine ou Mancozèbe), et quelque soit la dose testée (D1 ou D2) par rapport aux valeurs témoins.

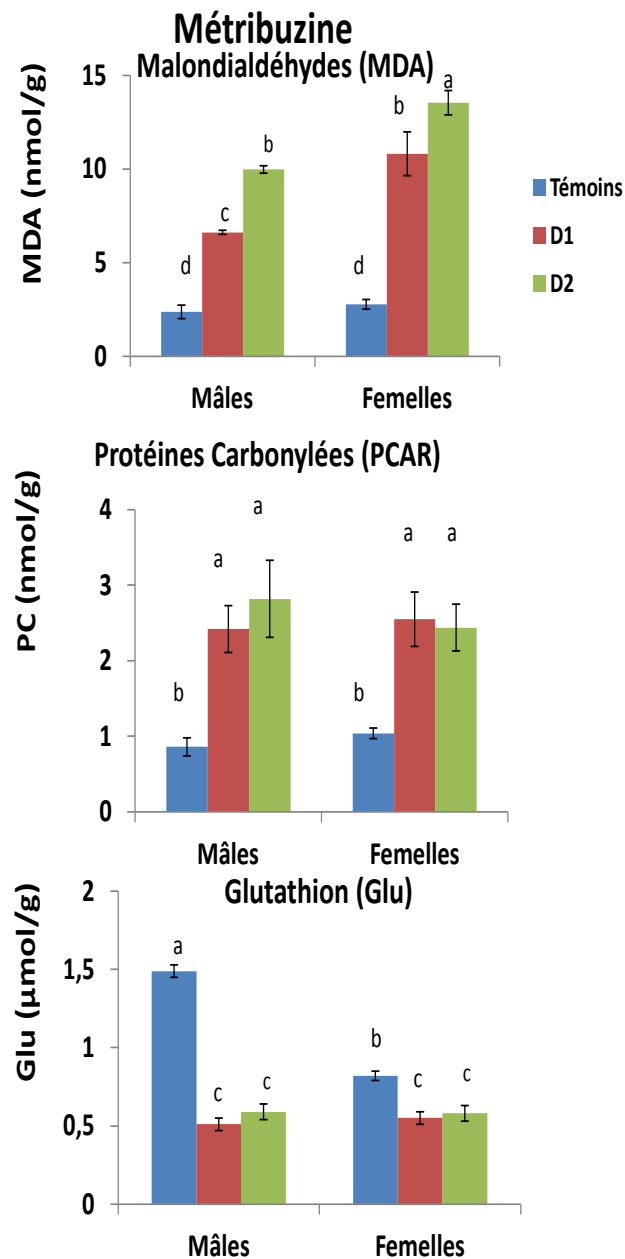
#### **II.4.4.3. Teneurs en glutathion au niveau du muscle chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 26 et 27)**

Avec les deux types de pesticides (Métribuzine ou Mancozèbe) et avec les deux doses utilisées (D1 ou D2), les teneurs en glutathion musculaire n'ont subi aucun changement par rapport aux valeurs obtenues chez les témoins.

### **II.4.5. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 28 et 29; Tableau A13)**

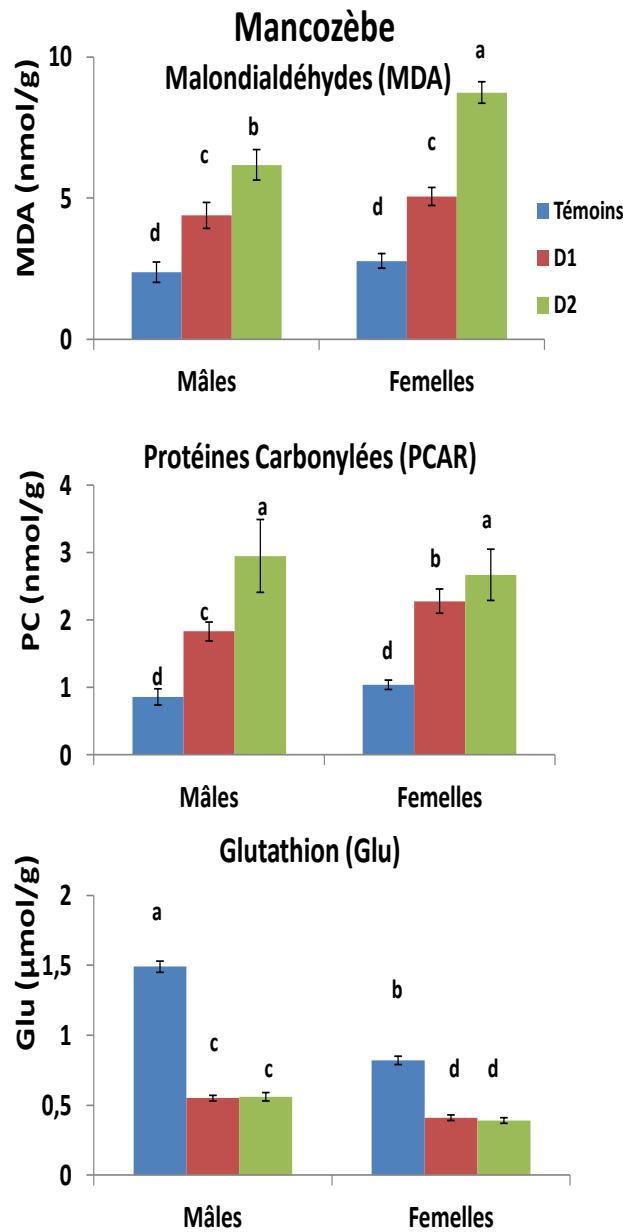
#### **II.4.5.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau de tissu adipeux chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 28 et 29)**

Les teneurs en MDA du Tissu Adipeux des rats mâles et femelles traités par les deux pesticides et quelque soit la dose testée (D1 ou D2) sont significativement élevées par rapport à leurs témoins respectifs.



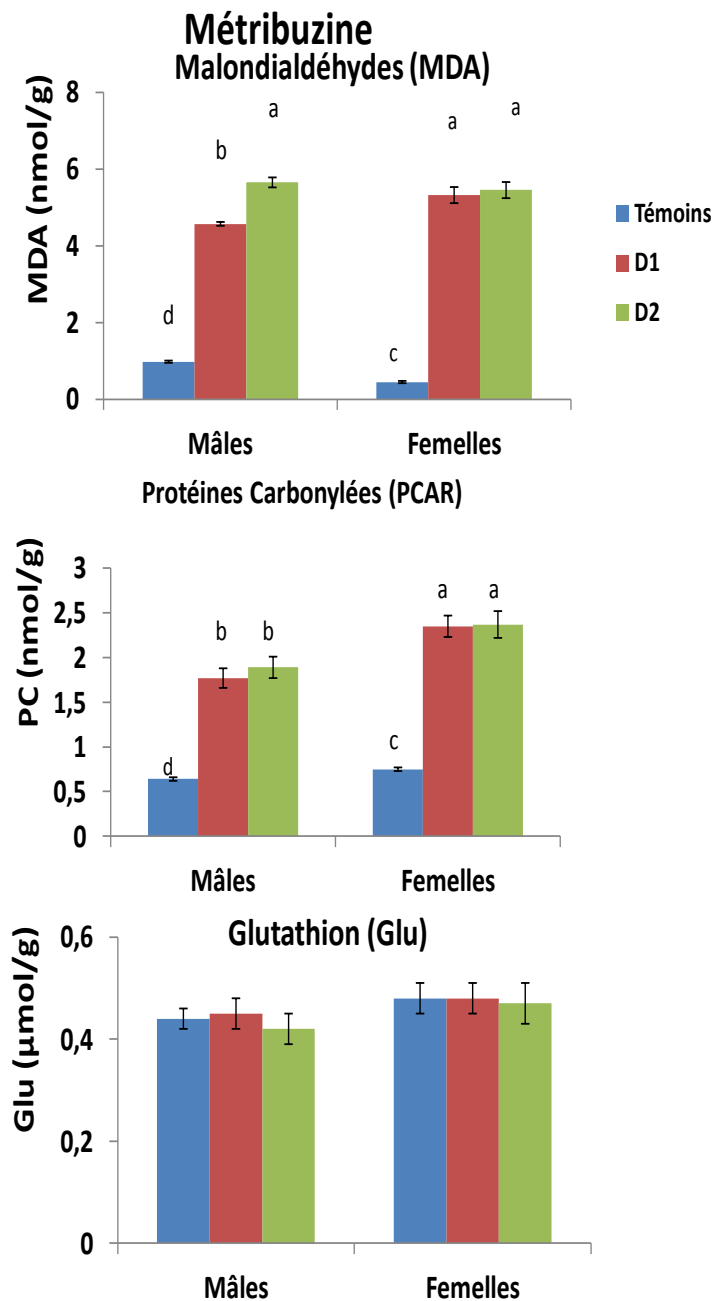
**Figure 24. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j); D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



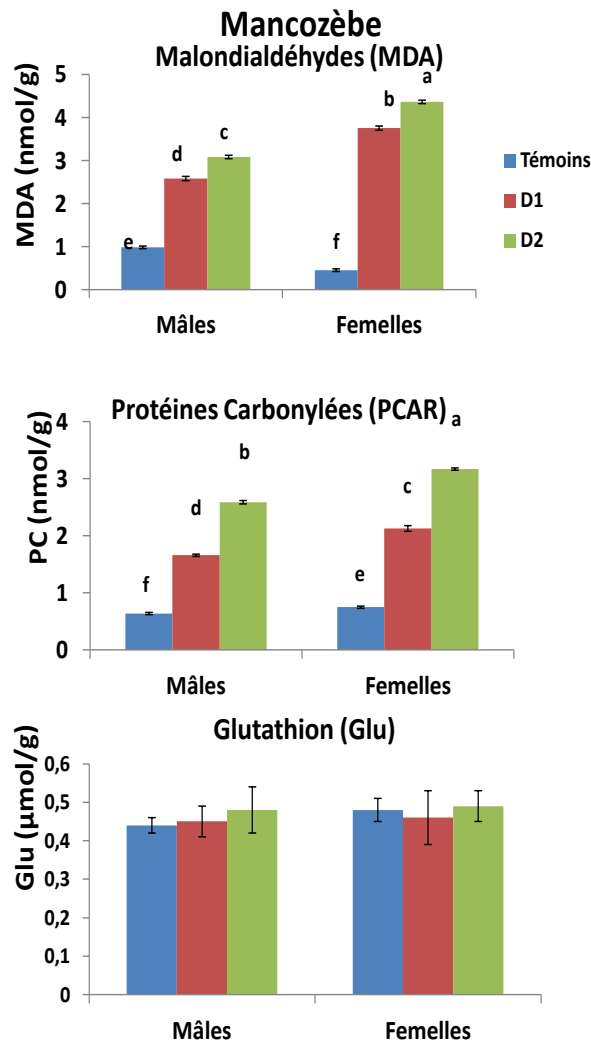
**Figure 25. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).



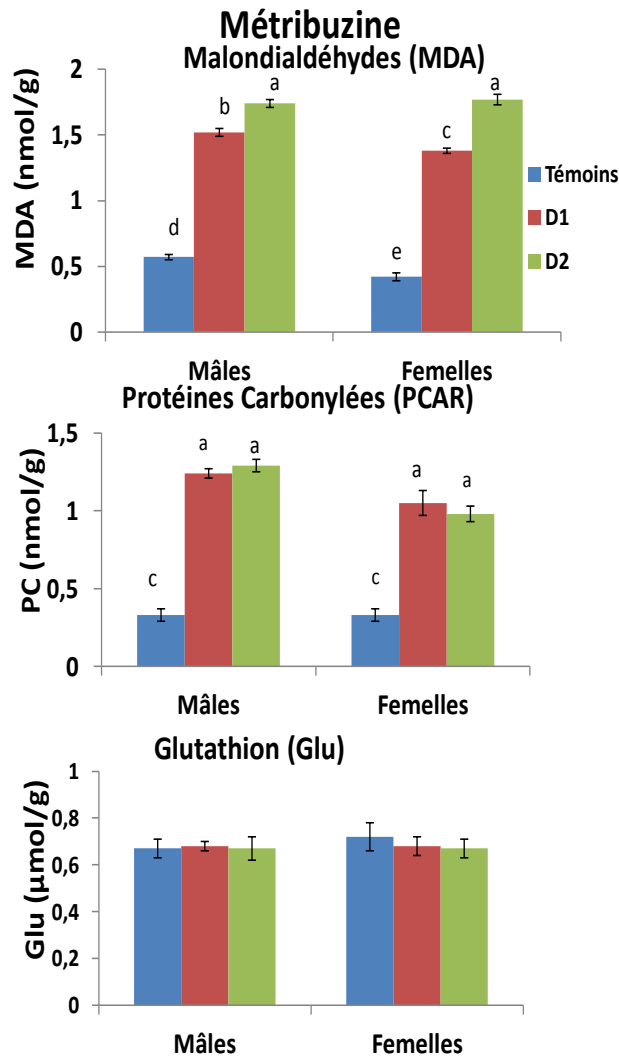
**Figure 26. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



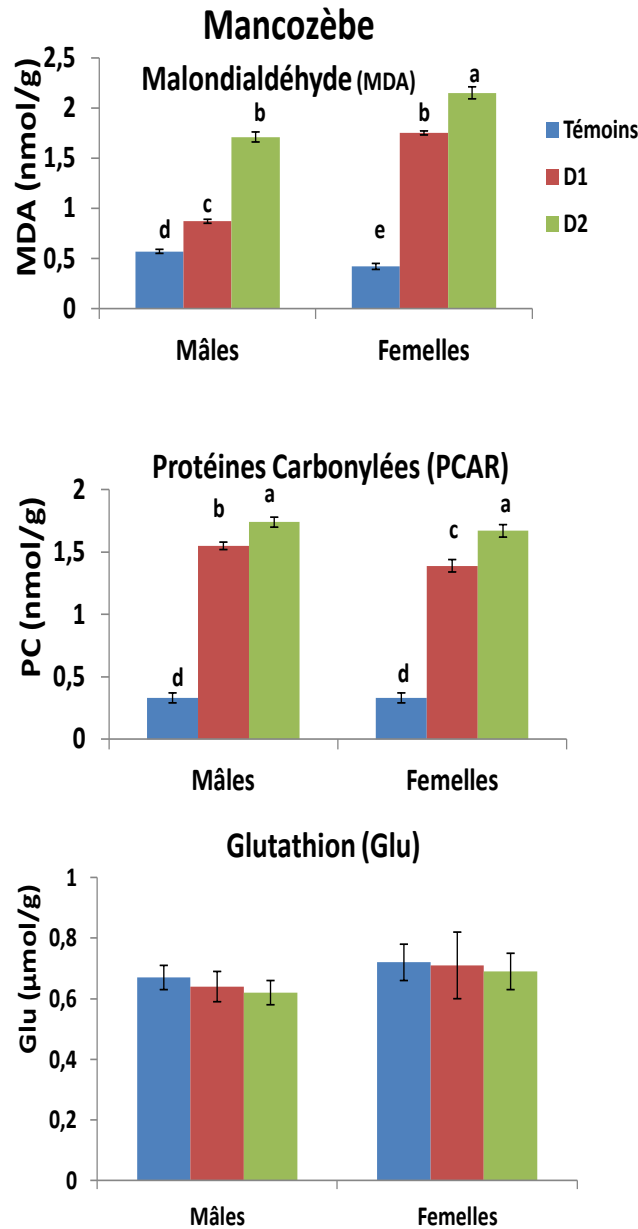
**Figure 27. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



**Figure 28. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



**Figure 29. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les rats traités par le Mancozèbe.**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

## RESULTATS ET INTERPRETATION

Quelque soit le pesticides utilisé, les teneurs en MDA du tissu adipeux sont augmentées significativement avec la dose D2 plus que la dose D1 aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

### **II.4.5.2. Teneurs en protéines carbonylées au niveau de tissu adipeux chez les rats témoins et différents lots de rats expérimentaux (Figures 28 et 29)**

Les teneurs en Protéines Carbonylées (PC) du Tissus Adipeux sont augmentées significativement quelque soit le type de pesticide utilisé (Métribuzine ou Mancozèbe), et quelque soit la dose testée (D1 ou D2) chez les rats traités versus témoins.

### **II.4.5.3. Teneurs en glutathion au niveau de tissu adipeux chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 28 et 29).**

Pour les deux types de pesticides (Métribuzine ou Mancozèbe) et avec les deux doses utilisées (D1 ou D2), les valeurs obtenues concernant les teneurs en glutathion du tissu adipeux ne présentent aucune variation significative aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.

### **II.4.6. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe (Figures 30 et 31; Tableau A14 en annexe)**

#### **II.4.6.1. Teneurs en Malondialdéhyde (MDA) au niveau de l'intestin chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 30 et 31)**

Les teneurs en MDA de l'intestin chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe et quelque soit la dose utilisée D1 ou D2 sont significativement élevées par rapport aux valeurs témoins. Les valeurs les plus élevées sont obtenues avec la dose D2 du Mancozèbe.

