



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR EL OUED

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mémoire de Master

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences biologiques

Spécialité : Toxicologie

THEME

***Détermination in vitro et in silico des risques mutagènes et/ou
cancérogènes de quelques pesticides les plus utilisés en agriculture dans
la région d'El oued***

Présenté par : HACHEM Randa

Devant le jury composé de :

Présidente : Melle ZAIME Sihem

MAA, Université d'El Oued.

Examinatrice : Melle ZETTAL Housna

MAA, Université d'El Oued.

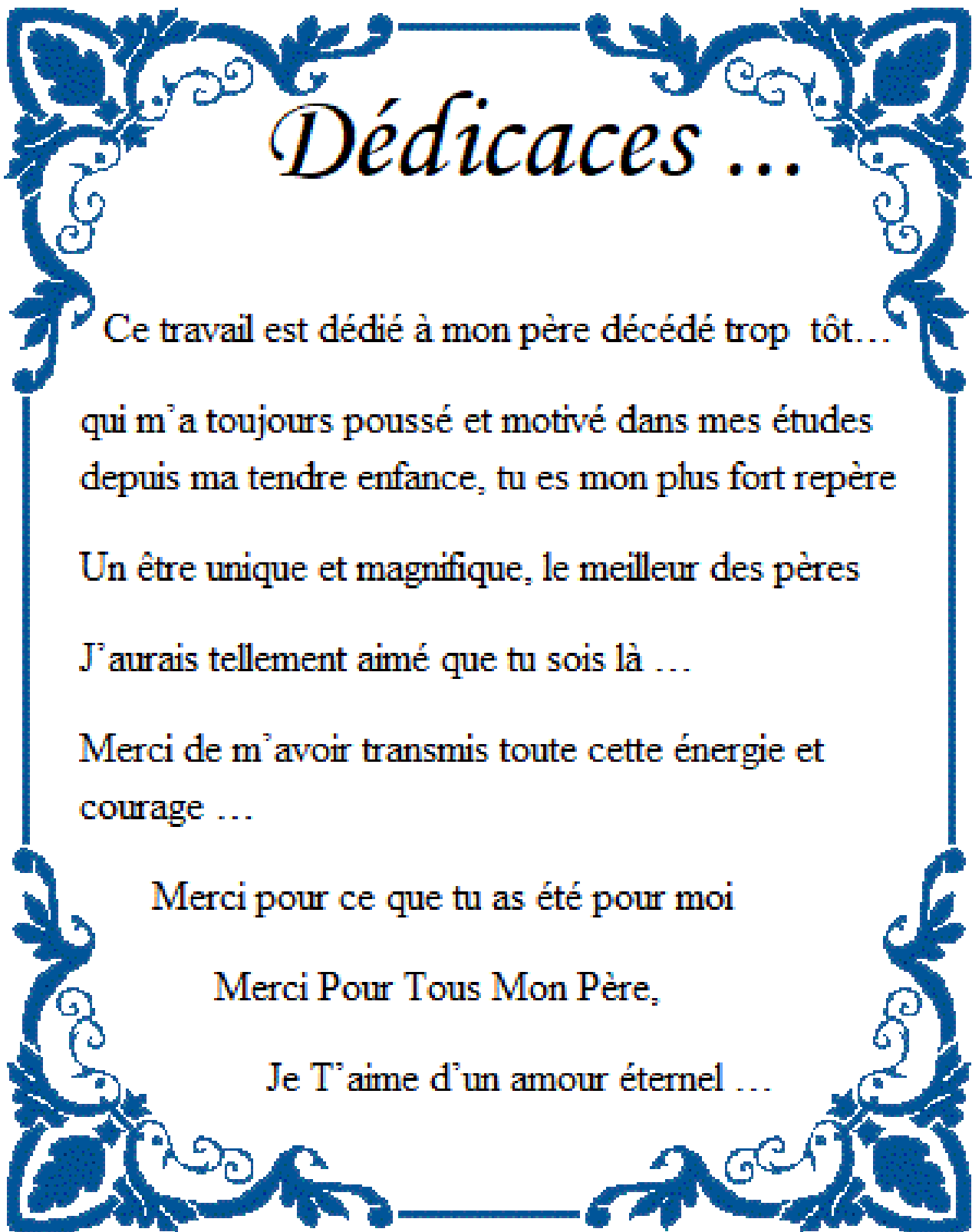
Promoteur : Mr LANEZ Touhami

Professeur, Université d'El Oued.

Co-promotrice : Mme ADAIKA Aicha

Doctorante, Université d'El Oued.

Année universitaire : 2019-2020

A decorative border with floral and scrollwork motifs in a light blue color, framing the text.

Dédicaces ...

Ce travail est dédié à mon père décédé trop tôt...

qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études
depuis ma tendre enfance, tu es mon plus fort repère

Un être unique et magnifique, le meilleur des pères

J'aurais tellement aimé que tu sois là ...

Merci de m'avoir transmis toute cette énergie et
courage ...

Merci pour ce que tu as été pour moi

Merci Pour Tous Mon Père,

Je T'aime d'un amour éternel ...

Dédicaces ...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
l'amour et la reconnaissance

A ma très chère mère: *HAMLAOUI CHAREUF. A*

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager
durant toutes les années de mes études, tu as été
toujours présente à mes côtés pour me consoler
quand il fallait.

Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et
longue vie afin que je puisse te comblé à mon tour.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de
mon parcours

Merci !

Remerciements

*En tout premier lieu, je remercie le bon **Dieu**, le tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.*

*Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (**VTRS**) à l'université d'El oued sous la direction de **Mr. LANEZ Touhami** qui je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté de m'encadrer.*

*Je tiens à écrire un 'MERCI' sincère pour **Mme ADAIKA Aicha** ma co-promotrice pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience, pour le temps qu'elle a consacré et pour les précieuses informations qu'elle m'a prodiguées avec intérêt et compréhension.*

*J'adresse aussi mes vifs remerciements pour **Mr. SAADI Hamza** pour tous ces encouragements pendant ces dernières années, merci de m'avoir donnée autant de force et de courage pour réaliser ce mémoire.*

Enfin, mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce projet, mes amis et mes collègues.

Résumé :

L'objectif de ce travail repose sur l'évaluation *in vitro* et *in silico* des effets mutagènes et/ou cancérogènes de deux pesticides les fréquemment utilisés par les agriculteurs la Wilaya d'El Oued, pour déterminer le type d'interaction entre les deux pesticides (Previcur et Karateka) avec l'ADN à pH=7.4 ; deux techniques expérimentales ont été utilisées (spectroscopie UV-Visible et voltamétrie cyclique) ainsi qu'une méthode théorique « Docking » pour confirmer les résultats.

Les résultats obtenus montrent qu'il y'a une interaction physique et spontanée pour les deux pesticides avec l'ADN. Ils se lient avec ce dernier avec des liaisons non covalentes de type intercalation et/ou interaction électrostatique traduite par les paramètres d'interaction, la constante de liaison K , l'énergie libre ΔG . Les coefficients de diffusion des formes libres et celles liées avec l'ADN ont été déduit à partir de l'équation de Randles-Sevcik. Les coefficients de diffusion des formes libres pour les deux pesticides sont inférieurs que celles liés avec l'ADN. Les tailles des sites de liaison des pesticides avec l'ADN ont été déterminées à partir des données électrochimiques.

Mots clés : pesticides, ADN, mutation, cancer, Spectroscopie UV-Visible, électrochimie, paramètres d'interaction K et ΔG , coefficient D , taille de site.

ملخص:

الهدف من هذا العمل يرتكز على التقييم المخبري *in vitro* و الحاسوبي *in silico* للآثار المطفرة و/أو المسرطنة لاثنين من المبيدات الأكثر استعمالا من طرف فلاحي ولاية الوادي, لتحديد نوع التفاعل بين المبيدات (بريفيكور إنرجي و كاراتيكا) مع الحمض النووي (ADN) في درجة حموضة = 7.4. تم استخدام تقنيتين تجريبيتين spectroscopie UV-Visible و voltamétrie cyclique, بالإضافة إلى تقنية نظرية و هي Docking من أجل تأكيد النتائج.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود تفاعل تلقائي و فيزيائي للمبيدات مع الحمض النووي, يرتبطون مع هذا الأخير بروابط غير تكافؤية من نوع إقحام و/أو التفاعل الكهروستاتيكي تترجم من قبل معايير التداخل K و ΔG . معاملات الانتشار D للأشكال الحرة و المرتبطة مع الـADN تم استنتاجها من معادلة Randles-Sevcik. معاملات الانتشار ذات الشكل الحر لكلا المبيدات أقل من تلك المرتبطة بالحمض النووي. تم تحديد أحجام مواقع ارتباط S المبيدين مع الحمض النووي من البيانات الكهروكيميائية.

كلمات مفتاحية:

مبيدات، الحمض النووي، طفرة، سرطان, Spectroscopie UV-Visible, électrochimie, معايير التداخل K و ΔG , معامل الانتشار D, حجم موقع الارتباط S.

Abstract:

The objective of this work is based on the *in vitro* and *in silico* evaluation of the mutagenic and / or carcinogenic effects of two pesticides frequently used by farmers in the Wilaya of El Oued, to determine the type of interaction between the two pesticides. (Previcur and Karateka) with DNA at pH = 7.4; two experimental techniques were used (UV-Visible spectroscopy and cyclic voltammetry) as well as a theoretical "Docking" method to confirm the results.

The results obtained show that there is a physical and spontaneous interaction for the two pesticides with DNA. They bind with DNA with non-covalent bonds of the intercalation and / or electrostatic interaction type, translated by the interaction parameters, the binding constant K, the free energy ΔG . The diffusion coefficients of free forms and those bound with DNA were deduced from the Randles-Sevcik equation. The free-form diffusion coefficients for both pesticides are lower than those bound with DNA. The sizes of the pesticide binding sites with DNA were determined from electrochemical data.

Keywords : Pesticides, DNA, mutation, cancer, UV-Visible spectroscopy, electrochemistry, K and ΔG interaction parameters, D coefficient, site size.