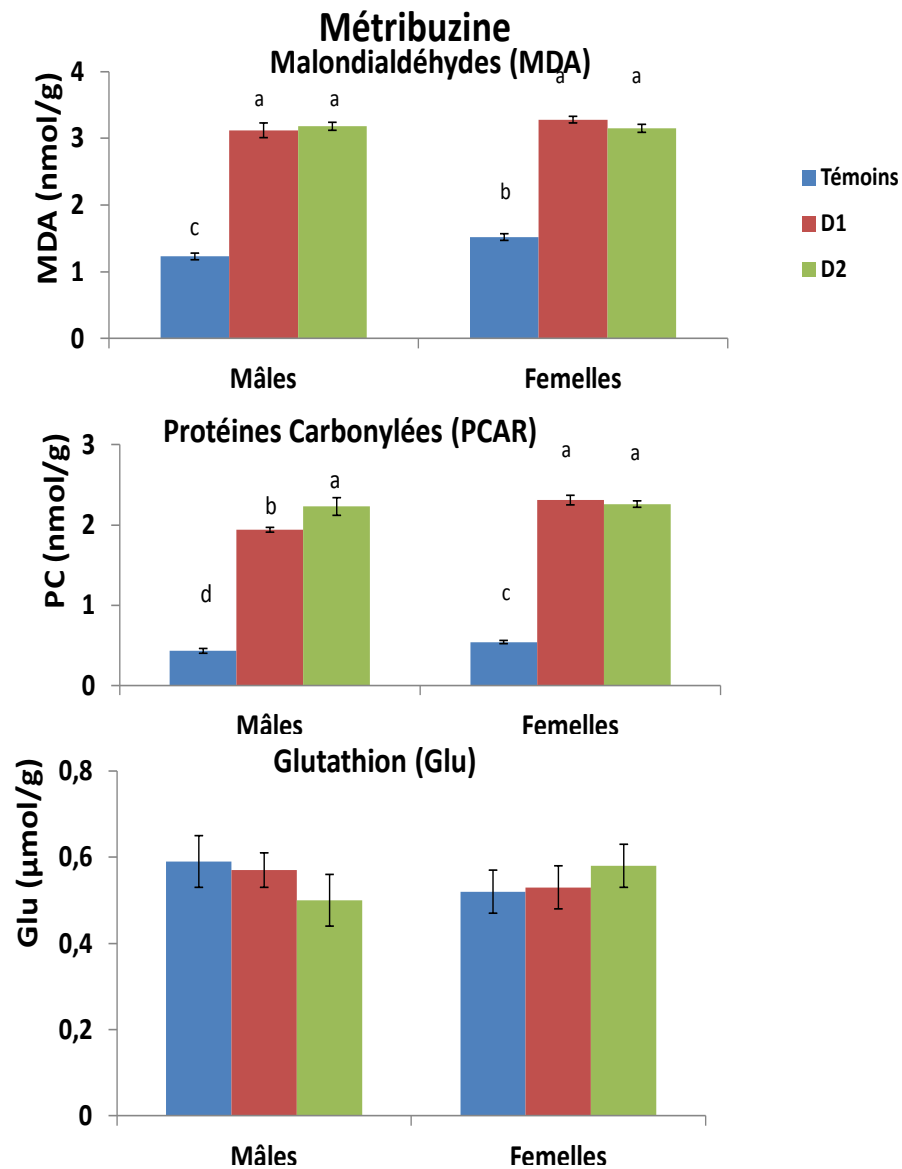
#### **II.4.6.2. Teneurs en protéines carbonylées au niveau de l'intestin chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figures 30 et 31)**

Les Protéines Carbonylées de l'intestin sont significativement augmentées chez les rats des deux sexes traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe comparées aux valeurs obtenues chez les témoins.

#### **II.4.6.3. Teneurs glutathion au niveau de l'intestin chez les rats témoins et les rats expérimentaux (Figure 30 et 31)**

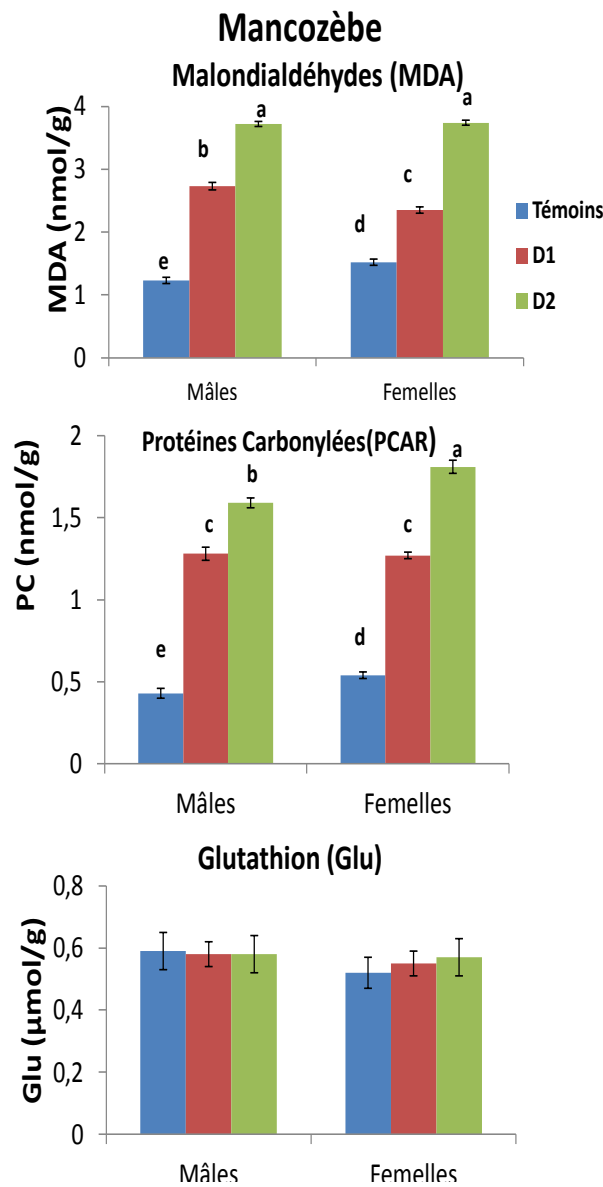
Pour les deux types de pesticides Métribuzine ou Mancozèbe, et avec les différentes doses utilisées, D1 ou D2, les valeurs obtenues concernant les teneurs en glutathion de l'intestin ne présentent aucune variation significative aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles.





**Figure 30. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2: DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).



**Figure 31. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par la Mancozèbe**

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2: DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

## RESULTATS ET INTERPRETATION



# DISCUSSION

## DISCUSSION

Les recherches actuelles sur les pesticides, leurs effets et leurs modes d'utilisation est un enjeu majeur de Santé Publique. Le recours aux pesticides en Algérie pour usage agricole est devenu indispensable pour atteindre des niveaux de production maximaux et satisfaire une demande de plus en plus accrue des consommateurs en produits alimentaires. Malheureusement, les produits phytosanitaires utilisés en Algérie sont très mal connus. De plus, les niveaux d'exposition de la population générale sont difficiles à mesurer et l'impact sanitaire à long terme est mal connu. L'exposition chronique des populations, même à faible dose, serait la cause de l'augmentation de certains cancers, de troubles de la reproduction, de troubles du système nerveux, du comportement, et d'effets endocriniens. La gestion des risques liés aux pesticides passe en premier lieu par l'amélioration des connaissances des effets métaboliques de ces substances.

Afin de contribuer à ce sujet d'actualité, nous avons utilisé deux modèles expérimentaux, culture de cellules *in vitro* et rat wistar *in vivo*, pour approfondir les recherches sur les effets de deux pesticides largement utilisés en Algérie, le Mancozèbe et la Métribuzine, à faibles doses.

L'étude *in vitro* porte sur l'évaluation des effets de différentes concentrations du Mancozèbe (fongicide) et de la Métribuzine (herbicide) sur les splénocytes de rats et sur les lymphocytes humains T stimulés par un agent mitogène (la Concanavaline A). Cette partie *in vitro* concerne particulièrement les altérations d'ordre immunologique induites par les pesticides. En effet, les pesticides sont capables d'agir sur le système immunitaire selon différents mécanismes incluant des perturbations de la prolifération et du fonctionnement des cellules immunocompétentes, ou de la sécrétion des cytokines (Corsini *et al.*, 2005; Filipov *et al.*, 2005; Rowe *et al.*, 2007).

Le suivi *in vitro* de la prolifération cellulaire et de la production des cytokines sont largement utilisés et sont considérés comme des techniques indispensables afin de déterminer la réponse immunitaire suite à l'exposition des cellules à différentes concentrations de pesticides.

L'effet immunomodulateur des pesticides peut se traduire par une immunosuppression ou par une immunostimulation de la prolifération lymphocytaire et de la production des cytokines et/ou de l'homéostasie entre les lymphocytes Th1 (cellules à médiation immunitaire) et les lymphocytes Th2 (cellules à réponse humorale). De plus, pour certains auteurs, les pesticides peuvent induire une augmentation des radicaux libres dans les lymphocytes provoquant un stress oxydatif intracellulaire (Calviello *et al.*, 2006).

Les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, qui vise à détruire les cellules pathogènes, que ça soit des bactéries ou des cellules cancéreuses. La structure globale des lymphocytes T est identiques, ils se distinguent par leurs TCR toujours accompagné du cluster de différenciation CD3, ainsi que du CD4 ou du CD8 suivant le lymphocyte considéré. Les TCR sont des récepteurs membranaires caractéristiques des lymphocytes T. Les clusters de différenciation sont des molécules associées au TCR et ayant des fonctions complètement

## DISCUSSION

différentes les uns des autres. Le complexe protéique CD3, toujours associé au TCR, est indispensable à l'expression du récepteur. Le CD4, protéine monomérique membranaire, est exprimé par certains lymphocytes T (T-CD4). Le CD8, protéine hétéro-dimérique membranaire, est aussi exprimé par certains lymphocytes (T-CD8). Les T-CD8 évoluent vers les lymphocytes cytotoxiques, alors que les T-CD4 donnent les lymphocytes **helper** (Th ou **auxiliaires**) qui ont un rôle de régulation de la réponse immunitaire adaptative par activation d'autres cellules immunitaires. Ils agissent par interactions cellules-cellules ainsi que par des cytokines. Les lymphocytes Th activés présentent une hétérogénéité fonctionnelle, avec différents profils de sécrétion cytokinique. Les lymphocytes Th1 sécrètent majoritairement des cytokines pro-inflammatoires, l'Interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), la « Tumor Necrosis Factor – alpha » (TNF- $\alpha$ ) et l'Interleukine 2 (IL-2) et induisent les réponses immunes cellulaires les plus efficaces contre les virus et bactéries. Les Th2, avec une sécrétion majoritaire d'IL-4, IL-5 et IL-13, soutiennent la différenciation des lymphocytes B pour la production d'anticorps (Gor *et al.*, 2003). La rate est un organe lymphoïde secondaire dont la pulpe blanche correspond à l'association de plusieurs nodules en amas de cellules du type des lymphocytes (splénocytes).

Dans l'étude *in vitro*, les lymphocytes totaux sont isolés à partir du sang d'hommes volontaires, et les splénocytes totaux sont isolés à partir de rates de rats Wistar. L'utilisation de la concanavaleine A, agent mitogène spécifique des lymphocytes T, permet d'activer seulement la prolifération des cellules T.

Nos résultats montrent que le Mancozèbe et la Métribuzine aux concentrations de 1 à 100  $\mu$ M présentent un effet immunomodulateur important sur les deux sous-types de lymphocytes Th1 et Th2. Cette immunomodulation est similaire aussi bien chez les lymphocytes humains que chez les splénocytes de rats, avec une sensibilité plus importante observée avec les splénocytes (Medjdoub *et al.*, 2011).

La relation entre ces effets immunomodulateurs de ces pesticides et leur capacité de provoquer un stress oxydatif intracellulaire est observée aux plus fortes concentrations (50 à 100  $\mu$ M).

Il est important d'indiquer que les effets immunomodulateurs de ces deux pesticides et leurs effets sur le statut oxydant/antioxydant des lymphocytes n'a pas été étudié ou documenté auparavant.

La prolifération lymphocytaire est significativement diminuée en présence du Mancozèbe aussi bien chez les lymphocytes humains que les splénocytes de rats; la plus forte immunosuppression est observée avec la plus forte concentration (100 $\mu$ M).

Le Mancozèbe entraîne une chute de la prolifération lymphocytaire d'une manière dose-dépendante. La prolifération des splénocytes de rats est plus sensible en présence du fongicide que les lymphocytes humains. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres cultures cellulaires en présence de pesticides différents (Mehta *et al.*, 2008).

## DISCUSSION

En présence des pesticides dans la culture, l'activation des lymphocytes a diminué malgré la présence d'agents mitogènes (Bolognesi, 2003). Tsang et Trombetta . (2007) ont étudié l'effet du Mancozèbe sur les astrocytes en culture. Ils ont observé une chute significative dans la prolifération astrocytaire suite à un traitement au Mancozèbe. Une autre étude menée par l'équipe de Steiblen *et al.* (2005), a montré que la sensibilité de la prolifération splénocytaire en présence de différents poisons est plus élevée ou parfois égale à celles des lymphocytes humains.

Concernant l'herbicide (la Métribuzine), on a remarqué que les faibles concentrations de 1 à 10  $\mu\text{M}$  provoquent une activation significative des proliférations lymphocytaires et splénocytaires. Cependant, la Métribuzine, à des concentrations plus élevées (25-100  $\mu\text{M}$ ), entraîne une chute de la prolifération lymphocytaire. La chute de la prolifération lymphocytaire en présence de Métribuzine est dose-dépendante. La Métribuzine est à la fois immunostimulatrice et immunosuppressive sur la prolifération lymphocytaire. Notre étude a prouvé que le même pesticide peut exercer les deux effets (stimulation et suppression) dépendant de la dose testée. Cet effet tantôt stimulateur tantôt inhibiteur de la Métribuzine sur les lymphocytes humains et les splénocytes de rat peut être expliqué par l'effet Hormèse (Hormesis, mot en anglais), phénomène observé avec la courbe dose-réponse. L'effet Hormèse a été défini comme la réponse des cellules à un effecteur, avec stimulation à faibles doses et inhibition à des doses plus élevées. Ainsi, une molécule présentant un effet Hormèse est une molécule qui possède un effet opposé avec les faibles doses comparé à celui avec les fortes doses du même produit (Murado et Vazquez, 2007).

Dans notre étude, les effets des deux pesticides sur la production des cytokines *in vitro* sont concomitants à ceux obtenus sur la prolifération des lymphocytes. En fait, nous avons mesuré les différentes cytokines produites par les lymphocytes afin d'évaluer les propriétés fonctionnelles des lymphocytes et le phénotype dominant par le rapport Th1/Th2.

La mesure de la production des cytokines est précédemment utilisée dans différentes études comme un moyen efficace pour détecter la présence des différents types de lymphocytes, Th1 ou Th2. Les cellules Th1 sont principalement responsables de la défense cellulaire par le phénomène de la phagocytose, et ces cellules sont les effecteurs de l'immunité cellulaire, provoquant une réaction d'hypersensibilité de type retardé et l'inflammation chronique par l'intermédiaire des cytokines Th1 (IL-2,  $\text{INF}\gamma$ ). Les lymphocytes Th2 sont responsables de la défense immunitaire humorale avec recrutement des éosinophiles, provoquant des réactions allergiques par l'intermédiaire des cytokines Th2 (IL4).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'effet inhibiteur exercé par le Mancozèbe. Tout d'abord, le Mancozèbe diminue d'une manière dose-dépendante la production des IL-2 par les lymphocytes, ce qui suggère que la suppression de la prolifération lymphocytaire est due à la réduction de la production d'IL-2. Il est à noter que les IL-2 présentent un facteur puissant de la croissance et la

## DISCUSSION

maturation des lymphocytes T. La production des IL-4 et des  $\text{INF}\gamma$  est également diminuée en présence du Mancozèbe. La diminution significative des  $\text{INF}\gamma$  peut augmenter le risque des infections suite à une exposition aux pesticides. Il ya une augmentation du rapport Th1/Th2 après l'exposition au Mancozèbe.

Ainsi, nous avons noté que le Mancozèbe induit une diminution de la production des IL-2,  $\text{INF}\gamma$  et IL-4 par les lymphocytes, mais le rapport Th1/Th2 est augmenté proportionnellement aux doses utilisées. Une réponse immunitaire de type Th1 est donc dominante, reflétant probablement l'effet inflammatoire du Mancozèbe. Des études antérieures ont obtenus des réponses de type Th1 ou Th2 en utilisant d'autres pesticides (Duramad *et al.*, 2006).

Une explication possible de la prédominance du phénotype Th1 plus que le Th2 dans nos cultures cellulaires exposées au Mancozèbe est liée à une augmentation de l'apoptose dans les lymphocytes Th2 par rapport à Th1. D'un autre côté, le Mancozèbe peut induire une réduction de la prolifération des lymphocytes T, des différences dans le taux de prolifération entre les lymphocytes Th1 et Th2 qui peut se traduire par un déséquilibre du rapport Th1/Th2.

La Métribuzine induit une augmentation de la sécrétion des cytokines (IL-2,  $\text{INF}\gamma$ , IL-4) par les lymphocytes à de faibles concentrations, et une réduction de ces cytokines à des concentrations plus élevées. La proportion des lymphocytes Th1 par rapport à Th2 n'est pas affectée par la Métribuzine aux concentrations allant de 1 jusqu'à 50  $\mu\text{M}$ . Toutefois, la Métribuzine à 100  $\mu\text{M}$  entraîne une augmentation de la proportion de lymphocytes Th1 par rapport aux Th2, montrant que les lymphocytes humains et les splénocytes de rat exposés à une forte concentration de la Métribuzine présentent une dominance du profil Th1. Un déséquilibre dans la production de cytokines a été rapporté par plusieurs auteurs après l'exposition *in vitro* aux herbicides (Hooghe *et al.*, 2000). Il est possible que la Métribuzine puisse agir directement sur les lymphocytes Th en induisant l'activation et aussi l'inhibition de la prolifération lymphocytaire. Une fois activés, les Th meurent par l'apoptose au lieu de proliférer. Les variations des taux des cytokines dans les surnageants des cultures peuvent être dues aux variations des sécrétions des cytokines par le même nombre de cellules, ou bien des variations du nombre de cellules sécrétrices ou par les sous-populations de différentes cellules.

Plusieurs études ont montré que l'exposition chronique aux pesticides entraînent une suppression des réponses immunitaires humores, associée à une augmentation de la libération des radicaux libres (Calviello *et al.*, 2006; Li et Kawada, 2006; Antherieu *et al.*, 2007). Les pesticides provoquent un stress oxydatif qui peut être considéré comme la cause principale de l'immunotoxicité observée avec ces molécules (Banerjee *et al.*, 2001). Le Mancozèbe entraîne des altérations du système antioxydant des astrocytes en culture (Calviello *et al.*, 2006).