Liste des abréviations

Å : Angström

A : Absorbance

A : Adénine

ACTA : Association de coordination technique agricole

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFSSET : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

AMM : Autorisation de mise sur le marché

bp : Paire de bases

C : Concentration

C : Cytosine

Ca : Calcium

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CSB : Cassure simple brin

CL 50 : Concentration létale 50

D : Coefficient de diffusion

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DAR : Délai avant récolte

DES / DES : Dose sans effet

DJA : Dose journalière admissible

DL 50 : Dose létale 50

dlg : AutoDock docking log

DNAse : Désoxyribonucléase

DO : Densité optique

E : Potentiel

EC : Concentré émulsionnable

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

Epa : Potentiel de pic anodique

Epc : Potentiel de pic cathodique

FAO : Food and Agriculture Organization

Fe : Fer

g : gramme

G : Guanine

H : Hydrogène

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Hg : Mercure

I : Courant

INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale

Ipa : Courant de pic anodique

Ipc : Courant de pic cathodique

K : Potassium

K : constant de liaison

Kcal : Kilocalories

KCl : Chlorure de potassium

Kg : Kilogramme

KJ : Kilojoules

K₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de potassium

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique

L : Litre

LMR : Limite maximale de résidus

M : molaire

μA : micro-ampère

MA : Matière active

min : Minute

mg : Milligramme

Mg : Magnésium

mm² : Millimètre carré

mV : milliVolte

mV/s : millivolt sur seconde

Na : Sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NH₄ : Ammonium

nm : Nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la santé

P : Pesticide

Pdb : Protein Data Bank

Pdbqt : Protein Data Bank, Partial Charge

PE : Perturbations endocriniennes

pH : potentiel Hydrogène

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship

R : Constante des gaz parfaits

ROS : Espèces réactives oxygénées

S : Taille de site de liaison

SC : Suspension concentrée

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SL : Concentré soluble

T° : Température

T : Temps

TLB : Tampon de lyse des globules blancs

TLR : Tampon de lyse des globules rouges

Trs : Tours

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

U : Uracile

UV : Ultra-violet

V : Volume

VC : Voltammétrie cyclique

Vis : Visible

VTRS : Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes

WHO : World Health Organization

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Modes de pénétration et du devenir des pesticides dans l'organisme	16
02	Modèle de transfert des pesticides dans la chaîne alimentaire	18
03	Effets des pesticides sur la mitochondrie et conséquences au niveau cellulaire	20
04	Effets des pesticides sur le système endocrinien	22
05	La gestion du risque au Québec (2003)	23
06	les différentes phases de la cancérogenèse induite par un xénobiotique	28
07	Mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de cancérogenèse	30
08	Structure de la molécule d'ADN	33
09	Les différentes bases azotées d'ADN	34
10	Représentation schématique des différentes lésions de l'ADN	35
11	Schéma synthétisant les différents types de lésions primaires à l'ADN et les mécanismes de réparation associés	36
12	Allure générale de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs Caractéristiques	43
13	Principe du spectrophotomètre UV-Visible	47
14	Protocole générale de Docking moléculaire	48
15	Les étapes de Docking moléculaire	50
16	Structure de l'ADN d'un Dodécamère	61
17	Procédure de Docking avec AutoDock	63
18	Spectre d'absorption d'ADN extrait	65
19	Spectre d'absorption UV-Vis de Previcur 0.29×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.09M à pH=7.4	67
20	La droite de régression d'absorbance $A_0/A-A_0$ en fonction de l'inverse de la concentration d'ADN de Previcur 0.29×10^{-3} M.	67
21	Voltammogrammes cycliques de Previcur 0.29×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.09 M pH=7.4 à une vitesse de balayage	69

	du potentiel 100 mV/S.	
22	La droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa0 - ipa)$ de Previcur 0.29×10^{-3} M.	70
23	Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de 3.5×10^{-6} M d'ADN de Previcur de 0.29×10^{-3} M.	71
24	Courant des pics anodiques de Previcur 0.29×10^{-3} M tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence de 3.55×10^{-6} M d'ADN (ligne rouge).	72
25	Tracé de $C1/Cn ((i-i0)/i0)$ en fonction de [ADN] de Previcur 0.29×10^{-3} M.	73
26	Spectre d'absorption UV-Vis de Karateka 0.34×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN.	74
27	La droite de régression d'absorbance $A0/A-A0$ en fonction de l'inverse de la concentration d'ADN de Karateka 0.34×10^{-3} M.	75
28	Voltammogrammes cycliques de Karateka 0.34×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4) 0.09 M à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.	76
29	La droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa0 - ipa)$ de Karateka 0.34×10^{-3} M.	77
30	Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de l'ADN de Karateka 0.34×10^{-3} M.	78
31	Courant des pics anodiques de Karateka 0.34×10^{-3} M tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence de 3.55×10^{-6} M d'ADN (ligne rouge).	79
32	Tracé de $C1/Cn ((i-i0)/i0)$ en fonction de [ADN] de Karateka 0.34×10^{-3} M.	80
33	Interaction de Previcur avec l'ADN. (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction	81

	Previcur-ADN, désoxyadénosine (DA): rouge, désoxycytosine (DC): jaune, désoxyguanine (DG): bleu, désoxythymidine (DT): brun foncé, Vue en surface de Previcur amarré avec de l'ADN.	
34	Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimées par Kcal. mol ⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre Previcur et l'ADN.	82
35	Interaction de Karateka avec l'ADN. (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction Previcur-ADN, désoxyadénosine (DA): rouge, désoxycytosine (DC): jaune, désoxyguanine (DG): bleu, désoxythymidine (DT): brun foncé, Vue en surface de Previcur amarré avec de l'ADN.	83
36	Distance exprimée en Å (a) et énergie exprimée par Kcal. mol ⁻¹ (b) de liaison hydrogène formée entre Karateka et l'ADN.	84

Liste des photos

N°	Titre	Page
01	Pesticide PREVICUR® ENERGY	40
02	Pesticide KARATEKA	41
03	Dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé voltampérogramme	45
04	Spectrophotométrie UV-Visible (SHIMADZU1800)	58
05	Dispositif expérimental voltampérométrique utilisé	59

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Produits chimiques agricoles y compris les pesticides (P) et leur activité	8
02	Les principales familles des insecticides, herbicides et fongicides	10
03	Mode d'action des pesticides	12
04	Classement des pesticides selon CIRC	25
05	Les 05 niveaux de dangerosité des produits chimiques selon l'OMS	26
06	Doses et usages homologuées de Previcur Energy	40
07	La ratio DO260/DO280 de la solution d'ADN extrait	68
08	Valeurs de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-Previcur obtenues à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.	70
09	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure 20	71
10	La constante et l'énergie libre de liaison calculées à partir du tracé du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa_0 - ipa)$ pour Previcur	72
11	Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel.(previcur)	73
12	Coefficients de diffusion de Previcur et de ADN-Previcur	74
13	Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et Previcur	75
14	Valeurs de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-Karateka obtenues à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.(Karateka)	77

15	Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure 27.	78
16	La constante et l'énergie libre de liaison calculées à partir du tracé du $\log$	79

	$1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa_0 - ipa)$	
17	Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel.	80
18	Coefficients de diffusion de Karateka et de ADN-Karateka	81
19	Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et Karateka	81
20	Différentes conformations de l'interaction Pesticides-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K .	82
21	Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de Previcur et d'ADN impliqués dans ces liaisons.	84
22	Différentes conformations de l'interaction Pesticides-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K .	85
23	Distance et énergie de la liaison hydrogène, et les atomes de Karateka et d'ADN impliqués dans cette liaison.	86

Tableau de matière

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Liste d'abréviations	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Tableau de matière	
Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Les pesticides	
I. Généralité sur les pesticides :	5
I.1. Histoire des pesticides :	5
I.2. Définition des pesticides :	5
I.3. Composition des pesticides :	6
I.4. Façon de catégoriser les pesticides :	7
I.4.1. Classification selon la cible biologique :	7
I.4.2. Classification selon la nature chimique :	8
I.4.2.1. Pesticides inorganiques :	9
I.4.2.2. Pesticides organo-métalliques :	9
I.4.2.3. Pesticides organiques :	9
I.4.3. Classification selon l'usage :	11
I.4.4. Classification toxicologique :	11
I.5. Mode d'action des pesticides :	12

I.6. Aperçu de l'état des pesticides en Algérie :	13
II. Toxicologie et pathologies liées aux pesticides :	13
II.1. Toxicologie des pesticides :	13
II.2. Impact des pesticides sur l'environnement et la santé humaine:	14
II.2.1. L'impact des pesticides sur l'environnement :	14
II.2.2. Impact des pesticides sur l'être humain :	15
II.2.2.a. Effet à court terme :	17
II.2.2.b. Effet à long terme :	17
II.3. Facteurs influant sur la toxicité des pesticides pour l'homme :	17
II.4. Résidus et toxicité :	17
II.4.1. Toxicité aiguë et DL50 :	18
II.4.2. Toxicité chronique et dose sans effet :	19
II.4.2.a. Dose journalière admissible :	19
II.4.2.b. Limite maximale de résidus :	20
II.5. Les pathologies liées à l'exposition aux pesticides :	20
II.5.1. Le stress oxydatif et l'effet des pesticides sur la mitochondrie :	20
II.5.2. Les maladies neurologiques :	21
II.5.3. Les perturbations endocriniennes (PE) :	21
II.6. Analyse des risques des pesticides pour l'homme :	22
II.7. Pesticides et cancers :	24
II.7.1. Processus de cancérogenèse :	26
II.7.1.a. L'initiation :	27
II.7.1.b. La promotion :	27
II.7.1.c. La progression :	28
II.7.2. Classement des substances par mode d'action principal :	29

II.7.2.a. Substances cancérigènes génotoxiques :.....	29
II.7.2.b. Substances cancérigènes non- génotoxiques :	29

Chapitre II : L'ADN : (Acide Désoxyribonucléique)

I.1. Histoire de l'ADN :	32
I.2. Définition :	32
I.3. Composition et structure d'ADN :	33
I.4. Nature et origine des lésions d'ADN :	35
II.4.1. La génotoxicité :	36
II.4.2. Notion d'adduit :	37

Chapitre III : Le contexte théorique des techniques expérimentales utilisées

I. Les pesticides utilisés pour cette étude :	40
I.1. PREVICUR ENERGY :	40
I.1.1. Mode d'action :	40
I.2. KARATEKA :	41
II.Méthode électrochimique d'analyse :	42
II.1. La voltampérométrie cyclique :	42
II.2. Le montage électrochimique :	43
II.2.1. La cellule électrochimique :	43
II.2.2. Les électrodes :	44
II.2.3. Potentiostat :	44
II.2.4. Electrolyte :	44
III. La spectroscopie UV-Visible :	45
III.1. Principe de la spectrophotométrie UV-visible :	46
III.2. Loi de Beer-Lambert :	46
IV. Amarrage moléculaire avec AUTODOCK:	47

IV.1. Modélisation du potentiel énergétique :	48
IV.2. Principe théorique :	49
IV.3. Les étapes de Docking :	49
IV.3.1. Le Docking :	50
IV.3.2. Le Scoring :	50
V.Gaussian :	50

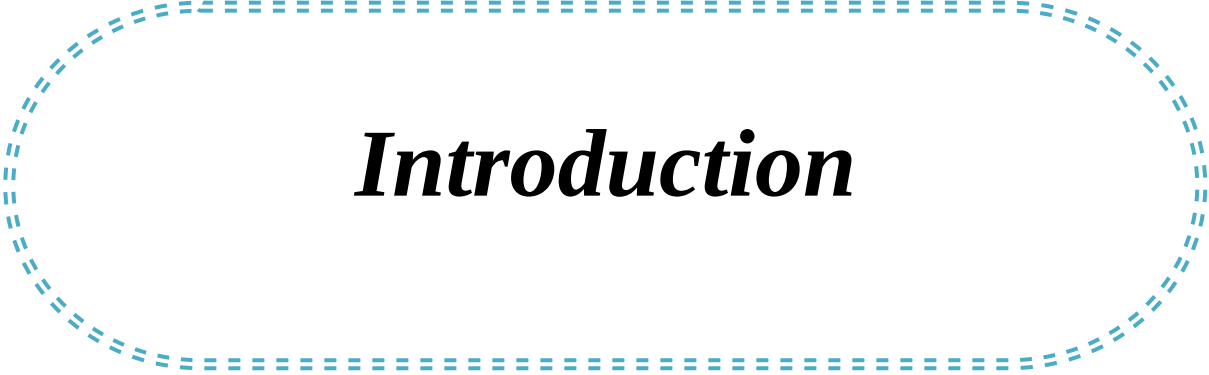
Partie II : Partie pratique

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.Matériels d'étude :	54
I.1. Matériel biologique.....	54
I.2. Produits chimiques	54
I.2.1. Les pesticides utilisés :	54
I.2.2. Les solutions de lyse:	54
I.2.3. Poudres et solution utilisées:	55
I.3. Matériels non biologiques (appareils et instruments):.....	55
II.Méthodes d'étude :	55
II.1. Etude in vitro :	55
II.1.1. Prélèvement sanguin :	55
II.1.2. Extraction d'ADN :	55
II.1.3. Méthodes utilisées pour la détermination des effets mutagènes et/ou cancérogènes :	57
II.1.3.1. Spectrophotométrie UV-VIS :	57
II.1.3.2. Méthode électrochimique :	59
II.2. Etude in silico :	61
II.2.1. Préparation des pesticides (ligand) :	61
II.2.2 Préparation d'ADN :	61
II.2.3 Processus d'AutoDock :	61

Chapitre II: Résultats et discussion

I.Résultats :	65
I.1. Etude in vitro :	65
I.1.1. Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN	65
I.1.1.a. La concentration d'ADN :	65
I.1.1.b. Analyse de la pureté d'ADN :	66
I.1.2. Etude de l'interaction entre l'ADN et Previcur :	66
I.1.2.1. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-Previcur :	66
I.1.2.2. Etude électrochimique par voltammétrie cyclique d'ADN-Previcur :	68
I.1.2.2.1. Constante et énergie libre de l'interaction ADN-Previcur :	68
I.1.2.2.2. Coefficient de diffusion :	71
I.1.2.2.3. Taille de site de liaison :	73
I.1.3. Etude de l'interaction entre l'ADN et Karateka :	74
I.1.3.1. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-Karateka :	74
I.1.3.2. Etude électrochimique par voltamétrie cyclique d'ADN-Karateka :	75
I.1.3.2.1. Constante et énergie libre de l'interaction ADN-Karateka :	75
I.1.3.2.2. Coefficient de diffusion :	78
I.1.3.2.3. Taille de site de liaison :	80
I.3. Etude in silico :	80
I.3.a. Previcur :	80
I.3.b. Karateka :	83
II.Discussion :	85
Conclusion générale	89
Annexes	91
Références bibliographiques	95



Introduction

Introduction

La conscience environnementale, par rapport à la question de la nocivité des substances chimiques, s'est progressivement développée durant les dernières décennies. Aujourd'hui elle se pose avec une certaine conviction en étroite relation avec la nécessité de prendre en compte la sécurité environnementale.

Le souci est de contrôler la qualité des différents compartiments environnementaux et de leurs niveaux de contamination par les pesticides, les engrais et les autres polluants. Par ailleurs, cet aspect est devenu une préoccupation internationale majeure avec/après la déclaration de Rio sur l'environnement et le développement (**BETTICHE, 2017**).

En effet, leur utilisation est toujours en croissance et de nouvelles matières actives sont continuellement et fréquemment introduites sur le marché ; les contrôles très récents indiquent une présence permanente et préoccupante de résidus et multi-résidus contaminant les denrées diverses. Par conséquent l'examen de ces résidus et de leurs effets demeure une nécessité, surtout que pour de nombreux pesticides, l'ADN est la cible primordiale. Bien que dotés d'actions hautement spécifiques, certains pesticides sont capables d'interagir avec les structures cellulaires directement ou après transformation par les enzymes du métabolisme, et de former une liaison covalente avec les bases de l'ADN donnant des adduits à l'ADN, biomarqueurs de génotoxicité (**JAWICH, 2006**).

L'Algérie, en tant que pays utilisateur de produits phytosanitaires est aussi concernée par les effets néfastes des pesticides.

L'action mutagène et cancérogène des pesticides sur les animaux de laboratoire est bien connue et plusieurs études ont montré que l'exposition chronique à de faibles doses de pesticides peut causer des mutations. Les résidus de pesticides peuvent être présents dans les fruits et les légumes et représentent un risque pour la santé humaine. Des études ont montré que l'exposition chronique à de faibles niveaux de pesticides peut causer des anomalies congénitales et prénatales. En plus, l'exposition est associée à la cancérogénicité (**BOUGUERRA et BOUMAZA, 2015**).

L'ADN joue un rôle très important dans les processus de la vie car il porte l'information génétique et instruit la synthèse biologique des protéines et des enzymes nécessaires pour la réplication et la transcription de l'information génétique dans la vie cellulaire. Les mécanismes de liaison entre les petites molécules et l'ADN a été identifié comme un point essentiel durant des décennies (**ADAIKA, 2016**).

L'objectif de cette étude est d'évaluer et déterminer l'existence ou non des risques mutagènes et/ou cancérogènes de deux pesticides couramment utilisés dans la Wilaya d'El oued sur un extrait d'ADN obtenu. Les interactions résultantes peuvent se faire par *in silico* et *in vitro* par méthodes spectroscopique et électrochimique.

Introduction Générale

Mon travail est présenté en trois parties :

- La première partie c'est bien la partie bibliographique qui se compose de trois chapitres ; le premier chapitre comporte une idée générale sur les pesticides, le deuxième sur l'acide désoxyribonucléique et le dernier chapitre concerne le contexte théorique des techniques expérimentales utilisées.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale et est divisée en :
 - 1- Matériels et méthodes
 - 2- Résultats et discussion
 - 3- Conclusion

Première partie

Synthèse bibliographique

CHAPITRE 01

Les pesticides

Partie I : Synthèse bibliographique**Chapitre 01 : Les pesticides****I. Généralité sur les pesticides :****I.1. Histoire des pesticides :**

Les pesticides sont utilisés depuis fort longtemps ; l'usage du soufre remonte à la Grèce antique (1000 ans B.C.) et l'arsenic est recommandé en 79 A.D par Pline, naturaliste romain, en tant qu'insecticide. Des plantes connues pour leurs propriétés toxiques ont été utilisées comme pesticides contre les rongeurs (l'Aconit). Les produits arsenicaux ou à base de plomb (Arséniate de plomb) étaient utilisés au 16ème siècle en Chine et en Europe. Les propriétés insecticides du tabac (nicotine) étaient connues dès 1690. En Inde, en 1850, deux principaux insecticides naturels sont développés : la roténone et pyrethrum. Leur usage s'est répandu en Europe vers 1900.

Au 19ème siècle, avec le progrès de la chimie minérale, un grand nombre de fongicides minéraux de sulfate de cuivre à base d'arsenate et à base de mercure sont employés contre les invasions fongiques de la vigne, de la pomme de terre et pour le traitement des semences.

Au début de l'année 1920, l'application abusive de l'arsenate sur les fruits et légumes a conduit à l'existence des résidus toxiques, ceci a orienté la recherche vers des composants organiques peu dangereux tels que l'huile de pétrole, l'huile de goudron et le dinitro-ortho-cresol. Ce dernier, en 1933 est utilisé comme un herbicide contre les mauvaises herbes et les céréales.

Auparavant, la recherche de matières actives se faisait au hasard. Désormais, l'accent est mis sur la compréhension des modes d'action et la recherche de cibles nouvelles (relations structure-activité) (MAIRIF, 2015).

I.2. Définition des pesticides :

Le terme de pesticide dérive de "Pest", mot anglais désignant tout organisme vivant (virus, bactéries, champignons, herbes, vers, mollusques, insectes, rongeurs, mammifères, oiseaux) susceptible d'être nuisible à l'homme et/ou à son environnement. Les pesticides, dont la traduction étymologique est "tueurs de fléaux" sont des molécules dont les propriétés toxiques permettent de lutter contre les organismes nuisibles (PERIQUET, 2004).

Les pesticides ont été appliqués de manière préventive afin de repousser ou d'atténuer les effets des organismes nuisibles. Leur action peut se faire par :

- Le contact
- L'ingestion
- Autres sortes d'expositions effectives pendant les phases de croissance (**AYAD-MOKHTARI, 2012**).

Dans les textes relatifs à la réglementation européenne, on distingue :

- **Les produits phytopharmaceutiques** (au sens de la Directive 91/414/CE du 15 Juillet 1991) : ils sont utilisés principalement pour la protection des végétaux en agriculture contre les attaques de champignons parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres ou encore pour lutter contre les adventices ou "mauvaises herbes". Leurs utilisations peuvent s'élargir dans d'autres secteurs (sylviculture, aménagement des paysages et entretien des abords d'axes de transport, jardinage amateur).
- **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 les 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. (**MERHI, 2008**).

I.3. Composition des pesticides :

Un pesticide comprend une ou des substances actives (ou matières actives) et des matières additives. Les substances actives ne sont pas utilisées telles quelles mais elles sont « formulées ». La formulation des pesticides vise à assurer une efficacité optimale à la substance active et à en faciliter l'application pour l'agriculteur. Le produit commercial est donc un mélange de plusieurs composants : il contient la substance active associée à divers formulant : les diluants (solvants, charges), les additifs (matière colorante ou odorante) et les adjuvants (produits destinés à améliorer la performance de la substance active) qui peuvent eux-mêmes présenter une certaine toxicité pour la plante traitée et l'utilisateur. Les formulations sont soit liquides (ex : concentrés

solubles (SL) ou concentrés émulsionnables (EC), ou suspensions concentrées (SC)) ou solides (exemple : en poudre mouillable (WP) ou en granulés dispersables (WG) (**LOUCHAHI, 2015**).

I.4. Façon de catégoriser les 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 lutter mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose (**MERHI, M, 2008**).

I.4.1. Classification selon la cible biologique :

Les centaines de pesticides agricoles chimiques peuvent être classés selon le type de ravageur ou de maladie qu'ils combattent.

Tableau 1 : Produits chimiques agricoles y compris les pesticides (P) et leur **activité** (BOLAND et al., 2004).

<i>Catégorie</i>	<i>Activité</i>
<i>Algicide</i>	Tue les algues, sur le bois par ex
<i>Anorexigène</i>	Prévient que les animaux se nourrissent de la culture ou du produit stocké
<i>Appât</i>	Attire les animaux provoquant des fléaux
<i>Bactéricide (P)</i>	Tue ou inhibe la croissance des bactéries
<i>Fongicide (P)</i>	Désinfectant pour moisissures et champignons
<i>Fumigant (P)</i>	Gaz ou fumée contre les ravageurs ou les moisissures dans les produits stockés
<i>Herbicide</i>	Tue ou inhibe la croissance des mauvaises herbes
<i>Régulateur de croissance d'insectes</i>	Modifie les phases de développement ou de croissance des insectes
<i>Insecticide (par ex. aphicide) (P)</i>	Tue ou nuit aux insectes (par ex. aux pucerons)
<i>Miticide / acaricide</i>	Tue ou nuit aux acariens (ou araignées)
<i>Molluscicide</i>	Tue les escargots et les limaces
<i>Nématicide (P)</i>	Tue les nematodes
<i>Repousseur d'indésirables</i>	Eloigne les animaux causant des fléaux
<i>Rodenticide</i>	Tue les rats, les souris, les rongeurs
<i>Stérilisant</i>	Stérilise les insectes par voie chimique
<i>Termiticide (P)</i>	Tue ou nuit aux termites

I.4.2. Classification selon la nature chimique :

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 sont : les pesticides inorganiques, les pesticides organo-métalliques, et les pesticides organiques.