## DISCUSSION

Dans le même sens, les résultats de notre travail montrent l'existence d'un stress oxydant intracellulaire qui se manifeste par une augmentation des taux en hydroperoxydes et en protéines carbonylées, et une chute significative des teneurs en glutathion réduit (GSH) dans les lymphocytes et les splénocytes exposés au Mancozèbe. Ce fongicide entraîne des variations dose-dépendantes sur le statut rédox des lymphocytes.

Cette augmentation des marqueurs du stress oxydatif suite au traitement par le Mancozèbe est similaire à celle obtenue chez les rats traités par ce fongicide (Calviello *et al.*, 2006; Sakr *et al.*, 2007).

Par ailleurs, une augmentation significative des activités des enzymes antioxydantes est entraînée par ce pesticide. Le Mancozèbe induit une augmentation de l'activité de la catalase aux concentrations de 5 à 100  $\mu\text{M}$  et une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) à 100  $\mu\text{M}$ .

La Métribuzine provoque un stress oxydant intracellulaire seulement aux concentrations dépassants les 25  $\mu\text{M}$ . L'augmentation des activités enzymatiques peut être en relation avec la présence du stress oxydatif intracellulaire, notamment à des concentrations fortes. Cependant, l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT et SOD) peut présenter une réponse adaptative au stress oxydatif entraîné par les pesticides.

Le statut oxydant/antioxydant des lymphocytes et des splénocytes présente une sensibilité équitable en présence des deux pesticides étudiés.

Plusieurs études ont suggéré que l'exposition des cellules aux espèces oxygénées (EOR) peut être la cause des dommages au niveau de l'ADN (Bolognesi *et al.*, 2003; Calviello *et al.*, 2006). La formation des micronoyaux (marqueurs des dommages cytogénétiques) au niveau des cellules exposées aux pesticides est prouvée par plusieurs chercheurs (Bolognesi *et al.*, 2003; Carfi *et al.*, 2007).

Le test des micronoyaux a été proposé pour détecter les dommages génétiques induits par les substances chimiques. Ce test est basé sur la numération d'entités nucléaires, les micronoyaux, présents dans le cytoplasme des cellules en interphase et dont le diamètre est inférieur au tiers du diamètre du noyau principal (Fenech *et al.*, 2003). Les micronoyaux sont constitués de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers qui, lorsqu'ils ne sont pas inclus dans les noyaux interphasiques, forment un noyau distinct. Ces entités chromosomiques sont des fragments acentriques (c'est à dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers non rattachés au fuseau mitotique et perdus au cours de la mitose. Les mécanismes d'apparition des micronoyaux peuvent être regroupés en effet clastogène d'une part et effet aneugène d'autre part. La clastogénèse est associée à la production de fragments acentriques, l'aneugénèse est associée à la perte de chromosomes, le plus souvent par altération de l'appareil mitotique.

## DISCUSSION

L'essai *in vitro* des micronoyaux permet donc de détecter l'activité des pesticides dans des cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'exposition à la substance étudiée, ces cellules étant binucléées.

Dans notre étude, le Mancozèbe et la Métribuzine aux concentrations de 50 à 100  $\mu\text{M}$  entraînent une augmentation significative des fréquences des micronoyaux au niveau des lymphocytes humains et des splénocytes de rats. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bolognesi *et al.* (2003) et Ardito *et al.* (1996) qui ont utilisé des pesticides différents mais à des concentrations similaires à celles utilisées dans notre travail. Ces auteurs ont montré une augmentation significative de l'apparition des micronoyaux seulement aux plus fortes concentrations. Nos résultats confirment donc l'effet mutagène des deux pesticides à fortes concentrations, mais ce test ne permet pas de connaître le mécanisme intime de l'action génotoxique puisque la distinction entre les effets clastogènes et aneugènes est impossible par cette méthode.

La deuxième partie de ce travail consiste en une étude *in vivo* afin d'analyser, chez des rats blancs de souche Wistar mâles et femelles, les effets d'une exposition chronique de deux mois aux deux pesticides, Mancozèbe et Métribuzine, à des concentrations faibles. La plupart des études ultérieures utilisent des doses relativement fortes et les effets à faibles doses sont moins bien décrits. Dans notre étude, les rats expérimentaux (mâles et femelles) ont reçu les pesticides par gavage (1 jour/2) à différentes doses (dose 1= 1,3 mg/kg/j et dose 2= 13 mg/kg/j pour la Métribuzine, 5 mg/kg/j et 50 mg/kg/j pour le Mancozèbe) pendant 60 jours. Les premiers paramètres étudiés concernent les variations du poids de l'animal et de l'ingestion de nourriture. Sandford *et al.* (1986) et Wallace *et al.* (1990) ont établi qu'une perte de poids significative peut être l'un des signes de détérioration de l'état de l'animal le plus important reflétant un changement dans l'ingestion de nourriture. Une perte de poids dans ces circonstances doit toujours être évaluée par rapport à l'animal témoin approprié.

Dans notre étude, les variations du poids corporel sont déterminées chez les rats témoins (recevant 1 jour/2 par gavage de l'huile d'olive) et chez les rats expérimentaux (recevant 1 jour/2 par gavage l'huile d'olive contenant les pesticides testés) et sont notées quotidiennement le matin à la même heure. Nos résultats montrent que les rats témoins présentent une croissance normale durant la période d'expérimentation (60j). Quelque soit le pesticide testé, les rats mâles et femelles expérimentaux montrent une perte de poids corporel. La dose D1 de Métribuzine entraîne une réduction de poids corporel similaire à celle de la dose D2 chez les rats mâles et femelles comparés à leurs témoins respectifs. Par contre, la chute de poids entraînée par le Mancozèbe est plus importante avec la D2 par rapport à la D1. Ces résultats montrent que le fongicide a un effet dose-dépendant aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles. Bhardwaj *et al.* (2010) ont mené une étude chez des rats femelles traités par l'imidaclopride qui ont aussi montré une perte du poids

## DISCUSSION

corporel comparés à leurs témoins. Une autre étude a été menée chez des rats mâles Wistar qui ont reçu par voie orale le diuron [3 - (3,4-dichlorophényl) -1,1-diméthylurée], un herbicide qui a entraîné une chute du poids corporel de ces animaux comparés à leurs témoins (Domingues *et al.*, 2011).

Cette diminution du poids corporel est due, selon OCDE (2000), à la perte des réserves graisseuses et à une fonte musculaire chez l'animal lors d'une souffrance (GTPWOAUFSP, 2008).

La perte de poids est d'autant plus importante que la dose augmente. En général, la chute corporelle est due en premier à une diminution de la masse grasse suivie de celle de la masse maigre. Elle représente la conséquence ultime d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports qui sont inférieurs aux dépenses énergétiques (Ritz *et al.*, 2007).

Dans notre travail, la perte de poids est associée à une réduction de la consommation alimentaire et d'apport énergétique quotidien chez les rats ayant reçu par gavage les pesticides. La réduction de la consommation alimentaire et de l'apport énergétique est de plus en plus importante lorsque la dose testée augmente et ceci concerne surtout le Mancozèbe. Nos résultats montrent que la dose 1 et la dose 2 de Métribuzine provoquent une diminution similaire de l'ingestion d'aliments chez les rats expérimentaux mâles et femelles comparés à leurs témoins respectifs. Cette chute reflète aussi une diminution significative de l'apport énergétique quotidien chez les rats expérimentaux comparés à leurs témoins. Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec Domingues *et al.* (2011). Pour l'herbicide, les rats présentent une perte d'appétit, une réduction de la consommation alimentaire et de l'apport énergétique quotidien qui se traduit notamment par une perte de poids plus importante avec la dose 2 comparé à la dose 1. Ces signes peuvent être des marqueurs fiables de souffrance dans les études de toxicité. Plusieurs études ont mis en évidence le stress associé à une restriction alimentaire produisant une perte de poids plus de 20 à 25 % chez le rat (Foltz et Ullman-Cullere 1999; OCDE, 2001).

D'un autre côté, les paramètres biochimiques sont étudiés dans les tests de toxicité des pesticides (Manser, 1992). Les paramètres biochimiques varient lors d'un stress, de douleur ou de souffrance. Dans les tests toxicologiques, ces variations sont liées à la perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien traduisant une hyperglycémie liée à l'activation du système orthosympathique, une augmentation du taux plasmatique de créatine kinase liée à une atteinte du tissu musculaire, une diminution des  $\beta$ -lipoprotéines et du taux de cholestérol, ainsi qu'une augmentation de la concentration d'angiotensine, et de l'activité de la rénine, liées à la stimulation du système orthosympathique (Manser, 1992). Les résultats obtenus montrent que chez les rats expérimentaux mâles et femelles traités par la dose D1 du Mancozèbe, aucune variation significative des teneurs sériques en cholestérol total (CT), en triglycérides (TG), et en glucose n'est observée par rapport à leurs témoins respectifs. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par

## DISCUSSION

Hariri *et al.* (2010) sur le Diazinon qui n'a pas entraîné des variations significatives concernant la cholestérolémie et la triglycéridémie. Cependant, les deux doses (D1 et D2) de Métribuzine et aussi la dose D2 du Mancozèbe, entraînent une hypercholestérolémie, une hypertriglycéridémie, et une hyperglycémie par rapport à leurs témoins. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Yousef *et al.* (2006) concernant l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie et l'hyperglycémie en utilisant un autre pesticide le Deltaméthrine par voie orale sur des rats adultes. Cetin *et al.* (2010) ont aussi montré que le propetamphos induit une augmentation des TG et de la glycémie. Ces résultats sont en faveur d'une modification du métabolisme des glucides et des lipides par les pesticides.

Nos résultats montrent que les rats recevant la Métribuzine (D1 et D2) et le Mancozèbe (D2) présentent une augmentation des teneurs sériques en créatinine et en urée comparés à leurs témoins respectifs. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus par de nombreux auteurs (Yousef *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2011; Saafi-Bensalah *et al.*, 2012). Les perturbations des taux sériques en créatinine et en l'urée sont en relation avec un dysfonctionnement et une insuffisance rénale chronique qui peuvent se traduire par une néphrotoxicité (Saafi-bensalah, 2012; Siddharth, 2012).

La néphrotoxicité liée aux pesticides peut se manifester par une insuffisance rénale chronique. Cependant, la toxicité rénale aux pesticides testés dans notre étude n'a pas été documentée précédemment. Certains pesticides ont montré également des effets toxiques au niveau du rein. Le diméthoate, les pesticides organochlorés (POC), et le phénobarbital (fongicide), largement utilisés dans le domaine agricole sont connus pour leurs toxicités et leurs effets néphrotoxiques chez plusieurs modèles expérimentaux. Le diméthoate administré aux rats mâles pendant deux mois a provoqué une insuffisance rénale et une néphrotoxicité se manifestant par des changements histopathologiques dans les reins comme la réduction d'espace de Bowman, dégénérescence tubulaire, et une desquamation des cellules tubulaires accompagnées par une forte peroxydation des lipides rénaux, une hypercréatinémie et une augmentation sérique d'urée (marqueurs de la fonction rénale) (Saafi-bensalah, 2012). Par ailleurs, Ozcan et ses collaborateurs (2012) ont montré également que la Warfarine est responsable des lésions tubulaires aiguës chez les rats traités. Les travaux de Siddharth *et al.* (2012) ont mesuré le taux sanguin des pesticides organochlorés chez des patients atteints d'une insuffisance rénale chronique (IRC) comparés à des témoins sains et ont observé un niveau très élevé de l'hexachlorocyclohexane, l'endosulfane, l'aldrine, le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) dans le sang des patients atteints d'IRC. Ces résultats peuvent être en faveur d'une association positive et directe entre la présence des pesticides dans le sang des patients et leur insuffisance rénale chronique.

La créatinine et l'urée constituent d'excellents marqueurs de la fonction rénale, leur augmentation ou leur diminution reflète un dysfonctionnement rénal. La créatinine est le meilleur marqueur de la

## DISCUSSION

fonction rénale. Elle est formée dans l'organisme par déshydratation non enzymatique de la créatine synthétisée par le foie et stockée dans le muscle. Un taux sérique élevé en créatinine (associé à un taux élevé en urée) traduit une diminution de la filtration glomérulaire. L'urée, un autre marqueur reflétant la fonction rénale, provient de la destruction des protéines. Elle est entièrement filtrée par les glomérules. Son taux sanguin reflète le fonctionnement global des reins. Dans notre étude, le Mancozèbe à la dose D1 ne provoque pas de variations des taux sériques en créatinine et en urée chez les rats mâles et femelles traités par rapport à leurs témoins respectifs, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hariri (2010). Par contre, les deux doses de la Métribuzine, et la D2 du Mancozèbe ont provoqué chez les rats mâles et femelles une augmentation sérique de ces paramètres comparés à leurs témoins respectifs. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études. Domingues *et al.* (2011) ont testé par voie orale l'effet du diuron [3 - (3,4-dichlorophényl) -1,1-diméthylurée], un herbicide sur des rats mâles Wistar, ce qui a entraîné une hypercréatinémie et une augmentation du taux sériques en urée. Les mêmes résultats sont obtenus par Saafi-bensalah *et al.* (2012), Yousef *et al.* (2006) et Cetin *et al.* (2010). Il ressort que la Métribuzine et le Mancozèbe provoquent chez les rats mâles et femelles une toxicité dose-dépendante de la fonction rénale.

Les perturbations biochimiques induites par les pesticides concernent aussi les teneurs en cholestérol et en triglycérides dans les fractions lipoprotéiques.

Les rats mâles et femelles traités par les deux pesticides à la dose D1 n'ont présenté aucune variation des teneurs en cholestérol des VLDL (CH-VLDL). Cependant, la dose D2 et pour les deux pesticides induit une augmentation significative des teneurs en CH-VLDL chez les rats des deux sexes comparés à leurs témoins respectifs. Les deux pesticides utilisés dans notre étude entraînent des modifications dose-dépendantes des teneurs du CH-VLDL. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kalender (2005) qui a testé l'effet du Diazinon (insecticides organophosphoré) par voie orale chez des rats mâles Wistar. Ce pesticide a provoqué une augmentation des teneurs en CH-VLDL. Les mêmes résultats sont obtenus par Kozłowska *et al.* (1988) sur des rats intoxiqués par le dichlorvos (DDVP).

Les teneurs en cholestérol des LDL (CH-LDL) chez les rats mâles et femelles traités par la Métribuzine (D1 et D2) sont significativement augmentées comparés à leurs témoins respectifs. Ces résultats sont en accord avec l'étude d'Ibrahim et El-Gamal. (2003) qui ont travaillé sur les rats Albinos qui reçoivent par voie orale le Diazinon (insecticide organophosphoré), ce qui a entraîné une augmentation significative des teneurs en CH-LDL comparés aux témoins. Cependant, les teneurs en CH-LDL ne présentent aucune variation significative chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses du Mancozèbe comparés à leurs rats témoins respectifs.

Les teneurs en cholestérol des HDL (CH-HDL) ne présentent aucune variation significative chez les rats mâles et femelles traités par la Métribuzine comparés à leurs rats témoins respectifs. Alors que

## DISCUSSION

chez les rats mâles et femelles traités par la dose D1 du Mancozèbe, les teneurs en CH-HDL sont similaires à celle de leurs témoins respectifs, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une chute significative des teneurs en CH-HDL chez les rats des deux sexes. Le Mancozèbe présente un effet dose-dépendant sur les teneurs en CH-HDL. Ces résultats concordent avec ceux d'Ibrahim et El-Gamel. (2003) où le Diazinon a provoqué une chute significative des teneurs en CH-HDL.

Les doses D1 et D2 de la Métribuzine chez les rats mâles et femelles entraînent une augmentation significative des teneurs en triglycérides des VLDL (TG-VLDL) comparés à leurs témoins respectifs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Kozłowska (1988). L'augmentation des teneurs en TG-VLDL est plus importante avec la dose D2 que la dose D1, la Métribuzine a donc un effet dose –dépendant sur les teneurs en TG-VLDL.

La dose D1 du Mancozèbe n'entraîne aucune variation des teneurs en TG-VLDL chez les rats expérimentaux comparés à leurs témoins. Cependant, la dose D2 du Mancozèbe entraîne une augmentation significative des teneurs en TG-VLDL, ce qui va dans le même sens que les résultats obtenus par Kozłowska (1988). Le Mancozèbe possède aussi un effet dose-dépendant sur les teneurs en TG-VLDL.

Les teneurs en TG-LDL et en TG-HDL n'ont pas changé chez les rats traités par la Métribuzine (D1 et D2) et aussi par la dose D1 du Mancozèbe, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec un autre pesticide (Ibrahim et El-Gamal, 2003). Par ailleurs, le Mancozèbe à la dose D2 entraîne une augmentation significative des teneurs en TG-LDL et en TG-HDL, résultats en accord avec ceux obtenus par Kozłowska (1988).

Les teneurs en apoprotéines totales des lipoprotéines reflètent en général le nombre de particules circulantes. La Métribuzine entraîne une élévation des teneurs en protéines (PT) des VLDL et LDL et une diminution des PT-HDL chez les rats des deux sexes. Le Mancozèbe induit une réduction des PT-HDL mais pas de modification des PT-VLDL et PT-LDL. Ainsi, les deux pesticides entraînent des modifications qualitatives et quantitatives des lipoprotéines qui peuvent être en relation avec des altérations du métabolisme lipoprotéique touchant les enzymes ou les organes impliqués dans ce métabolisme.

Les effets des pesticides sur les organes sont aussi mis en évidence dans notre travail. Nos résultats montrent que quelque soit le pesticides testé avec la dose D1, les rats mâles et femelles ne montrent aucune variation du poids du foie. Par contre, la dose D2 utilisée dans le cas des deux pesticides, chez les rats mâles et femelles, entraîne une augmentation significative du poids du foie par rapport à leurs témoins respectifs. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Yoshida *et al.* (2012) qui ont mené une étude sur des rats Fischer traités par le cyflumétofone (un acaricide) qui a entraîné une augmentation du poids du foie des rats expérimentaux.