I.4.2.1. Pesticides inorganiques :

Ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grande quantité comme le soufre ou le cuivre. Ce sont des pesticides très anciens dont l'emploi est apparu bien avant la chimie organique de synthèse. De cette époque ne subsistent aujourd'hui aucun insecticide, un seul herbicide employé en tant que désherbant total (chlorate de sodium) et quelques fongicides à base de soufre et cuivre comme la bouillie bordelaise.

I.4.2.2. Pesticides organo-métalliques :

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe fait d'un métal comme le zinc ou le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate (exemple : mancozèbe avec le zinc, manèbe avec le manganèse).

I.4.2.3. Pesticides organiques :

Ils sont très nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques. Il existe actuellement plus de 80 familles ou classes chimiques dont les plus connues sont : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyrèthrinoïdes, les triazines, les imidazoles et d'autres groupes (tels que le dérivé dipiridiniques, organomercuriale, organocinabres, fenoxiacétiques, pyrèthrines et les dérivés triaziniques) (GHENABZIA, 2017).

Les principales familles des insecticides, herbicides et des fongicides sont groupées dans le tableau (tab.2).

Tableau 02 : Les principales familles des insecticides, herbicides et fongicides (GHENABZIA, 2017).

Insecticides	Herbicides	Fongicides
Minéraux		
Soufre ; Quartz, magnésie Composés fluorés Dérivés de mercure Dérivés de Sélénium Composés à base de silice Huiles de pétrole	Sels de NH ₄ , 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 dicarbosimides ; Dérivés de l'oxyquinoline	Carbamates et dithiocarbamate Dérivés du benzène Dérivés des quinones Amides ;Benzonitriles Toluidines, Organophosphorés
Divers		
Pyréthrinoïdes de synthèse Produits bactérien Répulsifs	Dicamba Pichlorame Paraquat	Carboxines Chloropicrine Doguanide Formol

I.4.3. Classification selon l'usage :

Les pesticides sont utilisés dans plusieurs domaines d'activité pour lutter contre les organismes vivants nuisible, d'où des usages différents. Il existe six catégories de pesticides classés selon leurs usages, c'est-à-dire, selon la destination des traitements :

1. Les cultures.
2. Les bâtiments d'élevage.
3. Les locaux de stockage des produits végétaux.
4. Les zones non agricoles.
5. Les bâtiments d'habitation.
6. Les êtres vivants (l'homme et les animaux) **(KEBAIL ,2018)**.

I.4.4. Classification toxicologique :

La classification des produits repose sur la base des résultats d'études toxicologiques et leurs effets sur la santé humaine. Avant les produits étaient répartis en trois classes :

- Classe A : très toxiques, toxiques ou corrosifs
- Classe B : drogues
- Classe C : nocifs, irritants ou sensibilisants, accessibles à tout utilisateur.

Actuellement une autre classification est en usage. Il s'agit selon ACTA (2004) :

- 1- T+ : substances et préparations très toxiques qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent entraîner des risques extrêmement graves, aigus ou chroniques et même la mort.
- 2- T : substances et préparations toxiques qui dans les mêmes conditions que ci-dessus, peuvent entraîner des risques graves aigus ou chroniques et même la mort.
- 3- Xn : substances et préparations nocives qui par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent entraîner des risques graves limitées.
- 4- C : substances et préparations corrosives qui en contact avec des tissus vivants peuvent exercer une action destructive sur ces derniers **(KHEDD, 2012)**.

I.5. Mode d'action des pesticides :

Par mode d'action, on entend généralement le mécanisme par lequel la substance va exercer son effet sur la cible biologique du ravageur visé. La grande diversité des cibles s'accompagne d'une grande variété de modes d'action, aussi bien entre les différentes catégories de pesticides qu'à l'intérieur même de ces catégories, en lien avec leurs propriétés physicochimiques, et donc toxicologiques.

Tableau 03 : Mode d'action des pesticides (BELMEHEL, 2019).

<i>HERBICIDE</i>	
De contact Systémique Sélectif Non sélectif Résiduaire Non résiduaire	• Agit sur les parties de la plante avec lesquelles il entre en contact. • Absorbé par la plante, se déplace à l'intérieur de celle-ci. • Ne contrôle que certaines plantes traitées. • Contrôle toutes les plantes traitées. • Se dégradent lentement et contrôle les plantes sur une longue période. • Est rapidement inactif après son application et ne contrôle les plantes que sur une courte période.
<i>FONGICIDES</i>	
Préventif Curatif	• Protège la plante en empêchant que la maladie ne se développe. • Réprime une maladie qui est déjà développée.
<i>INSECTICIDES</i>	
De contact D'inhalation D'ingestion	• Agit lorsque l'insecte entre en contact avec le produit. • Agit lorsque l'insecte respire le produit. • Agit lorsque l'insecte se nourrit du produit.

I.6. Aperçu de l'état des pesticides en Algérie :

En Algérie, l'usage des insecticides, des fertilisants, des engrais, des détergents, et autres produits phytosanitaires (les pesticides) se répond de plus en plus avec le développement de l'agriculture, mais aussi dans le cadre des actions de lutte contre les vecteurs nuisibles.

Le même auteur cité plus haut indique que au cours de la campagne de lutte antiacridienne de «2004-2005 », plusieurs tonnes de pesticides «des organophosphorés, des carbamates et la deltaméthrine» ont été utilisés par épandage ou par pulvérisation dans les régions infectées par le criquet pèlerin, dans la région du Sud et dans le Tell. Puis depuis les cinq dernières années, une autre forme d'utilisation intensive de pesticides se généralise dans de nombreuses wilayas du pays, dans le cadre du programme nationale de lutte contre les zoonoses et plus particulièrement dans la lutte contre les pathologies vectorielles : la leishmaniose, une maladie qui a pris de l'ampleur malheureusement dans toutes les régions du pays, compte tenu de bouleversement écologiques et des dégradations environnementales urbaines et rurales. Ces divers types de traitements par les pesticides se font généralement pour parer à l'urgence, mais sans souci aucun des conséquences environnementales directes et des conséquences sanitaires à long terme liées aux infiltrations de ces substances non dégradables dans les sols, les sources et la nappes, puis vers les écosystèmes en atteignant les végétaux, les animaux et nécessairement l'homme (GUEDDOU et NEDJAA, 2017).

II. Toxicologie et pathologies liées aux pesticides :**II.1. Toxicologie des pesticides :**

C'est le manque de sélectivité des pesticides vis-à-vis de leur cible qui provoque la plupart des effets nocifs pour l'environnement. Les animaux absorbent les pesticides via la nourriture ou l'eau d'alimentation, via l'air respiré ou au travers de leur peau ou de leur cuticule. Ayant franchi diverses barrières, le toxique atteint les sites du métabolisme ou est stocké. Dans les cas où les vitesses d'excrétion ou de métabolisation de la molécule sont faibles, où elle est liposoluble, où elle est fortement liée à d'autres constituants de l'organisme, sa concentration finale dans l'organisme sera plus élevée que dans le milieu de cet organisme. Pour ce qui est des substances liposolubles, la bioaccumulation dépend du coefficient de partage octanol-eau K_{ow} ; si celui-ci est élevé et la vitesse de dégradation faible, la substance s'accumulera à des concentrations

croissantes dans les organismes se succédant le long de la chaîne trophique. C'est ce qu'on appelle la bioaccumulation. Et il est évident qu'un pesticide qui suit ce processus est à exposition et toxicité égales, plus dangereux pour l'environnement qu'un autre produit qui ne s'accumule pas **(Hayo,1997)**.

Dans le secteur agricole, les sources potentielles de contamination sont nombreuses et difficilement quantifiables. L'exposition aux pesticides peut se produire dès l'achat du produit, durant son transport et son stockage. La phase de préparation de la bouillie (il s'agit en général de la dilution du produit commercial dans une cuve d'épandage) est considérée comme une phase critique d'exposition : produit concentré, risques d'accidents de manipulation. Le risque de contamination lors de l'épandage des pesticides (en milieu ouvert ou fermé) est quant à lui très dépendant du type de matériel utilisé et des caractéristiques du produit (liquide, poudre...) **(BLADI. I et al., 2019)**.

II.2. Impact des pesticides sur l'environnement et la santé humaine:

Le durcissement récent de la réglementation des pesticides au niveau européen et Français n'est pas anodin. En effet, plusieurs études ont démontré la toxicité et l'écotoxicité de certaines des substances actives utilisées dans les préparations commerciales. Cette section a pour but de présenter succinctement ces différents effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement en général **(MOHAMED, 2012)**.

II.2.1. L'impact des pesticides sur l'environnement :

Les pesticides peuvent être responsables de pollutions diffuses et chroniques et/ou aiguës et accidentelles, lors de leur fabrication, transport, utilisation ou lors de l'élimination de produits en fin de vie, dégradés, inutilisés ou interdits. Les risques pour l'environnement sont d'autant plus grands que ces produits sont toxiques, utilisés sur des surfaces et à des doses/fréquences élevées et qu'ils sont persistants et mobiles dans les sols, présentant ainsi un danger pour la population et les écosystèmes (insecticides néonicotinoïdes et déclin des abeilles).

Pour les pouvoirs publics, les obligations les plus immédiates sont le respect des normes de contamination des eaux : normes en vigueur pour les pesticides dans les eaux de boisson, normes pour toutes les «masses d'eau» (Directive cadre eau), de surface et souterraines. L'air et les sols pourraient à terme être également concernés. Les leviers d'actions consisteraient à

intervenir sur la dispersion des pesticides dans l'environnement (30 à 50% des substances actives qui peuvent se retrouver dans l'air lors d'un épandage par pulvérisation) et sur les moyens de limiter leur transfert vers les milieux aquatiques (**ANZIVINO *et al.*, 2006**).

II.2.2. Impact des pesticides sur l'être humain :

Les pesticides pénètrent dans l'organisme selon trois voies principales : la voie cutanée, la voie orale et la voie respiratoire.

Les études d'exposition ont démontré que la voie cutanée est la première voie de pénétration dans l'organisme. Dès 1962, l'exposition cutanée au DDT durant le traitement des pommes 25 était évaluée à 271 mg/homme/heure et l'exposition respiratoire à 0,12 mg/homme/heure.

D'autres travaux plus récents ont montré que lors de traitements par les pesticides en milieu ouvert l'exposition cutanée était, au moins cent fois supérieure à l'exposition par inhalation.

Les propriétés de rétention de la peau dépendent des caractéristiques physico-chimiques des pesticides et des caractéristiques individuelles (sudation, dilatation des vaisseaux sanguins par fortes chaleurs...). Des indices caractérisant l'absorption dermique selon le type de pesticides peuvent être utilisés pour déterminer la dose interne.

La voie orale peut contribuer à l'exposition des travailleurs par le contact de la bouche avec les mains, les gants ou du matériel souillés, et par le fait de manger ou fumer sur le lieu de travail. Par ailleurs, différents auteurs ont attiré l'attention sur certaines interventions comme le débouchage de buses en soufflant directement dans le matériel défectueux et le non-respect par les travailleurs des règles d'hygiène (lavage après les traitements, lavage des gants avant de les enlever...) qui peuvent aussi entraîner un risque de contamination par voie orale.

Néanmoins, cette voie de contamination orale non alimentaire est difficile à estimer en raison de la grande variabilité individuelle de ces pratiques.