## DISCUSSION

Cependant, les rats mâles et femelles traités par les doses D1 et D2 de Métribuzine présentent une diminution significative du poids du muscle comparés à leurs témoins respectifs. Le Mancozèbe induit aussi des variations significatives du poids du muscle. La dose D1 n'entraîne aucune modification des poids du muscle alors que la dose D2 entraîne une chute très importante des poids du muscle. Nos résultats montrent qu'avec les deux pesticides, le poids du muscle est significativement diminué, et selon l'OCDE (2001) cette diminution est relative à la diminution de l'appétit des rats, qui se traduit par la perte des réserves graisseuse suivie par la fonte musculaire chez le model animal en détresse.

En faveur avec la perte graisseuse, les doses D1 et D2 de Métribuzine ou de Mancozèbe chez les rats mâles et femelles entraînent une chute du poids du tissu adipeux comparé à leurs témoins respectifs. Les deux pesticides entraînent alors une chute du poids du tissu adipeux parallèle à la perte du poids corporel observés chez les animaux expérimentaux.

Il faut aussi noter que les deux pesticides entraînent une augmentation des teneurs en lipides et protéines hépatiques, une réduction des lipides et protéines musculaires et une diminution des lipides du tissu adipeux, très accentuées avec les doses élevées (D2). Ces anomalies correspondent à l'état catabolique induit par les pesticides.

Concernant l'intestin, aucune variation du poids et des teneurs en lipides totaux et protéines n'est observée, ceci suggère que les deux pesticides n'influencent pas le métabolisme intestinal. Néanmoins, seule une partie de l'intestin a été prélevée et il est donc difficile d'interpréter l'effet des pesticides sur l'intestin.

La dernière partie de notre travail porte sur un concept important, le stress oxydatif, reconnu aujourd'hui comme la base moléculaire de toutes les pathologies. Le stress oxydatif s'installe quand la production des radicaux libres dépasse la capacité de la défense antioxydante. Les radicaux libres font partie intégrante du fonctionnement de l'organisme et jouent un rôle important. En effet, les phénomènes radicalaires sont impliqués dans la multiplication, la différenciation, la croissance et le fonctionnement des différents types de cellules. Mais un déséquilibre entre la production intense et leur élimination peut engendrer un stress oxydant. Ce dernier peut conduire à l'altération des fonctions vitales de l'organisme (Myatt et Cui, 2004). Il est donc important de connaître le statut oxydant / antioxydant lors de l'exposition aux pesticides. C'est dans cette optique que nous contribuons à déterminer les marqueurs du statut oxydant (malondialdéhyde, protéines carbonylées et les diènes conjugués) et statut antioxydant (catalase, vitamines C, glutathion réduit) au niveau du plasma, des érythrocytes et des organes chez les rats traités par les pesticides. Plusieurs techniques ont été développées pour évaluer les marqueurs du statut Redox. Le problème de disposer de marqueurs spécifiques, sensibles, fiables et d'exécution analytique

## DISCUSSION

aisée, ainsi que le manque de standardisation et d'optimisation des méthodes, complique l'interprétation des résultats.

Concernant, les marqueurs de la défense antioxydante, nous avons donc dosé, dans cette étude, les taux sériques de Vitamine C, et les taux sériques et tissulaires en glutathion réduit (GSH). Le glutathion est un tripeptide hydrosoluble, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine :  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine. Le glutathion existe sous forme oxydée (GSSG) et réduite (GSH), et intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule. Il intervient aussi dans un certain nombre de réaction de détoxification et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Pratiquement toutes les cellules contiennent du glutathion et il est considéré comme le principal antioxydant cellulaire parce qu'il complète l'action d'un grand nombre d'autres antioxydants comme celle des vitamines C et E.

Nous avons aussi mesuré l'activité antioxydante de la catalase, enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire. La catalase est un antioxydant enzymatique largement distribué dans tous les tissus animaux, et sa plus forte activité se trouve dans les globules rouges et le foie.

Nos résultats montrent que les teneurs sériques en Vitamine C chez les rats traités par les deux pesticides, Métribuzine ou Mancozèbe, sont significativement diminuées comparées aux valeurs témoins. Cette chute est dose-dépendante et semble très marquée par la dose D2. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les rats mâles traités par le (2,2-dichlorophosphate de diméthyle) dans l'étude d'Ajiboye. (2010) qui a montré une association positive et significative entre le pesticide administré par voie orale et la diminution des teneurs sériques en Vitamine C.

Nos résultats montrent aussi que les teneurs sériques en GSH sont significativement diminuées chez les rats traités par les deux pesticides comparés à leurs témoins. Ces résultats sont similaires à ceux de Rajeswary *et al.* (2007) et de Ajiboye. (2010) qui ont utilisé d'autres pesticides et ont observé une diminution considérable des teneurs sériques en GSH chez les rats traités. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un stress oxydatif avec consommation des antioxydants chez les rats exposés aux pesticides.

Les activités des enzymes antioxydantes sont aussi modifiées chez les rats exposés aux pesticides.

La Métribuzine et le Mancozèbe entraînent une réduction significative de l'activité de la catalase par rapport aux témoins. La dose D2 pour les deux pesticides entraîne une chute de l'activité de la catalase plus importante que celle obtenue avec la dose D1. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les rats par d'autres auteurs (Sankar *et al.*, 2012; Datta *et al.*, 2010). Datta *et al.* (2010) indiquent une diminution significative de l'activité de la catalase chez des rats traités par un pesticide organophosphoré par rapport à leurs témoins. De plus, Sanka *et al.* (2012) ont montré que le cyperméthrine administré par voie orale chez les rats entraîne une diminution significative de



## DISCUSSION

l'activité de la catalase. En effet, face au stress oxydatif, les enzymes antioxydantes sont consommées et inactivées, ce qui peut expliquer la réduction des activités érythrocytaires de la catalase chez les rats traités par les pesticides. Il est bien connu que face au stress oxydant qui perdure, et produit de façon massive des radicaux libres et espèces oxygénées toxiques, les enzymes antioxydantes seront détruites et leurs concentrations chuteront (Delattre *et al.*, 2005).

La peroxydation lipidique entraîne la libération de plusieurs produits d'oxydation comme des diènes conjugués et des aldéhydes qui, à fortes concentrations, s'avèrent toxiques pour les cellules. La plupart de ces aldéhydes sont très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. L'aldéhyde le mieux étudié est le MDA, aldéhyde formé lors de la coupure des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons (Esterbauer *et al.*, 1989). Les teneurs plasmatiques en MDA chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe sont significativement augmentées comparés à leurs témoins, ce qui est en faveur de l'augmentation de l'oxydation lipidique en présence des deux pesticides. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs auteurs (Siddharth *et al.*, 2012; Ajiboye, 2010; Kreiger et Loch-Caruso, 2001; Rajeswary, 2007). Cette augmentation est plus importante avec la dose D2 que la dose D1.

L'oxydation *in vitro* des lipoprotéines plasmatiques, induite par les métaux (cuivre), est déterminée par le suivi au cours du temps de la formation des diènes conjugués. La formation de ces derniers, résulte du réarrangement des doubles liaisons éthyléniques des acides gras polyinsaturés (AGPI) suite à l'abstraction radicalaire d'un hydrogène malonique (Esterbauer *et al.*, 1989). L'oxydation *in vitro* des lipoprotéines est aussi considérée comme un marqueur du statut oxydant /antioxydant. Les taux plasmatiques des diènes conjugués sont plus élevés chez les rats traités par la Métribuzine comparés aux témoins, en faveur d'une formation accrue des produits de la peroxydation des lipides. Ces données sont en accord avec celles obtenues par Ben Amara *et al.* (2012) et Ajiboye (2012). Par contre, le Mancozèbe n'entraîne aucune variation des teneurs plasmatiques en Diènes conjugués malgré l'augmentation des taux en MDA. Il est à noter que les diènes conjugués représentent un marqueur très instable de l'oxydation des lipides, alors que les hydroperoxydes et le MDA sont des paramètres plus stables.

Les protéines carbonylées sont considérées comme les marqueurs de l'oxydation des protéines. Une augmentation significative des teneurs en protéines carbonylées plasmatiques est observée chez les rats traités comparés aux témoins. Ces données sont en accord avec ceux de Siddharth *et al.* (2012). On a remarqué que plus la dose augmente plus les teneurs plasmatiques en protéines carbonylées augmentent et ceci de type dose-dépendant. Rappelons que les rats traités présentent une hyperglycémie pendant toute l'expérimentation, qui peut aussi induire la glycation et l'oxydation des protéines.

## DISCUSSION

Nos résultats montrent que l'exposition chronique aux pesticides induit aussi un stress oxydatif au niveau des organes.

Les teneurs hépatiques en MDA sont significativement augmentées chez les rats traités par la Métribuzine et le Mancozèbe. Cette augmentation est plus importante avec la dose D2 que la dose D1. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec d'autres pesticides qui ont révélé une augmentation hépatique de la peroxydation lipidique (Aboul-Soud, 2001; Sankar *et al.*, 2012; Yang, 2012).

L'augmentation du MDA musculaire chez les rats traités par la Métribuzine ou par le Mancozèbe est en faveur de l'augmentation de l'oxydation des lipides au niveau du muscle. Les rats exposés à la Métribuzine présentent une forte oxydation lipidique (MDA) au niveau du muscle comparés aux rats exposés au Mancozèbe.

Les teneurs adipocytaires et intestinaux en MDA sont significativement augmentées chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe comparé à leurs témoins. Ainsi, le MDA est un marqueur oxydant au niveau circulant et tissulaire lors de l'exposition aux pesticides.

De plus, chez les rats mâles et femelles traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe, les teneurs hépatiques, musculaires, adipocytaires et intestinales en protéines carbonylées sont significativement augmentées comparées aux valeurs obtenues chez leurs témoins, avec un effet dose-dépendant. Ceci confirme l'existence d'un stress oxydatif tissulaire lors de l'exposition aux deux pesticides.

Concernant les teneurs hépatiques en GSH chez les rats traités par les pesticides, une chute significative est notée comparée aux valeurs témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs (Ajiboye, 2010; Aboul-Soud, 2011; Ojha et Srivastava, 2012; Sankar *et al.*, 2012). Ojha *et al.* (2012) et Srivastava *et al.* (2012) ont mené une étude sur l'influence des pesticides organophosphorés sur le tissu hépatique et ils ont constaté une chute significative des teneurs hépatiques en glutathion réduit comparées aux valeurs témoins.

Chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe, aucune variation des teneurs musculaires en GSH n'est observée. Ces résultats sont en désaccord avec ceux d'Ojha et Srivastava. (2012) où les teneurs en GSH musculaire sont significativement diminuées.

De plus, aucune modification des teneurs en GSH adipocytaire et intestinal n'est observée chez les rats expérimentaux comparés aux rats témoins.

Il apparaît ainsi que les teneurs en GSH au niveau du muscle, tissu adipeux et intestin sont maintenues normales alors que celles en GSH au niveau du foie sont réduites lors de l'exposition aux pesticides. Le foie est un organe très impliqué dans les réactions de détoxification de l'organisme et ceci peut expliquer la déplétion de ce tissu en GSH (considéré comme un

## DISCUSSION

antioxydant puissant) en présence d'un stress oxydatif. Il est possible que les pesticides agissent comme des générateurs de radicaux libres altérant les systèmes de défense des différents organes.



# CONCLUSION

## CONCLUSION

## CONCLUSION

Les pesticides posent un véritable problème de santé publique, à la fois pour les utilisateurs, mais aussi pour la population générale. Il est maintenant établi que les populations fortement exposées aient un risque accru de développer des déficits immunitaires. Par ailleurs, peu d'études établissent le lien entre l'exposition aux pesticides et l'immunotoxicité.

L'évaluation des effets toxiques de pesticides est complexe car de nombreux paramètres sont à considérer. Les atteintes chroniques dans lesquels les pesticides sont suspectés, ont été dénoncées par de nombreux scientifiques. Cependant, les études de risques prévues pour tester les pesticides sont insuffisantes pour objectiver leurs dangers potentiels, pour développer des politiques de protection de ces dangers.

Ma thèse entre dans le contexte de l'analyse du risque constitué par les pesticides nécessitant de prendre en compte la vulnérabilité du développement précoce et les implications à long terme d'une programmation altérée sur le système immunitaire, le désordre métaboliques et le déséquilibre du statut rédox.

Pour réaliser ce travail nous avons utilisé comme modèle expérimental in vitro, les lymphocytes humains et les splénocytes de rats considérée comme étant le modèle le plus connu et classiquement utilisé pour déterminer l'immunotoxicité de nouveaux produits chimiques, médicaments et xénobiotiques.

Le premier résultat significatif de notre travail est que le Mancozèbe et la Métribuzine présentent un effet immunomodulateur important sur les deux sous-types de lymphocytes Th1 et Th2. Cette immunomodulation est similaire aussi bien chez les lymphocytes humains que chez les splénocytes de rats, avec une sensibilité plus importante observée avec les splénocytes. Le Mancozèbe entraîne une chute de la prolifération lymphocytaire d'une manière dose-dépendante. Cependant, la Métribuzine est à la fois immunostimulatrice et immunosuppressive sur la prolifération lymphocytaire. Notre étude a prouvé que le même pesticide peut exercer les deux effets (stimulation et suppression) dépendant de la dose testée.

Une réponse immunitaire de type Th1 est donc dominante, reflétant probablement l'effet inflammatoire du Mancozèbe, contrairement à la Métribuzine qui présente une dominance du profil Th1 sur les lymphocytes humains et les splénocytes de rat qui sont uniquement exposés à une forte concentration de la Métribuzine.

Dans le même sens, les résultats de notre travail montrent l'existence d'un stress oxydant intracellulaire qui se manifeste par une augmentation des taux en hydroperoxydes et en protéines carbonylées, et une chute significative des teneurs en glutathion réduit (GSH) dans les lymphocytes et les splénocytes exposés au Mancozèbe. Ce fongicide entraîne des variations dose-dépendantes sur le statut rédox des lymphocytes.

## CONCLUSION

Par ailleurs, une augmentation significative des activités des enzymes antioxydantes est entraînée par ce pesticide. Le Mancozèbe induit une augmentation de l'activité de la catalase aux concentrations de 5 à 100  $\mu\text{M}$  et une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) à 100  $\mu\text{M}$ .

La Métribuzine provoque un stress oxydant intracellulaire seulement aux concentrations dépassants les 25  $\mu\text{M}$ . L'augmentation des activités enzymatiques peut être en relation avec la présence du stress oxydatif intracellulaire, notamment à des concentrations fortes. Cependant, l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT et SOD) peut présenter une réponse adaptative au stress oxydatif entraîné par les pesticides.

Le statut oxydant/antioxydant des lymphocytes et des splénocytes présente une sensibilité équitable en présence des deux pesticides étudiés.

Nos résultats obtenus montrent que, le Mancozèbe et la Métribuzine aux concentrations de 50 à 100  $\mu\text{M}$  entraînent une augmentation significative des fréquences des micronoyaux, marqueurs des dommages cytogénétiques, au niveau des lymphocytes humains et des splénocytes de rats.

Le second apport de nos travaux réside dans la démonstration des effets délétères d'une exposition chronique pendant deux mois aux deux pesticides, Mancozèbe et Métribuzine, chez des rats blancs de souche Wistar mâles et femelles, à des concentrations faibles. La plupart des études ultérieures utilisent des doses relativement fortes et les effets à faibles doses sont moins bien décrits.

Les premiers résultats significatifs de notre étude *in vivo* montrent que les deux pesticides testés induisent une chute de poids corporel des rats consécutive à une perte d'appétit et une réduction d'apport énergétique quotidien. La réduction de la consommation alimentaire et de l'apport énergétique est de plus en plus importante lorsque la dose testée augmente et ceci concerne surtout le Mancozèbe. La chute du poids est associée à une diminution du tissu adipeux, une fonte musculaire, à une hyperglycémie, une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie. Ces altérations sont associées à une élévation des taux sériques de créatinine et d'urée reflétant chez les rats mâles et femelles une toxicité dose-dépendante de la fonction rénale. De plus, ces perturbations biochimiques induites par les pesticides concernent l'augmentation dose-dépendante des teneurs en cholestérol et en triglycérides dans les fractions lipoprotéiques.

Il faut aussi noter que les deux pesticides entraînent une augmentation des teneurs en lipides et protéines hépatiques, une réduction des lipides et protéines musculaires et une diminution des lipides du tissu adipeux, très accentuées avec les doses élevées. Ces anomalies correspondent à l'état catabolique induit par les pesticides.

Concernant l'intestin, aucune variation du poids et des teneurs en lipides totaux et protéines n'est observée, ceci suggère que les deux pesticides n'influencent pas le métabolisme intestinal.

## CONCLUSION

Une modification du statut oxydant / antioxydant est notée chez ces rats qui montrent une augmentation des teneurs plasmatiques et tissulaires en malondialdéhyde (MDA), diènes conjugués (DIC), protéines carbonylées (PCAR) et des marqueurs de l'oxydation des lipoprotéines en faveur d'un stress oxydatif évident. Les teneurs sériques en vitamine C et l'activité de la catalase sont réduites au niveau plasmatique, hépatique, musculaire et adipocytaire. Les teneurs en glutathion réduit (GSH) sont significativement réduites au niveau sanguin chez les rats traités par les deux types de pesticides. Il apparaît que les teneurs en GSH au niveau du muscle, tissu adipeux et intestin sont maintenues normales alors que celles en GSH au niveau du foie sont réduites lors de l'exposition aux pesticides. Le foie est un organe très impliqué dans les réactions de détoxification de l'organisme et ceci peut expliquer la déplétion de ce tissu en GSH (considéré comme un antioxydant puissant) en présence d'un stress oxydatif. Il est possible que les pesticides agissent comme des générateurs de radicaux libres altérant les systèmes de défense des différents organes. La démonstration d'un lien de causalité entre l'exposition aux pesticides et la présence d'un impact sur la santé chez l'homme pourrait être apportée par des études comparatives entre des populations ayant une alimentation conventionnelle et biologique.

En réalité, de telles études sont très difficiles à réaliser d'une façon rigoureuse et contrôlée ; elles nécessiteront un suivi assez prolongé (pendant plusieurs décennies ou générations) et l'implication d'un grand nombre de personnes ayant des régimes alimentaires identiques mais comportant une alimentation biologique ou des aliments conventionnels.

Au cours de ces trois années de thèse, nous avons pu associer des approches expérimentales *in vitro* et *in vivo* afin d'aborder la problématique des effets de faibles doses de pesticides. Nous avons montré que ces pesticides à des faibles doses sont capables d'exercer des effets *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les résultats de ces études ne peuvent être généralisés ni à l'homme, ni à l'ensemble des molécules (pesticides et autres contaminants) présents dans l'environnement. D'autres études seront donc nécessaires pour confirmer les hypothèses soulevées au cours de nos travaux.

### ***Perspectives***

Une des principales limites de nos études est l'état plutôt descriptif des résultats, lié pour beaucoup, au temps qui nous était imparti, 3 années, pour mettre en place, au laboratoire, la démarche conceptuelle ainsi que les approches techniques pour la développer. Nous avons encore besoin de temps pour explorer différentes pistes de recherche qui nous permettront de mieux évaluer et expliquer les phénomènes observés pendant ces 3 années. Les perspectives de ces travaux sont donc nombreuses et concernent les points suivants :

-Le mécanisme d'action de la toxicité cellulaire *in vitro* :

Bien que les méthodes utilisées *in vitro* aient permis l'observation d'un effet dû à l'exposition aux pesticides, elles ne renseignent pas de façon rigoureuse sur le mécanisme d'action de ces substances



## CONCLUSION

ni sur la nature de ces effets c'est-à-dire par exemple les cibles affectées (ADN, protéines ou voies de signalisation, ...), ni sur la gravité des effets (réversibilité, adaptabilité cellulaire). Ainsi, il serait nécessaire d'aborder d'autres approches afin de mieux comprendre l'effet des pesticides testés et d'essayer aussi d'établir des marqueurs d'effets dans notre modèle. Il serait également intéressant de tester des pesticides sur des lignées possédant des capacités métaboliques différentes et faire la relation métabolisme/effets.

-Le mécanisme d'action de l'effet des pesticides in vivo :

Il serait intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux afin de savoir si les perturbations fonctionnelles et moléculaires observées pourraient aboutir à l'apparition des pathologies. En parallèle, des études plus approfondies (étude de génotoxicité, comme par exemple l'utilisation d'un test de « comet » pour la recherche d'un dommage à l'ADN, ou des études de biologie moléculaire) permettront de savoir si une atteinte de l'ADN serait déclenchée de façon directe (formation d'adduits ou de cassures simples ou doubles brins) ou indirecte (dérégulation de facteurs de transcription via les voies de signalisation affectées) suite à l'exposition aux pesticides, et de conclure ainsi sur la possibilité d'un lien direct avec le développement de pathologies comme le cancer.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abell A, Ernst E, Bonde JP (2000) Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health*. 26(6): 492-500.
2. Abhauer J (1990) Pesticide residues-Determination and evaluation in food and environment Pesticide chemistry.VCH, New York. 361-372.
3. Aboul-Soud MA, Al-Othman AM, El-Desoky GE, Al-Othman ZA, Yusuf K, Ahmad J, Al-Khedhairy AA (2011) Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats. *J Toxicol Sci*. 36 (3): 285-96.
4. Aebi H (1974) Catalase. In: H.U. Bergmeyer (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 673-684.
5. Ajiboye TO (2010) Redox status of the liver and kidney of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) treated rats. *Chem Biol Interact*. 185(3): 202-207.
6. Akiyama Y, Yoshioka N, Ichihashi K (2005) Study of pesticide residues in agricultural products towards the “positive list” system. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 46(6): 305-318.
7. Alavanja MC, Hoppin JA, Kamel F( 2004) Health effects of chronic pesticide and childhood cancer and Neurotoxicity. *Annu Rev Public Health*. 25:155-197.
8. Allot F, Debrois R , Forestier D (2004) Les produits phytosanitaires : évaluation et gestion de l'exposition des professionnels dans les serres. *Santé Environnement*. 42p.
9. Antherieu S, Ledirac N, Luzy AP, Lenormand P, Caron JC, Rahmani R (2007) Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J Cell Physiol*. 213: 177–186.
10. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner M K (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male rat fertility. *Science*. 308(5727): 1466-1469.
11. Ardito G, Bramanti B, Bigatti P, Lamberti L, Dolara P (1996) Cytogenetic effect of Thiabendazole and Diphenylamine on cultured human lymphocytes: sister chromatid exchanges and cell cycle delay. *J Biol Res*. 72p.
12. Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild M A, Thun MJ ( 2006) Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 60(2): 197-203.
13. Aulakh RS, Gill JPS, Bedi JS, Sharma JK, Joia BS, Ockerman H (2006) Organochlorine pesticide residues in poultry feed, chicken muscle and eggs at a poultry farm in Punjab, India. *Journal of the science of food and agriculture*. 86: 741-744.
14. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ (1995) In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*. 104(1-3): 129-140.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

15. Baldi I, Filleul L, Mohammed-Brahim B, Fabrigoule C, Dartigues JF, Schwall S, Drevet J P, Salamon R, Brochard P (2001) Neuropsychologic effects of longterm exposure to pesticides: results from the French Phytoner study. *Environ Health Perspect.* 109(8): 839-844.
16. Baldi I, Cantagrel A, Lebailly P, Tison F, Dubroca B, Chrysostome V, Dartigues J F, Brochard P (2003a) Association between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France. *Neuroepidemiology.* 22(5): 305-310.
17. Baldi I, Labailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues J F, Brochard P(2003b) Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *Am J Epidemiol.*157(5) :409-414.
18. Baldi I, Lebailly P, Jean S, Rougetet L, Dulaurent S, Marquet P (2006) Pesticide contamination of workers in vineyards in France. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 16(2): 115-124.
19. Baldi I, Labailly P (2007) cancers and pesticides. *Rev Prat.* 57: 40-44.
20. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS (2001) Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health.* 16 :1-40.
21. Baril A, Whiteside M, Boutin C (2005) Analysis of a database of pesticide residues on plants for wildlife risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry.* 24( 2): 360-371.
22. Bassil K L, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ ( 2007) Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Can Fam Physician.* 53(10): 1704-1711.
23. Ben Amara I, Soudani N, Hakim A, Bouaziz H, Troudi A, Zeghal KM, Zeghal N (2012) Dimethoate-induced oxidative damage in erythrocytes of female adult rats: possible protective effect of vitamin E and selenium supplemented to diet. *Toxicol Ind Health.* 28(3): 222-237.
24. Bhardwaj S, Srivastava MK, Kapoor U, Srivastava LP(2010) A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food Chem Toxicol.* 48(5): 1185-1190.
25. Bigelow PL, Jarrell J, Young MR, Keefe TJ, Love E J (1998) Association of semen quality and occupational factors: comparison of case-control analysis and analysis of continuous variables. *Fertil Steril.* 69(1): 11-18.
26. Blasco C, Fernandez M, Pico Y, Font G, Manes J (2002) Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anl Chim Acta.* 461(1): 109-116.
27. Blanchoud H, Farrugia F, Mouchel JM (2004) Pesticide uses and transfers in urbanized catchments chemosphere. 55 (66): 905-913.
28. Bolognesi C (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring Studies. *Mutat Res.* 543: 251–572.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

29. Bonnefont-Rousselot D, Jaudon MC, Issad B, Cacoub P, Congy F, Jardel C, Delattre J, Jacobs C (1997) Antioxidant status of elderly chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*.12: 1399-1405.
30. Bouvier G , Blanchard O, Momas I, Seta N ( 2006) Environmental and biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides: application to occupationally and non-occupationally exposed adult populations. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 16(5): 417-426.
31. Bouziani M (2007) L'usage immodéré des pesticides et graves conséquences sanitaires. *Santemaghreb le guide de la médecine et la santé*. 8p.
32. Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS (2006) Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect*. 114(2): 156-164.
33. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R (1970) Rapid method for the isolation of lipoproteins by precipitation with polyanions. *JLR*. 11: 583-595.
34. Burstein M, Fine A, Atger V (1989) Rapid method for the isolation of two purified subfractions of high density lipoproteins by differential dextran sulfate magnesium chloride precipitation. *Biochem*. 71: 741-746.
35. Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, Wolf FI, Palozza P (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*. 211(2): 87-96.
35. Campoy C, Jimenez M, Olea-Serrano MF, Moreno Frias M, Canabate F, Olea N, Bayés R, Molina-Font JA (2001) Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum dev*. 65: 183-190.
36. Carfi M, Gennari A, Malerba I, Corsini E, Pallardy M, Pieters R, Van Loveren H, Vohr HW, Hartung T, Gribaldo L (2007) In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology*. 229:11–22.
37. Carter WG, Tarhoni M, Rathbone AJ, Ray D E (2007) Differential protein adduction by seven organophosphorus pesticides in both brain and thymus. *Hum Exp Toxicol*. 26 (4): 347-353.
38. CCPA. Conseil Canadien de Protection des Animaux (1993) Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Ottawa. 1: 232.
39. CEC. Commission for Environmental Cooperation of North America (2002) Making the environment Healthier for Our Kids-An overview of environmental challenges to the health of North America's children. Rapport. 10p.
40. Cetin E, Kanbur M, Silici S, Eraslan G (2010) Propetamphos-induced changes in haematological and biochemical parameters of female rats: protective role of propolis. *Food Chem Toxicol*. 48(7): 1806-1810.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

41. Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B, Hinsinger P (2003) Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ Pollut.* 123(2): 229-238.
42. Chang KJ (1981) Immunologic evaluation of patients with polychlorinated biphenyl poisoning : determination of lymphocyte subpopulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 61: 58-63.
43. Chen J, Kumar M, Chan W, Berkowitz G, Wetmur J G ( 2003) Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. *Environ Health Perspect.* 111(11): 1403-1409.
44. Chen Z, Stewart PA, Davies S, Giller R, Krailo M, Davis M, Robinson L, Shu X (2005) Parental occupational exposure to pesticides and childhood germ-cell tumors. *Am J Epidemiol.* 162(9): 858-67.
45. Cluzeau S, Patunelle MC, Lhoutellier C (2000) Index phytosanitaire. Association de coordination technique agricole, ACTA, Paris. 644 p.
46. Colborn T, Vom Saal FS, Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 101(5): 378- 384.
47. Cole DC, Carpio F, Julian J, Leon N (1998) Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides. *J Toxicol Environ Health A.* 55(2): 77-91.
48. Colin F (2000) Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires Cas de l'Atrazine dans le bassin versant de Sousson (Gers, France). Unité mixte Cemagref-ENGREF. 233 p.
49. Cordier S (2008) Evidence for a role of paternal exposures in developmental toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 102(2): 176-181.
50. Corsini E, Birindelli S, Fustinoni S (2005) Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 208(2): 178-185.
51. CPP (Comité de la prévention et de la précaution) (2002) Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Ministère de l'écologie et du développement durable. Rapport. 47 p.
52. Cravedi J P, Zalko D, Savouret J F, Menuet A, Jegou B (2007) The concept of endocrine disruption and human health. *Med Sci Paris.* 23(2): 198-204.
53. Damstra T (2002) Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *J Toxicol Clin Toxicol.* 40(4): 457-465.
54. Das PP, Shaik AP, Jamil K (2007) Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health.* 23(8):449- 458.
55. Datta S, Dhar P, Mukherjee A, Ghosh S (2010) Influence of polyphenolic extracts from *Enhydra fluctuans* on oxidative stress induced by acephate in rats. *Food Chem Toxicol.* 48(10): 2766-2771.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

56. Dellatre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot (2005) Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris. 1-405p.
57. Derache R (1986) Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation–Lavoisier : Paris. 299-321p.
58. Dewailly E, Ayotte P, Bruneau S, Gingras S, Belles-Isles M, Roy R (2000) Susceptibility to Infections and Immune Status in Inuits Infants Exposed to Organochlorines. *Environ Health Perspect.* 108 (3): 205-211.
59. Domingues A, Barbisan LF, Martins PR, Spinardi-Barbisan AL (2011) Diuron exposure induces systemic and organ-specific toxicity following acute and sub-chronic exposure in male Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 31(3): 387-396.
60. Draper H, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186: 421-431.
61. Drechsel DA, Patel M (2008) Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 44(11): 1873-1886.
62. Duramad P, Tager IB, Leikauf J, Eskenazi B, Holland NT (2006) Expression of Th1/Th2 cytokines in human blood after in vitro treatment with chlorpyrifos, and its metabolites, in combination with endotoxin LPS and allergen Der p1. *J Appl Toxicol.* 26(5): 458–465.
63. ECH: European commission health (2006) Consumer protection directorate-general, Chemicals, contaminants and pesticides, Metribuzin. SANCO/10051/2006 –Rev. 1.1 November.
64. ECH: European commission health (2009) Consumer protection directorate-general, Chemicals, contaminants and pesticides, Mancozeb. SANCO/4058/2001– Rev. 4.4 July.
65. Efird JT, Holly EA, Preston-Martin S, Mueller BA, Lubin F, Filippini G, Peris-Bonet R, McCredie M, Cordier S, Arslan A, Bracci PM (2003) Farmrelated exposures and childhood brain tumours in seven countries: results from the Search International Brain Tumour Study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 17(2): 201-211.
66. EL Bakouri H (2006 ) Développement de nouvelles techniques de détermination des pesticides et contribution à la réduction de leur impact sur les eaux par utilisation des substances organiques naturelles. These de doctorat. Université Abdelmalel Essaadi, faculté des sciences et techniques. Tanger. 203 p.
67. Elbaz A, Tranchant C ( 2007) Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 262(1-2): 37-44.
68. Ellman G (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82 : 70-77.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

69. Elstner EF, Youngman R J, Obwald W (1983) Superoxide dismutase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H. B. Bergmeyer), 3rd ed., Vol. 3. 293-302p.
70. E.N.S.P (2000) Les pesticides et aliments. Annexe de l'Atelier santé environnement. 120p.
71. Esterbauer H, Striehl G, Puhl H, Rothen D, ER H (1989) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Biologie médicale*. 6: 67-75.
72. FAO/OMS. Commission du Codex Alimentarius, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004) Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires, 2, FAO/OMS, Rome 477p.
73. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders, Hollan N, Bonassi S, Zeiger E (2003) Humn project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesisblock micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mut Res*. 534: 65-75.
74. Feychting M, Plato N, Nise G, Ahlbom A (2001) Paternal occupational exposures and childhood cancer. *Environ Health Perspect*. 109(2): 193-196.
75. Filipov NM, Pinchuk LM, Boyd BL, Crittenden PL (2005) Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicol Sci*. 86(2): 324-332.
76. Firestone JA, Smith-Weller T, Franklin G, Swanson P, Longstreth WT, Checkoway H (2005) Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study. *Arch Neurol*. 62(1): 91-95.
77. Flower KB, Hoppin J A, Lynch CF, Blair A, Knott C, Shore DL, Sandler D (2004) Cancer risk and parental pesticide application in children of Agricultural Health Study participants. *Environ Health Perspect*. 112(5): 631-635.
78. Folch J, Lees M, Sloane- Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 226 (1): 497-509.
79. Foltz CH, Ullman-Culleré MH (1999) Guidelines for assessing the health and condition of mice. *Lab Animal*. 28 (4): 28-32.
80. Forastriere F, Quercia A, Iceli M, Settini L, Terezoni B, Rapiti E, Faustini A, Borgia P, Cavariani F, Perucci CA (1993) Cancer among farmers in Italy, *Scan. Work Environ. Health*. 19: 382-389.
81. Fournier M, Friberg J, Girard D, Mansour S, Krzystyniak K (1992) Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine (AAtrex) in mice. *Toxicol Lett*. 60(3): 263-274.
82. Freeman LEB, Bonner MR, Blair A (2005) Cancer incidence among male pesticide applicators in the agricultural health study cohort exposed to diazinon. *Am J Epidemiol*. 162(11): 1070-1079.
83. Gamet-payrastre L (2008) Contaminants alimentaires et cibles cellulaires : exemple des pesticides. *Physiologie Env*. 44p.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

84. Garabrant D, Held J, Langholtz B, Peters JM, Mack TM (1992) DDT and related compounds and risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer*. 84: 764-771.
85. Garry VF (2004) Pesticides and children. *Toxicol Appl Pharmacol*. 198(2): 152-163.
86. Geahchan A, Daou AZ (1995) Répertoire des produits phytosanitaires. Beyrouth, Liban. 244 p.
88. Gor DO, Rose NR., Greenspan NS (2003) Th1-Th2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol*. 4: 503-505.
89. Gornall AC, Bardawill CJ, David MM (1949) Determination of Serum Proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 177: 751-767.
90. GTPWOAUFSP (Guidelines To Promote The Wellbeing Of Animals Used For Scientific Purposes) (2008) planning, conducting and reviewing research protocols to maximise wellbeing and minimise pain and distress in animals. Australian Government. 41p.
91. Hamzaoui A (2009) Les antioxydants peuvent-ils prévenir les cancers. *Revue Tunisienne de médecine interne*. 93p.
92. Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, Scott BL, Vance JM, Scott WK (2008) Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol*. 8: 6-10.
93. Hariri AT, Moallem SA, Mahmoudi M, Memar B, Hosseinzadeh H (2010) Sub-acute effects of diazinon on biochemical indices and specific biomarkers in rats: protective effects of crocin and safranal. *Food Chem Toxicol*. 48(10):2803-2808.
94. Heacock H, Hertzman C, Demers PA, Gallagher R, Hogg RS, Teschke K, Hershler R, Bajdik CD, Dimich-Ward H, Marion SA, Ostry A, Kelly S (2000) Childhood cancer in the offspring of male sawmill workers occupationally exposed to chlorophenyl fungicides. *Environ Health Perspect*. 108(6): 499-503.
95. Hileman B (1995) Environmental estrogens cause breast cancer. *Scientific American*. 273 :199-172.
96. Hooghe RJ, Devos S, Hooghe-Peters EL (2000) Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sci*. 66: 2519–2525.
97. Ibrahim NA, El-Gamal BA (2003) Effect of diazinon, an organophosphate insecticide, on plasma lipid constituents in experimental animals. *J Biochem Mol Biol*. 36(5):499-504.
98. INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques (2005) Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation. Rapport. 16p.
99. Infante-Rivard C, Weichenthal S (2007) Pesticides and childhood cancer: an update of Zahm and Ward's 1998 review. *J Toxicol Environ Health*. 10: 81-99.
100. INRA – Cemagref : Institut Nationale de la Recherche Agronomique- Centre national du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts (2005) Pesticides, agriculture et

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Rapports INRA.