L'exposition aux pesticides par voie respiratoire concerne plus particulièrement en milieu professionnel les fumigations, la préparation ou l'application dans les milieux fermés (serres, silos, bâtiments d'élevage, ...) ou l'application de pesticides à l'aide d'un équipement à haute

pression. Il a été calculé que l'exposition respiratoire représentait de 7 à 9 % de l'exposition totale chez des applicateurs de fongicides dans des serres. Certaines formulations de pesticides, comme les poudres, sont plus susceptibles de se disperser par voie aérienne et de pénétrer dans l'arbre bronchique.

En population générale, la voie orale est fréquemment considérée comme la voie d'exposition la plus importante même si la part respective des différentes voies d'exposition est encore incertaine. Elle est essentiellement due à l'ingestion d'aliments ou de boissons contenant des résidus de pesticides. Une ingestion non alimentaire par les poussières est en outre possible et considérée comme importante particulièrement chez les jeunes enfants. Les enfants sont aussi exposés in utero, par passage transplacentaire des substances auxquelles la mère est exposée. Les nourrissons sont également exposés aux pesticides par le lait maternel, notamment aux molécules persistantes et bio-accumulables comme les organochlorés (MAMANE, 2015).

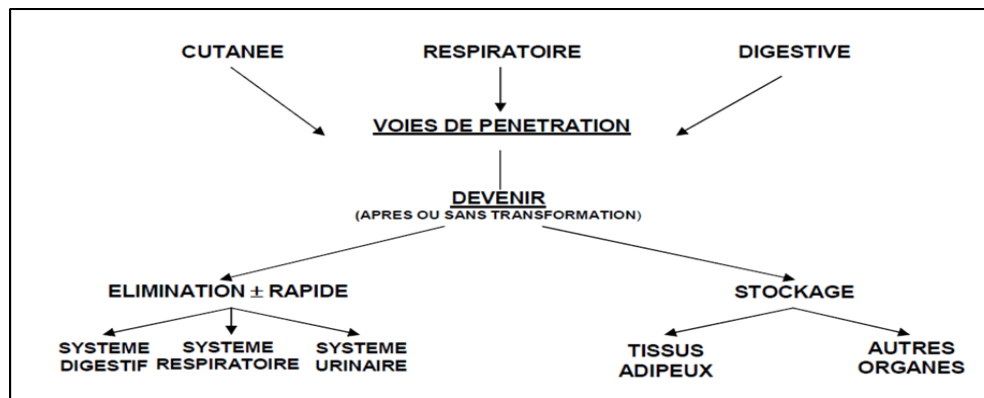


Figure 01 : Modes de pénétration et du devenir des pesticides dans l'organisme (PERIQUET, 2004).

II.2.2.a. Effet à court terme :

Les effets se manifestent par une atteinte locale et/ ou systémique, entraînant des affections respiratoire, neurotoxique, cardiovasculaire, endocrine, gastro-intestinale, néphrotoxique et allergique.

II.2.2.b. Effet à long terme :

- Dommage sur les poumons : bronchite, asthme ou autres maladies des poumons. Les dommages chroniques sur les poumons peuvent causer le cancer.
- Cancer : Les personnes exposées aux pesticides peuvent contracter facilement un cancer ; les cancers les plus fréquents causés par les pesticides sont le cancer du sang (leucémie), le lymphome non hodgkinien et les cancers du cerveau.
- Dommage sur le foie : L'hépatite toxique est la plus fréquente.
- Dommage sur le système nerveux : la perte de mémoire, l'anxiété, les changements d'humeur et les troubles de concentration sont très fréquents.
- Dommage sur le système immunitaire : Certains pesticides affaiblissent le système immunitaire qui protège le corps contre les maladies. Lorsque le système immunitaire est affaibli, il est plus facile d'avoir des allergies et des infections. C'est pourquoi l'exposition aux pesticides peut aggraver d'autres problèmes de santé (RAHOUI, 2012).

II.3. Facteurs influant sur la toxicité des pesticides pour l'homme :

La gravité des effets nocifs éventuels résultant de l'exposition à un pesticides dépend de la dose, des modalités de l'exposition, du degré d'absorption, de la nature des effets de la matière active et des métabolites, ainsi que de l'accumulation et de la persistance du produit dans l'organisme. En outre, les effets toxiques dépendent de l'état de la santé de la personne en cause. Il est probable que la malnutrition et la déshydratation renforcent la sensibilité aux pesticides (Organisation mondiale de la santé [OMS], 1991).

II.4. Résidus et toxicité :

Lors de la constitution d'un dossier d'AMM, des essais toxicologiques en laboratoire doivent être réalisés sur l'animal afin de déterminer la toxicité du produit, et donc a posteriori les doses d'application afin qu'il n'y ait aucune toxicité pour l'utilisateur, le consommateur,

l'environnement après traitement. Ces essais sont réalisés suivant des normes, dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire. Ils permettent d'étudier la relation dose/ effet, le mécanisme d'action toxique, la réversibilité des effets, l'existence d'un seuil pour les effets toxiques, la spécificité d'espèce et la potentialité d'extrapolation à l'homme (OTMANI. YAHIAOUI, 2016).

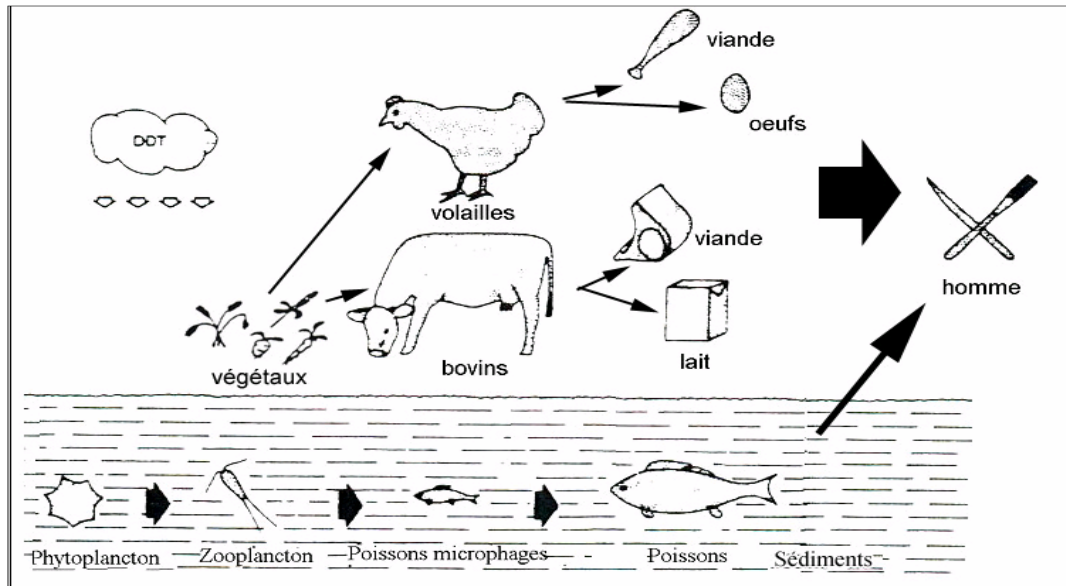


Figure 02 : Modèle de transfert des pesticides dans la chaîne alimentaire

(AIT MOHAMMED *et al.*, 2017).

II.4.1. Toxicité aiguë et DL50 :

Elle se manifeste rapidement, voire immédiatement, après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament.

Le terme toxicité orale aiguë est plus souvent utilisé en liaison avec les déterminations de la létalité et de la DL50. La DL50 est définie comme la dose déterminée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un test de toxicité aiguë, est susceptible de causer la mort de 50% des animaux traités sur une période donnée (OTMANI *et al.*, 2016).

La DL50 est définie comme étant la dose de produit administrée en une seule fois par ingestion, inhalation, ou voie cutanée, entraînant la mort de 50% de la population animal testée. Elle s'exprime en mg de matière active par kg d'animal, et en mg/L d'air pour la DL50. Ces

atteintes reproduisent les voies possibles d'intoxication pour les personnes manipulant ces produits (**BATSCH, 2011**).

II.4.2. Toxicité chronique et dose sans effet :

Une intoxication est dite chronique lorsque ses manifestations apparaissent après une exposition à l'agent responsable, soutenue ou répétée dans le temps qui dure généralement plusieurs mois voire plusieurs années. Dans le contexte d'une exposition environnementale ou en milieu de travail à un agent chimique, le profil de dose, variera d'une journée à l'autre et même au cours d'une même journée. Par ailleurs, l'intoxication chronique peut découler de l'accumulation progressive du contaminant dans l'organisme jusqu'à ce que sa concentration atteigne une valeur seuil critique au niveau de l'organe cible. Il est aussi possible que les manifestations de l'intoxication chronique découlent de l'accumulation de microlésions jusqu'au point où elles aboutissent à des manifestations observables chez les individus. Le toxique lui-même ne s'accumule pas nécessairement dans l'organisme (**CARRIER et al., 2007**).

On discordance de la toxicité aigüe, la toxicité chronique ne se propose pas de déterminer un seuil de mortalité mais plutôt la dose quotidienne administrée en dessous de laquelle n'apparaissent pas d'effets sur la santé, c'est-à-dire la dose sans effet (DES). Elle est évaluée de façon normalisée par expérimentation sur des animaux de laboratoire. Ces expérimentations permettent d'étudier le potentiel cancérigène et la reprotoxicité (trouble de la fertilité, et effets tératogènes) d'une substance.

II.4.2.a. Dose journalière admissible :

Cette (DSE) permet de déterminer la dose journalière admissible (DJA) en termes de résidus de produit phytopharmaceutique : il s'agit de la quantité de résidus pouvant être ingéré quotidiennement, sans risque pour la santé. Elle est exprimée en mg de substance par Kg de poids corporel.

« Tout peut être poison, c'est la dose qui fait la différence entre un poison et un remède ». Toute substance absorbée en trop grande quantité peut être nocive pour l'organisme : c'est le concept de dose effet. La notion de DJA a été définie par le toxicologue René Truhaut, à la base

pour qualifier les additifs alimentaires, dont la présence dans les produits alimentaires nécessitait un encadrement par la législation, tout comme pour les Pesticides (BATSCH, 2011).

II.4.2.b. Limite maximale de résidus :

Une dernière notion reste à définir, il s'agit de la limite maximale de résidus (LMR) trouvés sur ou dans un produit alimentaire, suite à l'application de produit phytopharmaceutique. En raison de leur toxicité, certains résidus font l'objet de seuils réglementaires, les LMR, et au-delà de ce seuil, la commercialisation de ce produit n'est plus autorisée. Elles sont fixées par la commission Européenne, pour les limites imposées dans l'union européenne. Elles s'expriment généralement en mg de matière active/ kg de masse corporelle (SAADANE, 2018).

II.5. Les pathologies liées à l'exposition aux pesticides :

II.5.1. Le stress oxydatif et l'effet des pesticides sur la mitochondrie :

L'exposition aux pesticides peut entraîner la production nette d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les tissus lorsque les mécanismes de défense antioxydants sont submergés. Les pesticides peuvent augmenter les niveaux de ROS, tels que le superoxyde, Cependant, quel que soit le mécanisme par lequel les ROS sont produites, une conséquence de leur surproduction est qu'ils peuvent causer de nombreux dégâts d'ADN et de protéines dans les cellules (DEBBACHE et al., 2017).

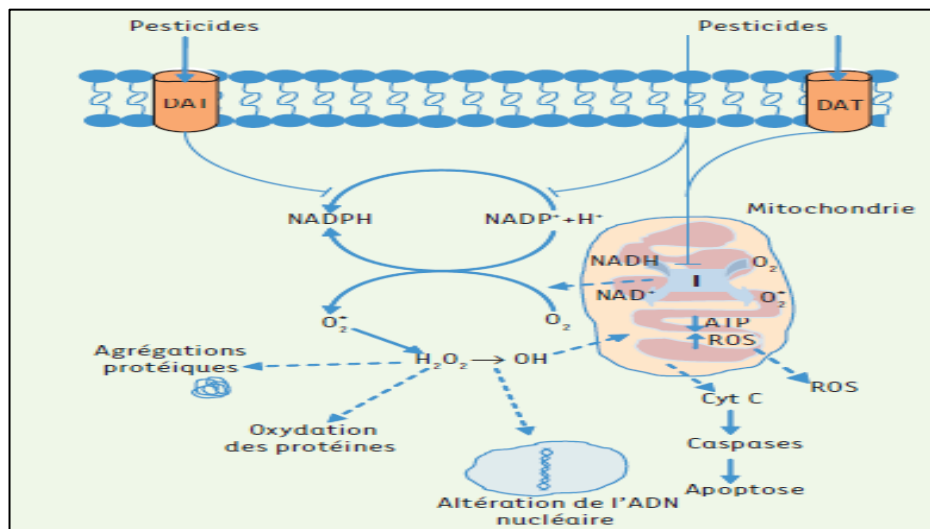


Figure 03: Effets des pesticides sur la mitochondrie et conséquences au niveau cellulaire (LENAERS et al., 2013).

II.5.2. Les maladies neurologiques :

L'expertise INSERM « Pesticides et santé » rendue publique en 2013 a démontré l'existence d'un lien entre exposition professionnelle et non professionnelle aux pesticides et certaines pathologies neurologiques. Les pathologies concernées sont :

- La maladie de Parkinson pour laquelle la présomption d'association est forte.
- La maladie d'Alzheimer pour laquelle la présomption d'association est possible, avec des études castémoin peu robustes mais des cohortes aux résultats convergents.
- La sclérose latérale amyotrophique pour laquelle la présomption d'association est possible avec deux méta-analyses récentes montrant des risques significatifs mais un nombre d'études qui demeure insuffisant.
- Les troubles cognitifs (mémoire, concentration,...) et anxio-dépressifs (souffrance, suicide) **(COUMOUL et al., 2019)**.

II.5.3. Les perturbations endocriniennes (PE) :

L'exposition aux perturbateurs endocriniens peut survenir sous la forme de pesticides, d'algicides et d'autres produits chimiques fabriqués pour tuer les organismes indésirables. La pulvérisation dans les maisons, sur les cultures agricoles et les étangs émet des substances chimiques qui, via le transport dans l'air ou la sédimentation dans le sol, seront inhalées ou déposées sur la peau et résorbées ou encore ingérées lors de la consommation d'aliments contaminés. Il n'est pas surprenant que certaines de ces substances chimiques soient des perturbateurs endocriniens. Bon nombre d'entre elles, en particulier celles utilisées pour la lutte contre les parasites (par exemple pour l'extermination des insectes ou des rongeurs), sont fabriquées spécifiquement pour leurs effets toxiques sur le système nerveux ou la reproduction. La grande sensibilité des systèmes reproducteur et nerveux aux hormones naturelles et la similitude des processus physiologiques **(GORE et al., 2014)**.

L'action des pesticides PE est soupçonnée pour un grand nombre d'effets nocifs comme la baisse de la qualité et de la quantité du sperme humain, l'incidence des cancers des testicules et de la prostate (ou le DDT, comme anti-estrogène), l'augmentation des cancers du sein (vraisemblablement due à des organochlorés, à divers pesticides) et à la l'hypothyroïdie **(SAADANE, 2018)**.

Les pesticides PE sont susceptibles d'affecter le développement sexuel avec une sensibilité particulière chez le fœtus et l'enfant. Généralement, les dommages se produisent au cours de la gamétogénèse et au stade initial du développement fœtal mais les effets n'apparaissent qu'à l'âge adulte (DEBBACHE. FOUGHALI.I. MERGHID, 2017).

Mode d'action :

Les perturbateurs endocriniens agissent sur le système hormonal :

- Soit directement : en interagissant avec les récepteurs cellulaires et en imitant l'action d'hormones naturelles ou encore en bloquant les récepteurs cellulaires, empêchant ainsi l'action des hormones (**DESBIOLLES et al., 2019**). Il s'agit d'une réponse antagoniste (**BROSSELIN, 2006**).
- Soit indirectement : en modifiant la production, le stockage, le transport, la diffusion et l'élimination des hormones naturelles (**DESBIOLLES et al., 2019**).

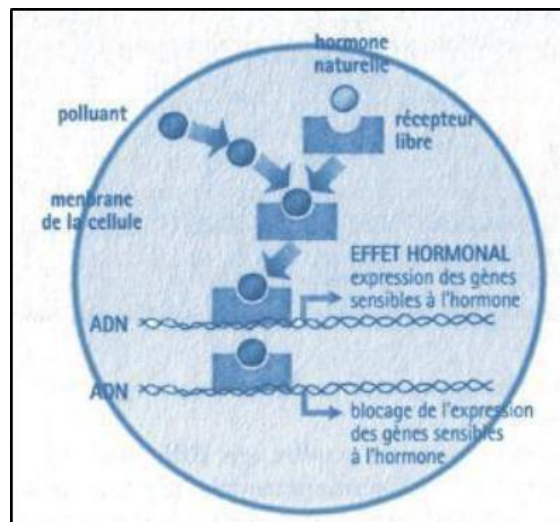


Figure 04 : Effets des pesticides sur le système endocrinien (**SAADANE, 2018**).

II.6. Analyse des risques des pesticides pour l'homme :

Les pesticides, qu'ils soient de fabrication récente ou ancienne présenteront des risques très différents, surtout à cause de l'état de leur emballage et de leur mode de stockage, alors qu'ils présentent en fait les mêmes dangers s'ils contiennent les mêmes matières actives. Le risque est lié à l'exposition potentielle au danger d'un pesticide (ex : la fuite d'un fût) ou à la probabilité

qu'un danger se produise et à l'exposition qui en résulterait (ex : mauvaise manipulation/stockage des pesticides) (AMARI *et al.*, 2014).

Une analyse du risque est fournie par l'AFSSET (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail). Elle permet de mieux comprendre les difficultés de dialogue entre partisans de preuves scientifiquement établies, et suspicion du grand public. Le risque est défini de façon scientifique et rationnelle comme le produit d'un dommage et d'une probabilité d'occurrence. Cette définition est souvent mise en opposition à la perception subjective, jugée irrationnelle, qu'en a le public. Aujourd'hui, on parle de l'acceptabilité des risques. Le schéma québécois de gestion des risques pour la santé illustre comment on caractérise actuellement le risque, y compris en France : en réalisant une estimation (une quantification à caractère scientifique) et une évaluation de la perception (une qualification d'ordre sociologique) (ALTERRE, 2009).

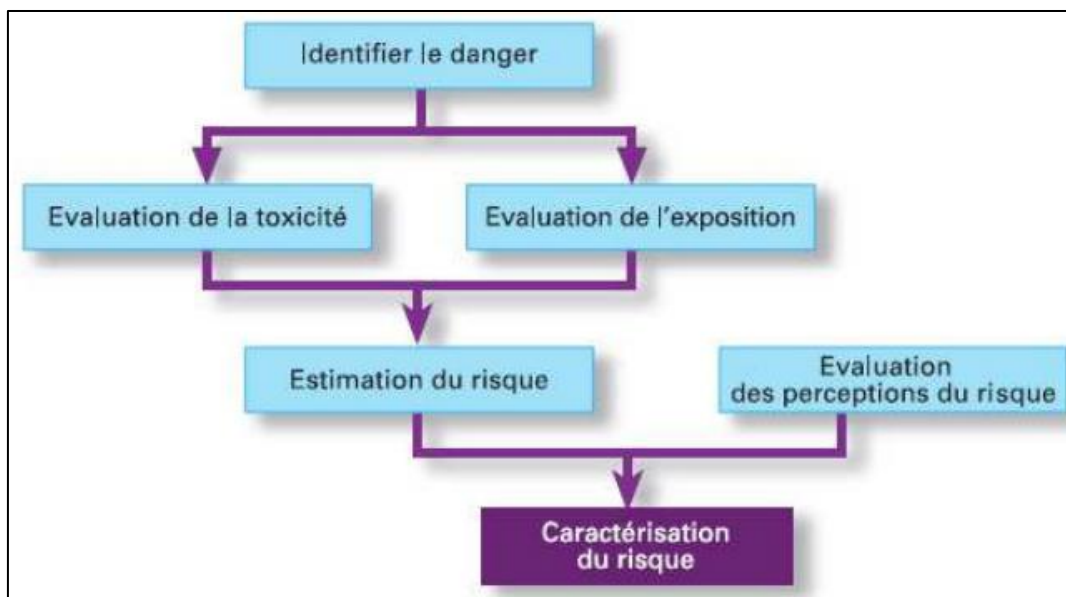


Figure 05: La gestion du risque au Québec (2003) (ALTERRE, 2009).

II.7. Pesticides et cancers :

Des études épidémiologiques ont montré que les agriculteurs exposés aux pesticides présentent un risque deux à trois fois plus élevée de développer des cancers et autres affections du système lymphohématopoétique (YAHIA, 2016).

La première indication d'une association de certains cancers à l'exposition à des produits chimiques fut mise en évidence à partir d'observations faites par des cliniciens au XVIIIème et au XIXème siècles. La plupart des cancérogènes sont soumis au métabolisme qui aboutit à leur élimination, mais au cours duquel des intermédiaires réactifs sont générés. Cette activation métabolique a pour résultat la modification des macromolécules cellulaires (acides nucléiques et protéines) . Par conséquent, des tests de mutagénicité utilisant des bactéries et des cellules mammaliennes en culture ont été mis au point et sont largement utilisés pour identifier des cancérogènes potentiels. Il n'est toutefois pas possible de démontrer que tous les produits chimiques connus pour provoquer le cancer se lient à l'ADN et dès lors de les classer comme 'génétoxiques'. L'activation de cancérogènes chimiques dans le tissu mammalien est principalement le résultat de l'oxydation par les mono-oxygénases microsomales (cytochromes P450, enzymes de phase I). Les cytochromes P450 sont situés dans le réticulum endoplasmique (membranes internes de la cellule) et constituent une superfamille protéique ; on en connaît actuellement environ 50 chez l'homme.

Les produits d'oxydation sont des substrats pour d'autres familles d'enzymes (transférases, enzymes de phase II) qui lient les résidus cancérogènes à un groupement glutathionne, acétyle, glucuronide ou sulfate. Les conjugués résultants sont hydrophiles et peuvent ainsi être facilement excrétés. Les métabolites électrophiles cancérogènes se présentent comme des produits intermédiaires de ces réactions métaboliques. Les voies métaboliques sont bien caractérisées pour les principales classes de cancérogènes chimiques, englobant les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les amines aromatiques, les N-nitrosamines, les aflatoxines. D'autres voies métaboliques sont connues (Invasion et métastase).