101. INRS : Institut national de la recherche scientifique (2002) Perturbateurs endocriniens et risques professionnels. Dossier médico-technique, ed.16 p. INRS, Paris.<http://www.inrs.fr/htm/>.

103. IWPCP (International Workshop on Corp Protection Chemistry) (2005) Les pesticides. Bulletin de veille. 33p.

104. Jagota SK, Dani HM (1982) A new colorimetric technique for estimation of vitamine C using folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry*. 127(1):178-182.

105. Jakubowski M, Trzcinka-Ochocka M (2005) Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health*. 47(1): 22-48.

106. Jurewicz J, Hanke W, Johansson C, Lundqvist C, Ceccatelli S, Van den Hazel P, Saunders M, Zetterstrom R (2006) Adverse health effects of children's exposure to pesticides: what do we really know and what can be done about it. *Acta Paediatr Suppl*. 95(453): 71-80.

107. Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Açikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y (2005) Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 211(3): 197-206.

108. Kamel F, Hoppin JA (2004) Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ Health Perspect*. 112(9): 950-958.

109. Karmaus W, Kuehr J, Kruse H (2001) Infections and atopic disorders in childhood and organochlorine exposure. *Arch Environ Health*. 56(6): 485-492.

110. Katika MR, Hendriksen PJ, De Ruijter NC, Van Loveren H, Peijnenburg A (2012) Immunocytological and biochemical analysis of the mode of action of bis (tri-n-butyltin) tri-oxide (TBTO) in Jurkat cells. *Toxicol Lett*. 212(2): 126-136.

111. Keifer M, Rivas F, Moon JD, Checkoway H (1996) Symptoms and cholinesterase activity among rural residents living near cotton fields in Nicaragua. *Occup Environ Med*. 53(11): 726-729.

112. Kogevinas M, Kauppinen T, Winkelmann R, Johnson ES, Bertazzi PA, Buneo De mesquite BH (1995) STM and NHL in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins: two nested case-control studie *Epidemology*. 6: 396-402.

113. Kozłowska A, Sadurska B, Szymczyk T (1988) Effect of dichlorvos on the activity of lipoprotein lipase from adipose tissue, on plasma lipids and postheparin lipolytic plasma activity in rats. *Arch Toxicol*. 62: 227-229.

115. Krieger TR, Loch-Carusio R (2001) Antioxidants prevent gamma-hexachlorocyclohexane-induced inhibition of rat myometrial gap junctions and contractions. *Biol Reprod*. 64(2): 537-547.

114. Kristensen P, Andersen A, Irgens LM, Bye AS, Sundheim L (1996) Cancer in off spring of parents engaged in aricultural activities in Norway. *Int J Cancer*.65: 39-50.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

116. Krockova J, Massányi P, Toman R, Danko J, Roychoudhury S (2012) In vivo and in vitro effect of bendiocarb on rabbit testicular structure and spermatozoa motility. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 47(9): 1301-1311.
117. Lackmann GM, Schaller KH, Angerer J (2004) Organochlorine compounds in breast-fed vs. bottle-fed infants: preliminary results at six weeks of age. *Sci Total Environ.* 329: 289-293.
118. Landrigan P, Garg A, Droller DB (2003) Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. *Environ Health Perspect.* 111(13): 1678- 1682.
119. Ledirac N, Antherieu S, d'Uby AD, Caron JC, Rahmani R (2005) Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicological Sciences.* 86(2): 444-452.
120. Lee WJ, Huang MS, Yang IC, Lai TC, Wang JL, Pang VF, Hsiao M, Kuo MY (2008 a) Essential roles of caspases and their upstream regulators in rotenone induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 371(1): 33-38.
121. Lee WJ, Son M, Chun BC, Park ES, Lee HK, Coble J, Dosemeci M (2008b) Cancer mortality and farming in South Korea: an ecologic study. *Cancer Causes Control.* 19(5): 505-513.
122. Levine RL, Garland D, Olivier CN, Amici A, Lenz AG, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464-478.
123. Li Q, Kawada T (2006) The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells. *Cellular and Molecular Immunology.* 3(3): 171-178.
124. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A (2003) Endocrine disruptors in the environment. *Pure and Applied chemistry.* 75: 631-681.
125. Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randall RI (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
126. Lu C, Barr DB, Pearson MA, Waller L A (2008) Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. *Environ Health Perspect.* 116(4): 537-542.
127. Lyons G (2000) Mixed messages: pesticides that confuse hormones. *Pesticides Action Network UK.* 4p.
128. Ma X, Buffler PA, Gunier RB, Dahl G, Smith MT, Reinier K., Reynolds P (2002) Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. *Environ Health Perspect.* 110(9): 955-960.
130. Manser CE (1992) The assessment of stress in laboratory animals. Harsham (United Kingdom): RSPCA. 208 p.
129. Marcheterre L, Choudhry G, Webster G (1988) Environmental Photochemistry of Herbicides. *Reviews of Environmental Contaminations and Toxicology.* 103: 61-126.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

131. Marinowic DR, Mergener M, Pollo TA, Maluf SW, Dasilva LB (2012) In vivo genotoxicity of the pyrethroid pesticide beta-cyfluthrin using the comet assay in the fish *Bryconamericus iheringii*. *Z Naturforsch C*. 67: 308-311.
132. McCarroll NE, Protzel A, Ioannou Y, Stack HF, Jackson MA, Waters MD, Dearfield KL (2002) A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutation Research*. 512: 1-35.
133. McCauley LA, Anger WK, Keifer M, Langley R, Robson MG, Rohlman D (2006) Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides. *Environ Health Perspect*. 114(6): 953-960.
134. Medjdoub A, Merzouk SA, Merzouk H, Chiali FZ, Narce M (2011) Effects of Mancozeb and Metribuzin on *in vitro* proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 101(1): 27-33.
135. Mehta G, Singh SP, Pandey SK, Sharma LD (2008) Cytotoxic response of endosulfan and chlorpyrifos pesticides in poultry lymphocyte culture. *Toxicol Intern*. 15: 97–101.
136. Meinert R, Schuz J, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J (2000) Leukemia and non- Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a register based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol*. 151(7) : 639-650.
137. Merhi 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. Université de Toulouse. 13-249 p.
138. Michaelis J, Haaf HG, Zollner J, Kaatsch P, Krummenauer F, Berthold F (1996) Case control study of neuroblastoma in west-Germany after the Chernobyl accident. *Klin Padiatr*. 208(4): 172-178.
139. Mills PK (1998) Correlation analysis of pesticide use data and cancer incidence rate in California Counties. *Arch Env Health*.53: 410-413.
140. Morison HI, Wilkins K, Semenciw R, Mao Y, Wigle D (1992) Herbicides and cancer. *J Natl Cancer Inst*. 84: 1866-1874.
141. Moser VC (2007) Animal models of chronic pesticide neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol*. 26(4): 321-331.
142. Mosesso P, Bohm L, Pepe G, Fiore M, Carpinelli A, Gäde G, Nagini S, Ottavianelli A, Degrassi F (2012) Cytogenetic analyses of Azadirachtin reveal absence of genotoxicity but marked antiproliferative effects in human lymphocytes and CHO cells *in vitro* *Toxicol Lett*. 213(3):361-366.
143. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65: 55–63.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

144. Moussa M, Tkaczuk J, Ragab J, Garcia J, Abbal M, Ohayon E, Ghisolfi J, Thouyenot JP (2000) Relationship between the fatty acid composition of rat lymphocytes and immune functions. *Br J Nutr.* 83:327–333.
145. Murado MA, Vazquez JA (2007) The notion of hormesis and the dose–response theory: a unified approach. *J Theor Biol.* 224: 489–499.
146. Myatt L , Cui X (2004) Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 122 (4):369-382.
147. Nasterlack M (2007) Pesticides and childhood cancer: an update. *Int J Hyg Environ Health.* 210(5): 645-657.
148. Nordstrom M (2000) Concentrations of Organochlorines Related to Titers to Epstein-Barr Virus Early Antigen IgG as Risk Factors for Hairy Cell Leukemia. *Environ Health Perspect.* 108 : 441-445.
149. OCDE: Organisation for Economic Co-operation and Development (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment. N° 19.
150. OCDE: Organisation for Economic Co-operation and Development (2001) Guidance document on Acute Oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment. N° 24.
151. Oerke E, Dehne, H (1997) Global crop production and the efficacy of crop production current situation and futures trends. *European Journal of Plant Pathology.* 103: 203- 215.
152. Ojha A, Srivastava N (2012) Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotoxicol Environ Saf.* 75(1):230-241.
153. Oliva A ,Spira A, Multigner L ( 2001) Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod.* 16(8): 1768-1776.
154. OMS : Organisation Mondiale de la Santé (2004) Environmental health criteria. 38: Genève. 81 p.
155. OPDCSET (Office Parlementaire D'évaluation Des Choix Scientifiques et Technologiques) (2009) Les effets des pesticides sur la santé humaine .Bulletin d'une Audition publique. 18p.
156. Ozcan A, Ware K, Calomeni E, Nadasdy T, Forbes R, Satoskar AA, Nadasdy G, Rovin BH, Hebert LA, Brodsky SV (2012) 5/6 nephrectomy as a validated rat model mimicking human warfarin-related nephropathy. *Am J Nephrol.* 35(4): 356-364.
157. Paterson S, Mackay D, Tam D, Shiu WY (1990) Uptake of organic chemicals by plants: a review of processes, correlations and model. *Chemosphere.* 21: 297-331.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

158. Pearce MS, Parker L (2000) Paternal employment in agriculture and childhood kidney cancer. *Pediatr Hematol Oncol.* 17(3): 223-230.
159. Peitl PJ, Sakamoto-Hojo ET, De Syllos Colus IM (1996) Genotoxic activity of the insecticide Nuvacron (Monocrotophos) detected by the micronucleus test in bone marrow erythrocytes of mice and in CHO cells. *Brazilian journal of Genetics.* 19(4): 571-576.
160. Perry MJ (2008) Effects of environmental and occupational pesticide exposure on human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 14(3): 233-242.
161. Phillips TM (2000) Assessing environmental exposure in children: immunotoxicology screening. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 10: 769-775.
162. Picó Y, Font G, Mañes J (2004) *Handbook of food analysis*, 2nd Ed., L. M. L. Nollet (Ed.), Marcel Dekker, New York, NY. 1072 p.
163. Pimentel D (1995) Amounts of pesticides reaching target pest: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics.* 8: 17-29.
164. Pogoda JM, Preston-Martin S (1997) Household pesticides and risk of pediatric brain tumors. *Environ Health Perspect.* 105(11): 1214-1220.
165. Popov A, Mirkov I, Zolotarevski L, Jovic M, Belij S, Kataranovski D, Kataranovski M (2011) Local proinflammatory effects of repeated skin exposure to warfarin, an anticoagulant rodenticide in rats. *Biomed Environ Sci.* 24(2): 180-189.
166. Porter WP (1999) Endocrine, immune and behavioural effects of aldicarb (carbamate), atrazine (triazine) and nitrate (fertilizer) mixtures at groundwater concentrations. *Toxicology and Industrial Health.* 15 : 150-153.
167. Qiao D, Seidler F J, Tate C A, Cousins MM, Slotkin TA (2003) Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *EnvironHealth Perspect.* 111(4): 536-544.
168. Rajeswary S, Kumaran B, Ilangovan R, Yuvaraj S, Sridhar M, Venkataraman P, Srinivasan N, Aruldas MM (2007) Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats. *Reprod Toxicol.* 24(3-4): 371-380.
169. Rakitsky VN, Koblyakov VA, Turusov VS (2000) Nongenotoxic (Epigenetic) Carcinogens: Pesticides as an Example. A Critical Review. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis.* 20 : 229-240.
170. Raoul C, Barriuso E, Bedos C, Benoit P, Charnay MP, Coquet Y (2005) *Les pesticides dans le sol, consequences agronomiques et environnementales.* Ed France Agricole. 637p.
171. Rappe A (1992) *Pesticides et Santé.* Ed. Association Pharmaceutique Belge, Bruxelles. 484 p.
172. Repetto R , Baliga SS (1996) *Pesticides and the Immune System : The Public Health Risk.* World Ressources Institute, Washington DC. 5p.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

173. Revitt D, Ellis J, Llewellyn N (2002) Seasonal removal of herbicides in urban runoff. *Urban Water*. 4: 13-19.
174. Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Hertz A, Harnly M (2002) childhood cancer and agricultural pesticide use: an ecologic study in California. *Environ Health Perspect*. 110 (3): 319-324.
175. Ribas-Fito N, Cardo E, Sala M, Eulalia de Muga M, Mazon C, Verdu A, Kogevinas M, Grimalt JO, Sunyer J (2003) Breastfeeding, exposure to organochlorine compounds, and neurodevelopment in infants. *Pediatrics*. 111(5-1): 580-585.
176. Rio MJ, Velez-Pardo C (2008) Paraquat induces apoptosis in human lymphocytes: protective and rescue effects of glucose, cannabinoids and insulin-like growth factor-1. *Growth Factors*. 26(1): 49-60.
177. Ritz P, Sallé A, Couet C (2007) How can we explain weight stability following weight loss? *Revue Obésité*, 1: 72-78.
178. Rodvall Y, Dich J, Wiklund K (2003) Cancer risk in offspring of male pesticide applicators in agriculture in Sweden. *Occup Environ Med*. 60(10): 798-801.
179. Rogan WJ (1988) Congenital poisoning by polychlorinated biphenyl and their contaminants in Taiwan. *Science*. 241: 334-336.
180. Romieu I, Hernandez-Avila M, Lazcano-Ponce E, Weber J P, Dewailly E (2000) Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. *Am J Epidemiol*. 152(4): 363-370.
181. Rowe AM, Brundage KM, Barnett JB (2007) In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release. *Toxicol Appl Pharmacol*. 221(2) : 179-188.
182. Rudant J, Menegaux F, Leverger G, Baruchel A, Nelken B, Bertrand Y, Hartmann O, Pacquement H, Verite C, Robert A, Michel G, Margueritte G, Gandemer V, Hemon D, Clavel J (2007) Family history of cancer in children with acute leukemia, Hodgkin's lymphoma or non-Hodgkin's lymphoma: the ESCALE study (SFCE). *Int J Cancer*. 121(1): 119-126.
183. Saafi-Ben Salah EB, El Arem A, Louedi M, Saoudi M, Elfeki A, Zakhama A, Najjar MF, Hammami M, Achour L (2012) Antioxidant-rich date palm fruit extract inhibits oxidative stress and nephrotoxicity induced by dimethoate in rat. *J Physiol Biochem*. 68(1): 47-58.
184. Sakr SA (2007) Ameliorative effect of ginger (*Zingiber officinale*) on Mancozeb fungicide induced liver injury in Albino rats. *Australian J Bas Appl Sci*. 1: 650–656.
185. Salameh PR, Waked M, Baldi I, Brochard P, Saleh BA (2006) Chronic bronchitis and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon. *Eur J Epidemiol*. 21(9): 681-688.
186. Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GWA, Van den Berg M (2002) Induction and Inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 182: 44-54.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

187. Sandford J, Ewbank R , Molony V, Tavernor WD, Uvarov O (1986) Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. *Vet Rec.* 118 (12): 334-338.
188. Sankar P, Telang AG, Manimaran A (2012) Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol.* 64(5): 487-93.
189. Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Round D (2008) Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology.* 244: 98-110.
190. Saunders M, Fox D, Salisbury C, Strokes V, Palmer A, Preece A (2004) Placental transfer and foetal uptake of pesticides *Toxicology and Applied Pharmacology.* 197: 341.
191. Schreinemachers DM, Creason JP, Garry VF (1999) Cancer mortality in agricultural regions of Minnesota. *Env Health Persp.* 107: 205-211.
192. Seo M , Kobayashi R, Okamura T , Ikeda K , Satoh M , Inagaki N , Nagai H , Nagase H (2012) Enhancing effects of trichloroethylene and tetrachloroethylene on type I allergic responses in mice. *J Toxicol Sci.* 37(2): 439-445.
193. Seth V, Ahmad R.S, Suke SG (2005) Lindane-induced immunological alterations in human poisoning cases. *Clin Biochem.* 38 (7): 678-680.
194. Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL (1996) Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect.* 104(12): 1296-1300.
195. Shelley LK, Ross PS, Kennedy CJ (2012) Immunotoxic and cytotoxic effects of atrazine, permethrin and piperonyl butoxide to rainbow trout following in vitro exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 33(2):455-458.
196. Siddharth M , Datta SK, Bansal S , Mustafa M, Banerjee BD , Kalra OP, Tripathi AK (2012) Étude des concentrations de pesticides organochlorés chez les patients atteints de néphropathie chronique: association avec le taux de filtration glomérulaire estimé et le stress oxydatif. *J Biochem Mol Toxicol.* 26 (6): 241-247.
197. Smith MT, McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Wiencke JK, Zheng S, Gunn L, Skibola CF, Ma X, Buffler PA (2005) Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicol Appl Pharmacol.* 206 (2): 237-245.
198. Srivastava AK, Srivastava PK, Al-Khedhairy AA, Musarrat J, Shukla Y (2012) Allethrin-induced genotoxicity and oxidative stress in Swiss albino mice. *Mutat Res.* 747(1): 22-8.
199. Steiblen G, Orsiere T, Pallen C, Botta A, Marzin D (2005) Comparison of the relative sensitivity of human lymphocytes and mouse splenocytes to two spindle poisons. *Mut Res Gen.* 588: 143–151.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

200. Stepnik M, Stańczyk M, Arkusz J, Lewińska D (2005) Assessment of apoptosis in thymocytes and splenocytes from mice exposed to arsenate in drinking water: cytotoxic effects of arsenate on the cells in vitro. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 40(2): 369-384.
201. Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK (2005) Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia.* 19(11): 8-12.
202. Sunol C, Babot Z, Fonfria E, Galofre M, Garcia D, Herrera N, Iraola S, Vendrell I (2008) Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanisms of Neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity. *Toxicol in vitro.* 22 (5): 1350-1355.
203. Takino M, Yamaguchi K, Nakahara T (2004) Determination of carbamate pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry.* 52: 727-735.
204. Tellier S, Desrosiers R, Duchesne RM, Samuel O (2006) Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses, Direction des politiques en milieu terrestre, Service des pesticides, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. 21-90 p.
205. Theus SA, Lau KA, Tabor DR, Soderberg LS, Barnett JB (1992) In vivo prenatal chlordane exposure induces development of endogenous inflammatory macrophages. *J Leukoc Biol.* 51(4): 366-372.
206. Trösken ER, Bittner N, Völkel W (2005) Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography.* 1083: 113-119.
207. Tsang MT, Trombetta LD (2007) The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes., *Toxicol Indust Health* 23(8): 459-470.
208. UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes (2006) Répartition mondiale des produits phytosanitaires par catégories de produits. Rapports d'études. 34p.
209. Urban DJ, Cook NJ (1986) Standard evaluation procedure: ecological risk assessment. EPA540/9-95-001. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C, 102 p.
210. Valery PC, McWhirter W, Sleight A, Williams G, Bain C (2002) Farm exposures, parental occupation, and risk of Ewing's sarcoma in Australia: a national case-control study. *Cancer.* 13(3): 263-270.
211. Van Der Gulden JWJ, Vogelzang PFJ (1996) Farmers at risk for prostate cancer. *Br. J. Urology.* 77: 6-10.
212. Van Der Werf H (1996) Assessing the impact on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 60: 81-96.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

213. Viel J F, Richardson ST (1993) Lymphoma, multiple myeloma and leukemia among French farmers in relation to pesticide exposure. *Soc Sci Med.* 37: 771-777.
214. Viel JF, Challier B, Pitard A, Pobel D (1998) Brain cancer mortality among French farmers: the vineyard pesticide hypothesis. *Arch Environ Health.* 53(1): 65-70.
215. Vine MF (2001) Plasma 1,1 Dichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl) ethylene (DDE) levels and immune response. *Am J of Epidemiol.* 221 (153): 53-63.
216. Wallace J, Sanford J, Smith MW (1990) The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *Laboratory Animals.* 24 (2): 97-130.
217. Whalen MM, Loganathan BG, Yamashita N, Saito T (2003) Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chem Biol Interact.* 145(3): 311-319.
218. Wolfe N, Mingelgrin U, Miller GC (1990) Abiotic transformations in water, sediments and soils. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. 104-160 p.
219. Yang J, Cao J, Sun X, Feng Z, Hao D, Zhao X, Sun C (2012) Effects of long-term exposure to low levels of organophosphorous pesticides and their mixture on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Fonct.* 30(2): 122-128.
220. Yoshida T, Ikemi N, Takeuchi Y, Ebino K, Kojima S, Chiba Y, Nakashima N, Kawakatsu H, Saka M, Harada T (2012) A repeated dose 90-day oral toxicity study of cyflumetofen, a novel acaricide, in rats. *J Toxicol Sci.* 37(1): 91-104.
221. Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH (2006) Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. *Toxicologie.* 227 (3): 240-247.
222. Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Perkovic P (2006) Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology In Vitro.* 20(6): 923-935.



# ANNEXE

## ANNEXES

**Tableau A1. Effets de Métribuzine ou du Mancozèbe sur la prolifération des lymphocytes et des splénocytes.**

<b>IP Mancozèbe</b>	<b>lymphocytes humains</b>	<b>Splénocytes de rat</b>
ConA	187,48 ± 20,63 <sup>a</sup>	218,64 ± 25,33 <sup>a</sup>
ConA+ 1µM	156,45 ± 16,15 <sup>a</sup>	114,17 ± 26,02 <sup>b</sup>
ConA+ 5µM	144,68 ± 11,04 <sup>b</sup>	108,65 ± 16,44 <sup>b</sup>
ConA+ 10µM	140,59 ± 10,11 <sup>b</sup>	79,88 ± 10,26 <sup>c</sup>
ConA+25µM	123,54 ± 11,28 <sup>c</sup>	69,70 ± 8,33 <sup>c</sup>
ConA+50µM	107,17 ± 10,55 <sup>d</sup>	57,67 ± 5,43 <sup>d</sup>
ConA+100µM	77,44 ± 8,03 <sup>e</sup>	48,04 ± 5,06 <sup>e</sup>
<b>IP Métribuzine</b>		
ConA	187,48 ± 20,63 <sup>b</sup>	218,64 ± 25,33 <sup>b</sup>
ConA+ 1µM	220,23 ± 22,16 <sup>a</sup>	276,47 ± 20,02 <sup>a</sup>
ConA+ 5µM	225,32 ± 19,24 <sup>a</sup>	273,53 ± 15,52 <sup>a</sup>
ConA+ 10µM	246,49 ± 20,88 <sup>a</sup>	284,12 ± 18,66 <sup>a</sup>
ConA+25µM	138,55 ± 18,73 <sup>c</sup>	141,27 ± 17,48 <sup>c</sup>
ConA+50µM	136,03 ± 16,65 <sup>c</sup>	138,24 ± 18,03 <sup>c</sup>
ConA+100µM	100,74 ± 12,04 <sup>d</sup>	108,82 ± 8,33 <sup>d</sup>

Les cellules ont été incubées en présence de la concanavaline A (ConA, 5 µg / ml), la Métribuzine ou le Mancozèbe (1-100 µM) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple à partir de 8 sujets sains et des rates de 8 rats. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de (LSD) afin de déterminer les différences significatives.<sup>a, b, c, d, ...</sup> Indiquent des différences significatives entre les différentes incubations ( P< 0,05).

## ANNEXES

Tableau A2. Effets de Métribuzine sur la sécrétion des cytokines.

	Métribuzine	
	lymphocytes humains	splénocytes de rat
<b>IL-2 (Pg/mL)</b>		
ConA	4129 ± 119 <sup>c</sup>	7809 ± 134 <sup>b</sup>
ConA+ 1µM	4782 ± 128 <sup>b</sup>	9633 ± 211 <sup>a</sup>
ConA+ 5µM	4821 ± 134 <sup>b</sup>	9554 ± 216 <sup>a</sup>
ConA+ 10µM	5221 ± 144 <sup>a</sup>	9963 ± 208 <sup>a</sup>
ConA+25µM	3026 ± 154 <sup>d</sup>	3450 ± 102 <sup>c</sup>
ConA+50µM	3011 ± 109 <sup>d</sup>	3036 ± 144 <sup>d</sup>
ConA+100µM	1293 ± 95 <sup>e</sup>	2675 ± 119 <sup>e</sup>
<b>INFγ (Pg/mL)</b>		
ConA	540,42 ± 30,18 <sup>b</sup>	580,07 ± 45,12 <sup>b</sup>
ConA+ 1µM	772,37 ± 34,28 <sup>a</sup>	888,53 ± 40,15 <sup>a</sup>
ConA+ 5µM	783,59 ± 27,44 <sup>a</sup>	882,35 ± 33,21 <sup>a</sup>
ConA+ 10µM	802,33 ± 39,50 <sup>a</sup>	931,55 ± 42,06 <sup>a</sup>
ConA+25µM	436,53 ± 31,15 <sup>c</sup>	498,37 ± 20,53 <sup>c</sup>
ConA+50µM	427,36 ± 33,03 <sup>c</sup>	460,18 ± 22,06 <sup>c</sup>
ConA+100µM	311,37 ± 26,62 <sup>d</sup>	400,16 ± 20,83 <sup>d</sup>
<b>IL-4 (Pg/mL)</b>		
ConA	58,37 ± 4,16 <sup>b</sup>	32,54 ± 3,33 <sup>b</sup>
ConA+ 1µM	76,34 ± 4,11 <sup>a</sup>	50,23 ± 4,02 <sup>a</sup>
ConA+ 5µM	79,38 ± 3,36 <sup>a</sup>	50,48 ± 3,66 <sup>a</sup>
ConA+ 10µM	83,11 ± 4,44 <sup>a</sup>	54,08 ± 3,52 <sup>a</sup>
ConA+25µM	44,73 ± 3,02 <sup>c</sup>	28,19 ± 1,28 <sup>c</sup>
ConA+50µM	42,39 ± 3,58 <sup>c</sup>	26,77 ± 1,22 <sup>c</sup>
ConA+100µM	22,55 ± 1,36 <sup>d</sup>	20,03 ± 1,35 <sup>d</sup>

Les cellules ont été incubées en présence de la concanavaleine A (ConA, 5 µg / ml), la Métribuzine (1-100 µM) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple à partir de 8 sujets sains et des rates de 8 rats. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de (LSD) afin de déterminer les différences significatives. <sup>a, b, c, d, ...</sup> Indiquent des différences significatives entre les différentes incubations (P< 0,05).

## ANNEXES

**Tableau A3. Effets du Mancozèbe sur la sécrétion des cytokines.**

	Mancozèbe	
	lymphocytes humains	splénocytes de rat
<b>IL-2 (Pg/mL)</b>		
ConA	4129 ± 119 <sup>a</sup>	7809 ± 134 <sup>a</sup>
ConA+ 1µM	3292 ± 140 <sup>b</sup>	4376 ± 125 <sup>b</sup>
ConA+ 5µM	3021 ± 135 <sup>b</sup>	4194 ± 133 <sup>b</sup>
ConA+ 10µM	2856 ± 127 <sup>b</sup>	3622 ± 108 <sup>c</sup>
ConA+25µM	2228 ± 103 <sup>c</sup>	3293 ± 111 <sup>d</sup>
ConA+50µM	1435 ± 78 <sup>d</sup>	2816 ± 122 <sup>e</sup>
ConA+100µM	1193 ± 82 <sup>e</sup>	2252 ± 117 <sup>f</sup>
<b>INFγ (Pg/mL)</b>		
ConA	540,42 ± 30,18 <sup>a</sup>	580,07 ± 45,12 <sup>a</sup>
ConA+ 1µM	456,23 ± 26,22 <sup>b</sup>	486,17 ± 31,19 <sup>b</sup>
ConA+ 5µM	403,58 ± 37,26 <sup>b</sup>	458,22 ± 24,33 <sup>b</sup>
ConA+ 10µM	375,04 ± 29,55 <sup>c</sup>	400,28 ± 30,77 <sup>c</sup>
ConA+25µM	321,50 ± 31,03 <sup>d</sup>	387,52 ± 27,82 <sup>d</sup>
ConA+50µM	265,69 ± 27,66 <sup>d</sup>	310,66 ± 29,02 <sup>e</sup>
ConA+100µM	200,38 ± 22,01 <sup>e</sup>	268,91 ± 22,95 <sup>f</sup>
<b>IL-4 (Pg/mL)</b>		
ConA	58,37 ± 4,16 <sup>a</sup>	32,54 ± 3,33 <sup>a</sup>
ConA+ 1µM	38,11 ± 3,02 <sup>b</sup>	21,33 ± 3,36 <sup>b</sup>
ConA+ 5µM	36,05 ± 4,02 <sup>b</sup>	20,41 ± 2,55 <sup>b</sup>
ConA+ 10µM	30,27 ± 3,78 <sup>b</sup>	16,73 ± 1,18 <sup>c</sup>
ConA+25µM	23,42 ± 2,02 <sup>c</sup>	14,05 ± 2,02 <sup>c</sup>
ConA+50µM	17,38 ± 2,66 <sup>d</sup>	10,44 ± 1,27 <sup>d</sup>
ConA+100µM	12,52 ± 2,01 <sup>e</sup>	6,75 ± 1,03 <sup>e</sup>

Les cellules ont été incubées en présence de la concanavaline A (ConA, 5 µg / ml), le Mancozèbe (1-100 µM) pendant 48 h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple à partir de 8 sujets sains et des rates de 8 rats. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de (LSD) afin de déterminer les différences significatives. \* indique différence significative par rapport à l'incubation avec l'agent mitogène seul (ConA), (P< 0,05) et (P<0,001).

## ANNEXES

**Tableau A4. Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Sérum (g/L)</b>	<b>1,11±0,05<sup>c</sup></b>	<b>1,29±0,07<sup>b</sup></b>	<b>1,26±0,04<sup>b</sup></b>	<b>1,16±0,06<sup>c</sup></b>	<b>1,34±0,05<sup>a</sup></b>	<b>1,40±0,06<sup>a</sup></b>	<b>0,01</b>
<b>VLDL (g/L)</b>	<b>0,24±0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,25±0,05<sup>b</sup></b>	<b>0,36±0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,25±0,02<sup>b</sup></b>	<b>0,28±0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,39±0,04<sup>a</sup></b>	<b>0,01</b>
<b>LDL (g/L)</b>	<b>0,32±0,04<sup>c</sup></b>	<b>0,67±0,04<sup>b</sup></b>	<b>0,68±0,02<sup>b</sup></b>	<b>0,31±0,02<sup>c</sup></b>	<b>0,80±0,05<sup>a</sup></b>	<b>0,87±0,06<sup>a</sup></b>	<b>0,01</b>
<b>HDL (g/L)</b>	<b>0,53±0,03</b>	<b>0,49±0,05</b>	<b>0,50±0,04</b>	<b>0,55±0,04</b>	<b>0,49±0,04</b>	<b>0,48±0,05</b>	<b>0,214</b>
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Sérum (g/L)</b>	<b>1,11±0,05<sup>c</sup></b>	<b>1,15±0,06<sup>c</sup></b>	<b>1,37±0,06<sup>a</sup></b>	<b>1,16±0,06<sup>b</sup></b>	<b>1,13±0,05<sup>b</sup></b>	<b>1,35±0,04<sup>a</sup></b>	<b>0,001</b>
<b>VLDL (g/L)</b>	<b>0,24±0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,27±0,04<sup>b</sup></b>	<b>0,67±0,07<sup>a</sup></b>	<b>0,25±0,02<sup>b</sup></b>	<b>0,23±0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,68±0,05<sup>a</sup></b>	<b>0,01</b>
<b>LDL (g/L)</b>	<b>0,32±0,04</b>	<b>0,33±0,05</b>	<b>0,35±0,01</b>	<b>0,31±0,02</b>	<b>0,33±0,04</b>	<b>0,36±0,04</b>	<b>0,214</b>
<b>HDL (g/L)</b>	<b>0,53±0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,54±0,04<sup>a</sup></b>	<b>0,32±0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,55±0,04<sup>a</sup></b>	<b>0,56±0,05<sup>a</sup></b>	<b>0,31±0,03<sup>b</sup></b>	<b>0,01</b>

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

## ANNEXES

**Tableau A5. Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les rats traités pas la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Sérum (g/L)</b>	0,94±0,04 <sup>d</sup>	1,43±0,04 <sup>b</sup>	1,57±0,03 <sup>a</sup>	0,78±0,03 <sup>e</sup>	0,96±0,04 <sup>d</sup>	1,22±0,04 <sup>c</sup>	0,005
<b>VLDL (g/L)</b>	0,46±0,03 <sup>e</sup>	0,97±0,03 <sup>b</sup>	1,13±0,04 <sup>a</sup>	0,37±0,02 <sup>f</sup>	0,56±0,05 <sup>d</sup>	0,80±0,04 <sup>c</sup>	0,001
<b>LDL (g/L)</b>	0,30±0,05	0,32±0,05	0,29±0,04	0,27±0,05	0,26±0,04	0,27±0,03	0,155
<b>HDL (g/L)</b>	0,16±0,02	0,17±0,03	0,15±0,04	0,15±0,03	0,14±0,02	0,16±0,05	0,137
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Sérum (g/L)</b>	0,94±0,04 <sup>b</sup>	0,93±0,05 <sup>b</sup>	1,41±0,04 <sup>a</sup>	0,78±0,03 <sup>c</sup>	0,77±0,08 <sup>c</sup>	1,53±0,06 <sup>a</sup>	0,01
<b>VLDL (g/L)</b>	0,46±0,03 <sup>b</sup>	0,45±0,04 <sup>b</sup>	0,68±0,05 <sup>a</sup>	0,37±0,02 <sup>c</sup>	0,36±0,04 <sup>c</sup>	0,67±0,03 <sup>a</sup>	0,01
<b>LDL (g/L)</b>	0,30±0,05 <sup>b</sup>	0,33±0,04 <sup>b</sup>	0,49±0,03 <sup>a</sup>	0,23±0,03 <sup>c</sup>	0,25±0,04 <sup>c</sup>	0,53±0,04 <sup>a</sup>	0,01
<b>HDL (g/L)</b>	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,13±0,03 <sup>b</sup>	0,33±0,02 <sup>a</sup>	0,15±0,03 <sup>b</sup>	0,14±0,02 <sup>b</sup>	0,32±0,03 <sup>a</sup>	0,01

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).