L'association entre pesticides et risque de cancer est une question difficile à documenter compte tenu des nombreux produits utilisés et de leur évolution en fonction de la période d'utilisation et des types de cultures. Néanmoins, les expositions aux pesticides ont été plus particulièrement mises en cause dans certains types de cancers. La plupart des études souffrent

cependant d'une forte imprécision (difficultés liées à l'évaluation rétrospective des expositions, manque de données prospectives) et empêchent encore de porter des conclusions précises quant à l'élévation de risque due à une exposition aux pesticides. De fortes suspicions subsistent sur le rôle des pesticides dans le développement de pathologies chroniques (cancers, troubles neurologiques, troubles de la reproduction), comme le suggère le tableau (tab.4) ci-dessous (**MORIZET, 2009**).

Tableau 04 : Classement des pesticides selon CIRC

Pesticides	Classement par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC)
Application professionnelle d'insecticides non arsenicaux	groupe cancérogène probable (groupe 2A)
Arsenic	cancérogène certain (groupe 1)
Captafol et dibromure d'éthylène	cancérogènes probables (groupe 2A)
Dix-huit molécules, dont le DDT	cancérogènes possibles (groupe 2B)

La classification des produits chimiques, dont les pesticides, mise en place par l'OMS est présentée ci-dessous (tab.5) (**GHENABZIA, 2017**).

Tableau 05 : Les 05 niveaux de dangerosité des produits chimiques selon l'OMS (HAZARD, 2009).

Classement de WHO		DL ₅₀ pour les rats (mg/kg de poids corporel)	
		Orale	Cutanée
Ia	Extrêmement Dangereux (ED)	<5	<50
Ib	Fortement dangereux (FD)	5-50	50-200
II	Modérément Dangereux (MD)	50-2000	200-2000
III	Légèrement Dangereux (LD)	>2000	
U	Non connu comme présentant un danger aigu (ND)	5000 ou plus	

II.7.1. Processus de cancérogenèse :

De nos jours, la cancérogenèse apparaît comme un processus beaucoup plus complexe que ce que l'on croyait voici une décennie. L'étude du génome des cellules tumorales humaines a révélé un nombre de modifications génétiques et épigénétiques beaucoup plus grand que celui auquel on s'attendait. De plus, le délai qui s'écoule entre le premier événement initiateur (quand sa survenue est connue avec précision) et l'émergence clinique d'un cancer peut être très long, jusqu'à 60 ans (TUBIANA, 2008).

La cancérogenèse (ou carcinogenèse, ou oncogenèse) constitue un processus multifactoriel au cours duquel des modifications génotypiques et phénotypiques concourent à l'apparition d'un clone de cellules transformées à avantage sélectif de croissance. Les xénobiotiques pro-carcinogènes et/ou leurs métabolites actifs affectent l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN ou de l'apoptose. Qu'elles soient génotoxiques ou non, ces molécules peuvent interférer avec la transduction des

signaux et aboutir *in fine* à une hypermutabilité, une instabilité génomique, une perte du contrôle de la prolifération cellulaire et une résistance à l'apoptose (**Anonima**).

II.7.1.a. L'initiation :

Elle est due à l'altération du génome rendant les cellules capables de se diviser en l'absence d'une stimulation venue du tissu. Ces altérations de l'ADN peuvent être causées par un génotoxique d'origine endogène ou encore exogène.

L'initiation est un événement relativement fréquent contre lequel existent des protections cellulaires multiples et puissantes. L'efficacité de ces défenses est un facteur essentiel. Quand le nombre de lésions est faible, des mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place. Des exonucléases et endonucléase vont couper l'ADN muté, ensuite l'ADN polymérase et l'ADN ligase vont se charger de resynthétiser la zone éliminée. Quand le nombre de lésions est trop important, ces systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN ne peuvent pas fonctionner correctement. Ceci se produit lorsque le génotoxique est présent de manière répétée et à forte concentration. Tant que fonctionnent les mécanismes de régulation de l'homéostasie cellulaire, ces cellules initiées (possédant de l'ADN muté) peuvent encore rester sous contrôle. En effet cet équilibre cellulaire dynamique assure l'intégrité de la cellule en compensant les dysfonctionnements liés aux mutations. Lorsque cet équilibre est rompu, la cellule peut rentrer dans une phase de mort cellulaire programmée (apoptose) ou bien poursuivre son évolution (**MOUSTOIFA, 2010**).

II.7.1.b. La promotion :

La promotion est la prolifération clonale des cellules initiées. Dans des conditions expérimentales, on définit leur pouvoir promoteur par la réduction du temps écoulé entre l'initiation et l'apparition des tumeurs.

Les promoteurs tumoraux ne sont pas, en général, des agents mutagènes ou carcinogènes par eux-mêmes. Le plus souvent, ils exercent leur pouvoir promoteur sans métabolisation.

Les promoteurs tumoraux ne sont pas, en général, des agents mutagènes ou carcinogènes par eux-mêmes. Le plus souvent, ils exercent leur pouvoir promoteur sans métabolisation. Parmi les agents promoteurs, on peut citer les hormones, l'inflammation chronique, mais aussi les facteurs de croissance. Si une mutation s'est produite au niveau d'un gène régulant la mitose

(oncogène ou gène suppresseur), il se produit un dérèglement du contrôle de la synthèse d'ADN et une promotion de cellules initiées.

Histologiquement, on observera souvent proche de ce stade la transformation du phénotype normal en un phénotype malin, sous l'effet des promoteurs : ce qu'on appelle parfois la conversion.

Ce stade permet de définir les états dits 'préneoplasiques' ou les 'formes frontières' ou les 'formes *in situ*' (BENATTIA *et al.*, 2017).

II.7.1.c. La progression :

Cette étape est caractérisée par l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, de perte de différenciation, de l'invasion locale et métastatique. La transformation des cellules en cellules malignes constitue la dernière étape de la cancérogenèse. Au cours de cette étape, la prolifération cellulaire est indépendante de la présence de stimuli. La progression est également une étape irréversible et elle est caractérisée par (1) une instabilité génétique résultant des mutations et de la prolifération cellulaire, (2) une croissance rapide, (3) un phénomène d'invasion. Les cellules échappent aux différents processus de contrôle cellulaire, tendent à s'infiltrer dans les tissus voisins et peuvent également migrer via la voie sanguine ou lymphatique vers d'autres tissus de l'organisme, où elles se fixent et développent des métastases (BOHAIN, 2017).

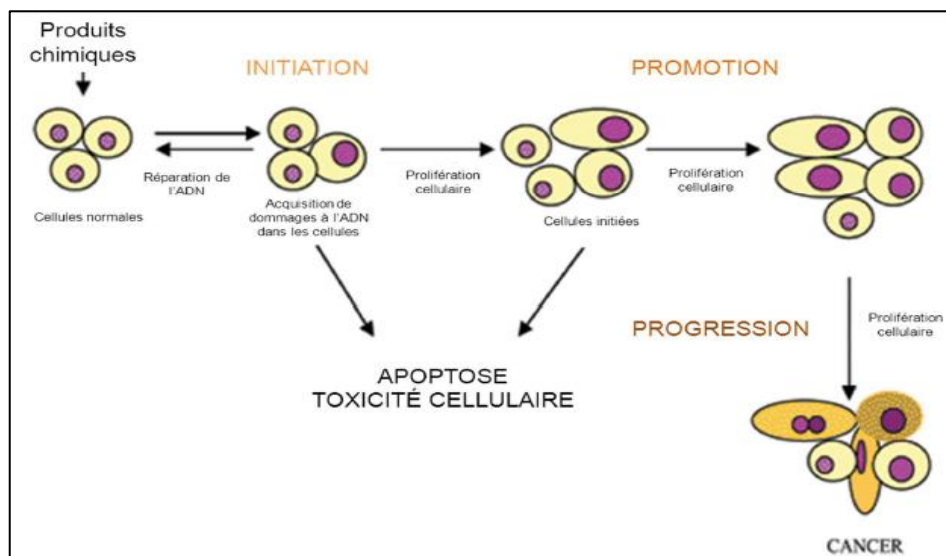


Figure 06: les différentes phases de la cancérogenèse induite par un xénobiotique

(SAVARY, 2014).

II.7.2. Classement des substances par mode d'action principal :**II.7.2.a. Substances cancérogènes génotoxiques :**

Une substance cancérogène génotoxique est une substance capable de provoquer l'apparition de tumeurs (bénignes/malignes) en altérant la transmission fidèle du génome d'une génération de cellules à l'autre (altération du matériel génétique). Elle peut être mutagène, clastogène et/ou aneugène.

Une substance mutagène provoque des mutations au niveau du matériel génétique (ADN). Elle est capable, par elle-même ou par ses métabolites, de provoquer une tumeur en induisant et en augmentant la fréquence des mutations. Elle peut induire des mutations sur des portions de gènes spécifiques critiques, le plus souvent des proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeur et/ou des gènes de réparation de l'ADN. Elle ne peut être mutagène qu'à condition d'altérer la structure du gène de façon permanente et transmissible aux cellules filles par mitoses successives. Les systèmes de défense permettant à la cellule de se protéger de l'induction des mutations permanentes ou de les réparer sont débordés et ne peuvent plus restaurer l'intégrité du matériel génétique ou empêcher la transmission de mutations. Les mutations peuvent impliquer un gène unique (mutation ponctuelle), un ensemble de gènes (mutation chromosomique), un ou plusieurs chromosomes entiers (mutation génomique) (Anonima).

Une substance cancérogène clastogène est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer par des modifications structurales des chromosomes (cassure du matériel génétique). Une substance cancérogène aneugène est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer en modifiant le nombre des chromosomes (aneuploïdie).

II.7.2.b. Substances cancérogènes non- génotoxiques :

Une substance cancérogène non génotoxique est une substance capable de provoquer l'apparition d'un cancer sans action directe sur le matériel génétique. Le mode d'action non génotoxique inclut des effets qui n'impliquent pas des altérations de l'ADN, mais qui influencent l'expression génique, la communication entre cellules ou d'autres facteurs du processus cancérogène (ALFORT, 2010).

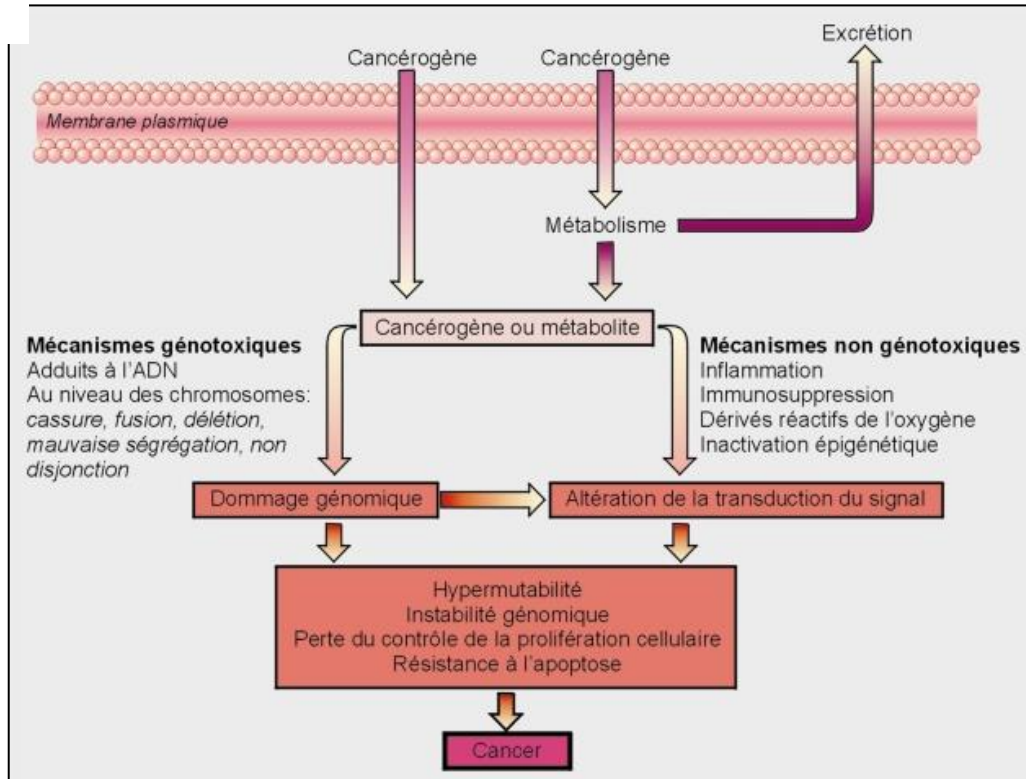


Figure 07 : Mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de cancérogenèse (**Anonima**).