**Tableau A6. Variation des poids des organes chez les rats témoins et rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Foie (g)</b>	11,03±1,28 <sup>b</sup>	10,83±1,55 <sup>b</sup>	19,04±1,65 <sup>a</sup>	8,48±0,53 <sup>c</sup>	8,79±0,69 <sup>c</sup>	20,06±1,24 <sup>a</sup>	0,01
<b>Muscle (g)</b>	3,62±0,21 <sup>a</sup>	2,37±0,27 <sup>c</sup>	2,13±0,24 <sup>c</sup>	3,80±0,15 <sup>a</sup>	2,76±0,54 <sup>b</sup>	2,33±0,21 <sup>c</sup>	0,01
<b>Tissu adipeux (g)</b>	4,84±0,15 <sup>a</sup>	3,63±0,37 <sup>b</sup>	3,42±0,27 <sup>b</sup>	4,63±0,16 <sup>a</sup>	3,76±0,26 <sup>b</sup>	3,87±0,39 <sup>b</sup>	0,01
<b>Intestin</b>	4,89±0,43	4,99±0,35	4,67±0,44	5,15±0,53	4,94±0,64	4,87±0,87	0,148
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Foie (g)</b>	11,03±2,28 <sup>b</sup>	9,03±1,52 <sup>b</sup>	18,23±1,41 <sup>a</sup>	8,48±1,13 <sup>c</sup>	7,99±1,07 <sup>c</sup>	16,19±1,17 <sup>a</sup>	0,004
<b>Muscle (g)</b>	3,62±0,21 <sup>a</sup>	3,52±0,21 <sup>a</sup>	2,88±0,16 <sup>b</sup>	3,80±0,15 <sup>a</sup>	3,66±0,04 <sup>a</sup>	2,68±0,11 <sup>b</sup>	0,01
<b>Tissu adipeux (g)</b>	4,84±0,15 <sup>a</sup>	3,89±0,14 <sup>b</sup>	3,06±0,12 <sup>c</sup>	4,63±0,16 <sup>a</sup>	3,70±0,14 <sup>b</sup>	3,17±0,15 <sup>c</sup>	0,003
<b>Intestin (g)</b>	4,89±0,43	5,04±0,56	5,13±0,68	5,15±0,53	5,01±0,61	4,97±0,53	0,214

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

## ANNEXES

**Tablea A7. Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Foie (mg/g)</b>							
	105±20,40 <sup>c</sup>	171±13,26 <sup>b</sup>	261,67±17,53 <sup>a</sup>	119±27,11 <sup>c</sup>	167±18,80 <sup>b</sup>	260,50±21,89 <sup>a</sup>	0,01
<b>Muscle (mg/g)</b>							
	50±5,49	53,5±6,99	51,5±4,58	78,52±4,43	71,33±5,59	74,83±3,99	0,136
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>							
	386±19,20 <sup>a</sup>	285±10,53 <sup>b</sup>	275±13,32 <sup>b</sup>	375±21,21 <sup>a</sup>	221±13,42 <sup>c</sup>	230±14,37 <sup>c</sup>	0,01
<b>Intestin (mg/g)</b>							
	79±4,02	72,17±5,34	71±6,24	74,17±3,91	70,50±4,61	68±5,03	0,215
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Foie (mg/g)</b>							
	105±20,40 <sup>b</sup>	126 ±23,52 <sup>b</sup>	286±10,95 <sup>a</sup>	119±27,11 <sup>b</sup>	136±20,65 <sup>b</sup>	304±20,98 <sup>a</sup>	0,005
<b>Muscle (mg/g)</b>							
	50±3,49 <sup>b</sup>	56±4,43 <sup>b</sup>	38,63±3,40 <sup>d</sup>	78,52±4,43 <sup>a</sup>	84,58±4,31 <sup>a</sup>	45,81±3,53 <sup>c</sup>	0,001
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>							
	386±19,20 <sup>a</sup>	288±22,11 <sup>b</sup>	209±20,42 <sup>c</sup>	375±21,21 <sup>a</sup>	263±18,29 <sup>b</sup>	211±20,52 <sup>c</sup>	0,001
<b>Intestin (mg/g)</b>							
	79±4,02	75,54±3,17	73,27±4,71	74,17±3,91	75,39±2,72	72,17±4,03	0,145

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

## ANNEXES

**Tableau A8. Teneurs en protéines totales des organes chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Foie (mg/g)</b>	143±11,96 <sup>d</sup>	193,83±10,11 <sup>c</sup>	287±17,97 <sup>a</sup>	154±7,05 <sup>d</sup>	214±12,82 <sup>b</sup>	267±11,77 <sup>a</sup>	0,003
<b>Muscle (mg/g)</b>	119±4,95 <sup>a</sup>	63±3,92 <sup>d</sup>	54±2,41 <sup>e</sup>	88±2,86 <sup>b</sup>	72±5,23 <sup>c</sup>	58,01±4,13 <sup>e</sup>	0,002
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>	14,12 ±2,76	15±3,13	16±3,09	16,68±1,23	15,33±3,02	14±2,73	0,127
<b>Intestin (mg/g)</b>	24±1,73	26±2,42	26,15±2,47	25±2,73	24±6328	24,92±2,95	0,231
<b>Mancozèbe</b>							
<b>Foie (mg/g)</b>	143±11,96	150±21,07	164±16,41	154±7,05	160±15,30	155±18,46	0,233
<b>Muscle (mg/g)</b>	119±4,95 <sup>a</sup>	122±6,24 <sup>a</sup>	75,73±7,54 <sup>c</sup>	88±2,86 <sup>b</sup>	87±3,84 <sup>b</sup>	51,42±2,72 <sup>d</sup>	0,001
<b>Tissu adipeux (mg/g)</b>	14,12 ±2,76	12,17±2,27	11,67±2,84	16,68±1,23	17,67±1,39	15,33±2,65	0,154
<b>Intestin (mg/g)</b>	24±1,73	23,33±1,42	25±2,55	25±2,73	24,56±2,39	24,18±2,63	0,205

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

**Tableau A9 .Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Mancozèbe	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>Vitamine C</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	35,07 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	26,05 $\pm$ 1,73 <sup>b</sup>	24,05 $\pm$ 2,10 <sup>b</sup>	34,66 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	23,05 $\pm$ 1,80 <sup>b</sup>	24,07 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>	0,01
<b>Glutathion</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	1,37 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,65 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	0,61 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	1,69 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,66 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	0,65 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	0,006
<b>Catalase</b> (U/min/ml)	123,67 $\pm$ 5,79 <sup>b</sup>	75,83 $\pm$ 1,46 <sup>c</sup>	55 $\pm$ 2,52 <sup>d</sup>	138 $\pm$ 4,69 <sup>a</sup>	81,38 $\pm$ 2,80 <sup>c</sup>	57,12 $\pm$ 3,46 <sup>d</sup>	0,005
<b>Métribuzine</b>							
<b>Vitamine C</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	35,07 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	33,55 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup>	22,47 $\pm$ 1,11 <sup>c</sup>	34,66 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	36,26 $\pm$ 2,34 <sup>a</sup>	28 $\pm$ 1,82 <sup>c</sup>	0,005
<b>Glutathion</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	1,37 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,81 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	0,80 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	1,69 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,81 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	0,78 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	0,004
<b>Catalase</b> (U/min/ml)	123,67 $\pm$ 5,79 <sup>b</sup>	83 $\pm$ 2,82 <sup>d</sup>	63,25 $\pm$ 1,45 <sup>f</sup>	138 $\pm$ 4,69 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 2,03 <sup>c</sup>	70,63 $\pm$ 1,86 <sup>e</sup>	0,001

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

## ANNEXES

**Tableau A10. Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>MDA</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,82 $\pm$ 0,03 <sup>e</sup>	1,34 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	2,08 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,69 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>	1,52 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	1,86 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,001
<b>Protéines carbonylées</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,47 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	1,16 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	2,84 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,34 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	1,86 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	2,65 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	0,003
<b>DIC</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	14,67 $\pm$ 1,17 <sup>c</sup>	23 $\pm$ 1,40 <sup>b</sup>	29,84 $\pm$ 1,52 <sup>a</sup>	16 $\pm$ 1,03 <sup>c</sup>	28,33 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	29,12 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>	0,006
<b>Mancozèbe</b>							
<b>MDA</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,82 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	2,12 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,92 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,69 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	2,22 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	2,73 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,003
<b>Protéines carbonylées</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,47 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	1,51 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	1,83 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,34 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	1,51 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	1,72 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,005
<b>DIC</b> ( $\mu\text{mol/l}$ )	14,67 $\pm$ 1,17	14,83 $\pm$ 1,23	14 $\pm$ 2,52	16 $\pm$ 1,03	17,33 $\pm$ 1,82	16,67 $\pm$ 1,43	0,124

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

**Tableau A11. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et, les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>MDA</b> (nmol/g)	2,38±0,36 <sup>d</sup>	6,63±0,11 <sup>c</sup>	9,99±0,20 <sup>b</sup>	2,78±0,26 <sup>d</sup>	10,83±1,17 <sup>b</sup>	13,56±0,65 <sup>a</sup>	0,005
<b>Protéines carbonylées</b> (nmol/g)	0,86±0,12 <sup>b</sup>	2,42±0,31 <sup>a</sup>	2,82±0,51 <sup>a</sup>	1,04±0,07 <sup>b</sup>	2,55±0,36 <sup>a</sup>	2,44 ±0,31 <sup>a</sup>	0,01
<b>Glutathion</b> (µmol/g)	1,49±0,04 <sup>a</sup>	0,51±0,04 <sup>c</sup>	0,59±0,05 <sup>c</sup>	0,82±0,03 <sup>b</sup>	0,55±0,04 <sup>c</sup>	0,58±0,05 <sup>c</sup>	0,01
<b>Mancozèbe</b>							
<b>MDA</b> (nmol/g)	2,38±0,36 <sup>d</sup>	4,39±0,46 <sup>c</sup>	6,18±0,54 <sup>b</sup>	2,78±0,26 <sup>d</sup>	5,06±0,32 <sup>c</sup>	8,74±0,38 <sup>a</sup>	0,005
<b>Protéines carbonylées</b> (nmol/g)	0,86±0,12 <sup>d</sup>	1,83±0,14 <sup>c</sup>	2,95±0,22 <sup>a</sup>	1,04±0,07 <sup>d</sup>	2,28±0,18 <sup>b</sup>	2,67 ±0,42 <sup>a</sup>	0,005
<b>Glutathion</b> (µmol/g)	1,49±0,04 <sup>a</sup>	0,55±0,02 <sup>c</sup>	0,56±0,03 <sup>c</sup>	0,82±0,03 <sup>b</sup>	0,41±0,02 <sup>d</sup>	0,39±0,02 <sup>d</sup>	0,006

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

## ANNEXES

**Tableau A12. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et chez les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>MDA</b> (nmol/g)	0,98±0,03 <sup>d</sup>	4,57±0,05 <sup>b</sup>	5,65±0,13 <sup>a</sup>	0,45±0,03 <sup>c</sup>	5,32±0,21 <sup>a</sup>	5,45±0,21 <sup>a</sup>	0,004
<b>Protéines carbonylées</b> (nmol/g)	0,64±0,02 <sup>d</sup>	1,77±0,11 <sup>b</sup>	1,89±0,12 <sup>b</sup>	0,75±0,02 <sup>c</sup>	2,35±0,12 <sup>a</sup>	2,37±0,15 <sup>a</sup>	0,005
<b>Glutathion</b> (μmol/g)	0,44±0,02	0,45±0,03	0,42±0,03	0,48±0,03	0,48±0,03	0,47±0,04	0,126
<b>Mancozèbe</b>							
<b>MDA</b> (nmol/g)	0,98±0,03 <sup>e</sup>	2,58±0,05 <sup>d</sup>	3,08±0,04 <sup>c</sup>	0,45±0,03 <sup>f</sup>	3,75±0,05 <sup>b</sup>	4,36±0,04 <sup>a</sup>	0,001
<b>Protéines carbonylées</b> (nmol/g)	0,64±0,02 <sup>f</sup>	1,66±0,02 <sup>d</sup>	2,59±0,03 <sup>b</sup>	0,75±0,02 <sup>e</sup>	2,13±0,05 <sup>c</sup>	3,17±0,02 <sup>a</sup>	0,001
<b>Glutathion</b> (μmol/g)	0,44±0,02	0,45±0,04	0,48±0,06	0,48±0,03	0,46±0,07	0,49±0,04	0,136

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).

## ANNEXES

**Tableau A13. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de tissu adipeux chez les rats témoins et différents lots de rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>MDA (nmol/g)</b>	<b>0,57±0,02<sup>d</sup></b>	<b>1,52±0,03<sup>b</sup></b>	<b>1,74±0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,42±0,03<sup>e</sup></b>	<b>1,38±0,02<sup>c</sup></b>	<b>1,77±0,04<sup>a</sup></b>	<b>0,001</b>
<b>Protéines carbonylées (nmol/g)</b>	<b>0,33±0,04<sup>c</sup></b>	<b>1,24±0,03<sup>a</sup></b>	<b>1,29±0,04<sup>a</sup></b>	<b>0,33±0,04<sup>c</sup></b>	<b>1,05±0,08<sup>b</sup></b>	<b>0,98±0,05<sup>b</sup></b>	<b>0,004</b>
<b>Glutathion (µmol/g)</b>	<b>0,67±0,04</b>	<b>0,68±0,02</b>	<b>0,67±0,05</b>	<b>0,72±0,06</b>	<b>0,68±0,04</b>	<b>0,67±0,04</b>	<b>0,132</b>
<b>Mancozèbe</b>							
<b>MDA (nmol/g)</b>	<b>0,57±0,02<sup>d</sup></b>	<b>0,87±0,02<sup>c</sup></b>	<b>1,71±0,05<sup>b</sup></b>	<b>0,42±0,03<sup>e</sup></b>	<b>1,75±0,02<sup>b</sup></b>	<b>2,15±0,06<sup>a</sup></b>	<b>0,005</b>
<b>Protéines carbonylées (nmol/g)</b>	<b>0,33±0,04<sup>d</sup></b>	<b>1,55±0,03<sup>b</sup></b>	<b>1,74±0,04<sup>a</sup></b>	<b>0,33±0,04<sup>d</sup></b>	<b>1,39±0,05<sup>c</sup></b>	<b>1,67±0,05<sup>a</sup></b>	<b>0,004</b>
<b>Glutathion (µmol/g)</b>	<b>0,67±0,04</b>	<b>0,64±0,05</b>	<b>0,62±0,04</b>	<b>0,72±0,06</b>	<b>0,71±0,11</b>	<b>0,69±0,06</b>	<b>0,128</b>

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes (P < 0,05).



## ANNEXES

**Tableau A14. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les rats traités par la Métribuzine ou le Mancozèbe.**

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
<b>MDA</b> (nmol/g)	1,23±0,05 <sup>c</sup>	3,12±0,11 <sup>a</sup>	3,18±0,06 <sup>a</sup>	1,52±0,05 <sup>b</sup>	3,28±0,05 <sup>a</sup>	3,15±0,06 <sup>a</sup>	0,006
<b>Protéines carbonylées</b> (nmol/g)	0,43±0,03 <sup>d</sup>	1,94±0,03 <sup>b</sup>	2,23±0,11 <sup>a</sup>	0,54±0,02 <sup>c</sup>	2,31±0,06 <sup>a</sup>	2,26±0,04 <sup>a</sup>	0,005
<b>Glutathion</b> (µmol/g)	0,59±0,06	0,57±0,04	0,50±0,06	0,52±0,05	0,53±0,05	0,58±0,05	0,214
<b>Mancozèbe</b>							
<b>MDA</b> (nmol/g)	1,23±0,05 <sup>e</sup>	2,73±0,06 <sup>b</sup>	3,72±0,04 <sup>a</sup>	1,52±0,05 <sup>d</sup>	2,35±0,05 <sup>c</sup>	3,74±0,04 <sup>a</sup>	0,003
<b>Protéines carbonylées</b> (nmol/g)	0,43±0,03 <sup>e</sup>	1,28±0,04 <sup>c</sup>	1,59±0,03 <sup>b</sup>	0,54±0,02 <sup>d</sup>	1,27±0,02 <sup>c</sup>	1,81±0,04 <sup>a</sup>	0,004
<b>Glutathion</b> (µmol/g)	0,59±0,06	0,58±0,04	0,58±0,06	0,52±0,05	0,55±0,04	0,57±0,06	0,143

Chaque valeur représente la moyenne ± Ecart type, n= 8. D1: dose de Metribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j) ou D1: dose de Mancozèbe sans effet (5 mg/kg/j); D2 :DL50/100(50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d, ..... ) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

Tableau A15. Composition du Milieu RPMI1640.

Composants	RPMI1 1640 (mg/l)	Composants	RPMI1 1640 (mg/l)
<b>Sels inorganiques:</b>		L- Histidine (base libre)	15.00
Ca(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	100.00	L-Hydroxyproline	20.00
KCL	400.00	L-Isoleusine	50.00
MgSO <sub>4</sub> (anhydre)	-	L-Leucine	50.00
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	100.00	L-Lysine.HCL	40.00
NaCL	6000.00	L-Méthionine	15.00
NaHCO <sub>3</sub>	2000.00	L- Phénylalanine	15.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)	800.00	L- Proline	20.00
<b>Autres composants:</b>		L- Sérine	30.00
D-Glucose	2000.00	L- Thréonine	20.00
Glutathione (réduit)	1.00	L- Triptophane	5.00
HEPES	-	L- Tyrosine	20.00
Rouge de Phénol	5.00	L- Tyrosine (sel disodique)	-
<b>Acides aminés:</b>		L- Valine	20.00
L- Arginine (base libre)	200.00	<b>Vitamines:</b>	
L- Arginine HCL	-	D- Biotine	0.20
L-Asparagine (base libre)	50.00	Pantothénate de Calcium D	0.25
Acide L-Aspartique	20.00	Chlorure de choline	3.00
L- Cystine	50.00	Acide folique	1.00
L- Cystine. 2 HCL	-	i- inositol	35.00
Acide L - Glutamique	20.00	Nicotinamide	1.00
L- Glutamine	-	Pyridoxal HCL	1.00
L-Alanyl – L- Glutamine	-	Riboflavine	0.20
Glycyl-L-Glutamine	-	Thiamine HCL	1.00
Glycine	10.00	Vitamine B <sub>12</sub>	0.005

## ANNEXES