CHAPITRE 02

L'ADN : (Acide Désoxyribo-Nucléique)

Chapitre 02 : L'ADN : (Acide Désoxyribonucléique)**I.1. Histoire de l'ADN :**

Bien que la molécule d'ADN ait été isolée pour la première fois en 1869 par le médecin suisse Frédéric Miescher, il faudra attendre 1944 avant qu'elle soit associée à l'information héréditaire grâce aux travaux d'Avery, McLeod et McCarthy. Quelques années plus tard, s'inspirant des travaux de Rosalind Franklin, James Watson et Francis Crick découvrent la structure en double hélice de l'ADN. Cette découverte révolutionne l'étude du vivant : l'ADN est porteuse d'une succession de 4 bases azotées qui forme l'information génétique. Cette découverte leur vaudra le prix Nobel de médecine en 1962 (**Dossier découverte, 2015**).

I.2. Définition :

Acide Désoxyribonucléique (ADN), c'est le nom d'un ingrédient clé de la vie sur Terre. En effet, la molécule d'ADN porte l'information génétique autrement dit le génome . Cette macromolécule est l'élément central et fondamental autour duquel s'articulent tous les processus liés à l'activité cellulaire. Elle est contenue dans les chromosomes situés dans le noyau des cellules. Elle est formée de deux brins complémentaires enroulés en double hélice. Ces brins sont constitués d'une série de briques élémentaires : les nucléotides, dont l'ordre d'enchaînement est très précis; et qui regroupés, forment les gènes.

Des instructions sont inscrites et codées sur la molécule d'ADN, ces dernières organisent précisément les structures et les processus mis en jeu dans la matière biologique. Cela comprend l'expression et la régulation des gènes. Cette molécule d'ADN contient les gènes, qui possèdent chacun une séquence, une position nommée *locus* le long de la molécule, et codent une fonctionnalité bien spécifique. Par sa capacité de se répliquer, l'ADN permet la transmission de ces informations qui constituent le matériel héréditaire (**BRUNET, 2015**).

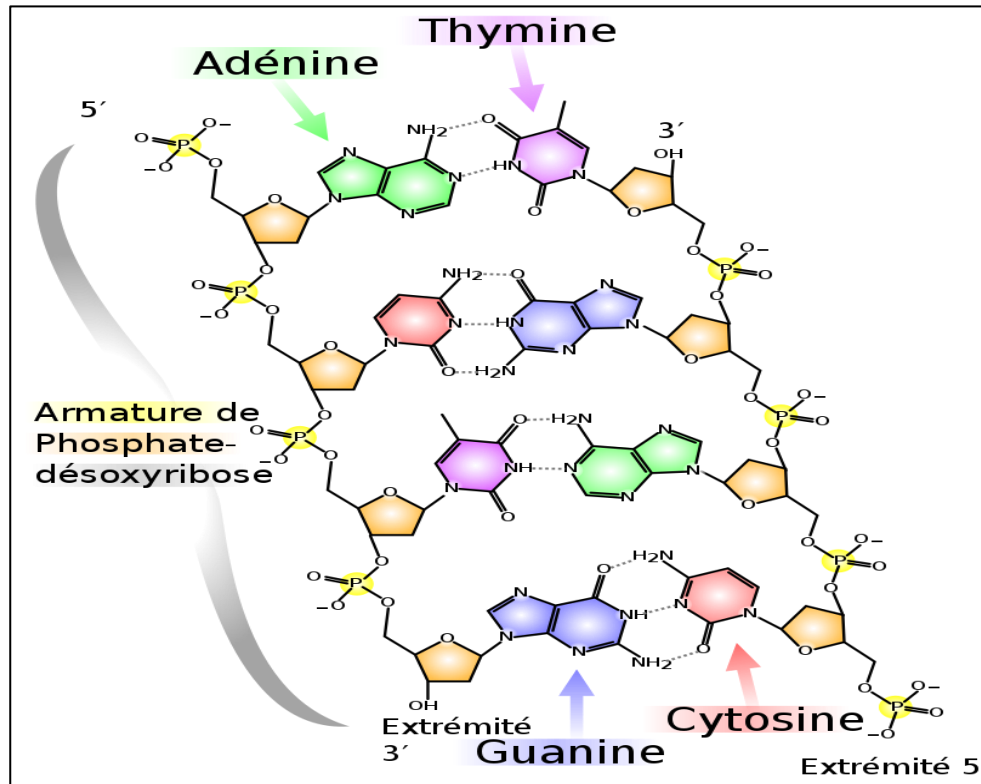


Figure 08 : Structure de la molécule d'ADN (Anonima).

I.3. Composition et structure d'ADN :

Les molécules d'ADN sont très grandes et généralement composées de deux chaînes polynucléotidiques, enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice d'un diamètre de 2,0 nm. Chaque chaîne est constituée de désoxyribonucléosides puriques et pyrimidiques reliés par des liaisons phosphodiester. C'est-à-dire qu'une molécule d'acide phosphorique forme un pont entre le groupe 3'-hydroxyle d'un sucre et le groupe 5'-hydroxyle d'un sucre adjacent. Les bases puriques et pyrimidiques sont attachées au carbone 1' des désoxyriboses et s'étendent vers l'intérieur du cylindre formé par les deux chaînes. Elles sont empilées les unes sur les autres, au centre, une paire de bases tous les 0,34 nm (**HAMLAOUI et al., 2013**).

La molécule d'ADN est la plus grosse molécule de l'organisme. C'est une double hélice faite de deux monomères enroulés les uns sur les autres. Cette molécule est composée d'une succession répétitive de nucléotides composés eux-mêmes, dans l'ordre, d'une base purique ou pyrimidique, d'un sucre, le Désoxyribose, et d'un acide phosphorique. La séquence sucre-acide phosphorique est la séquence invariable de l'ADN. Les nucléotides ne se distinguent les uns des

autres que par leur base. Il y en a, dans l'ADN, quatre types : l'Adénine, A, et la Guanine, G, qui sont des purines, la Cytosine, C, et la Thymine, T, qui sont des pyrimidines. La Thymine est la seule base spécifique de l'ADN, elle ne se retrouve pas dans l'Acide ribonucléique, ARN, où elle est remplacée par l'Uridine, U (AOUF, 2016).

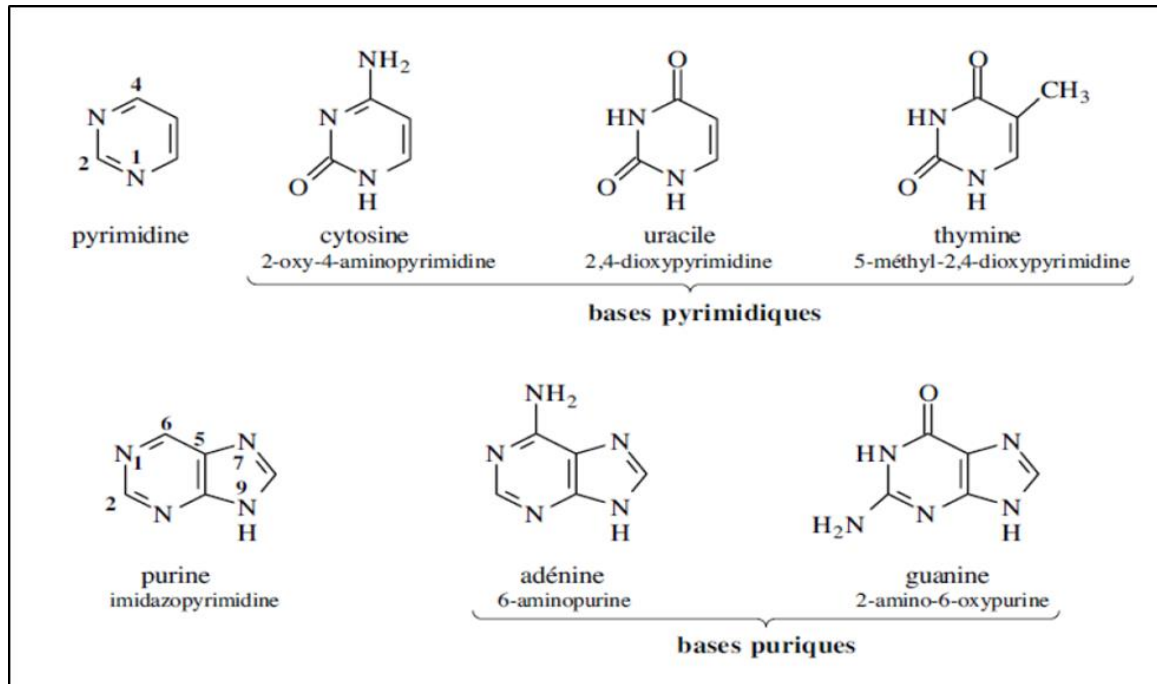


Figure 09 : Les différentes bases azotées d'ADN (AHAKOUD, 2015).

La double hélice est une molécule très rigide et visqueuse d' une longueur immense et d' un diamètre très petit. Elle présente un grand sillon (profond et large) et un petit sillon (étroit et peu profond).

Les interactions ADN-protéine sont des processus essentiels de la vie cellulaire (activation ou répression de la transcription, réplication, réparation de l'ADN).

Les protéines forment des liaisons avec l'ADN au fond des sillons, ces liaisons sont spécifique : liaisons hydrogène, et non spécifiques: interactions de van der Waals, interactions électrostatiques générales.

Les protéines reconnaissent les donneurs de liaison H, les accepteurs de liaison H, les groupes méthyl (hydrophobes), ces derniers étant uniquement dans le grand sillon.

Il y a donc 4 motifs différents possibles pour la reconnaissance et l'accrochage dans le grand sillon, et seulement 2 dans le petit sillon.

Certaines protéines se lient à l'ADN dans son grand sillon, d'autres dans le petit sillon,

d' autres enfin à la fois dans grand et petit sillon (**Jean-Loup, 2006**).

I.4. Nature et origine des lésions d'ADN :

Chaque jour l'ADN d'une cellule subit en moyenne 40 000 dommages sur ses bases, qui heureusement vont être correctement réparés.

L'ADN cellulaire souffre de l'attaque d'agents exogènes et endogènes, générant une large variété de modifications impliquées dans la mutagenèse et la carcinogénèse. Notre ADN est en effet sous l'agression constante de la lumière solaire, de l'oxygène, d'agents chimiques et même de nos propres processus cellulaires (**CORNE, 2010**).

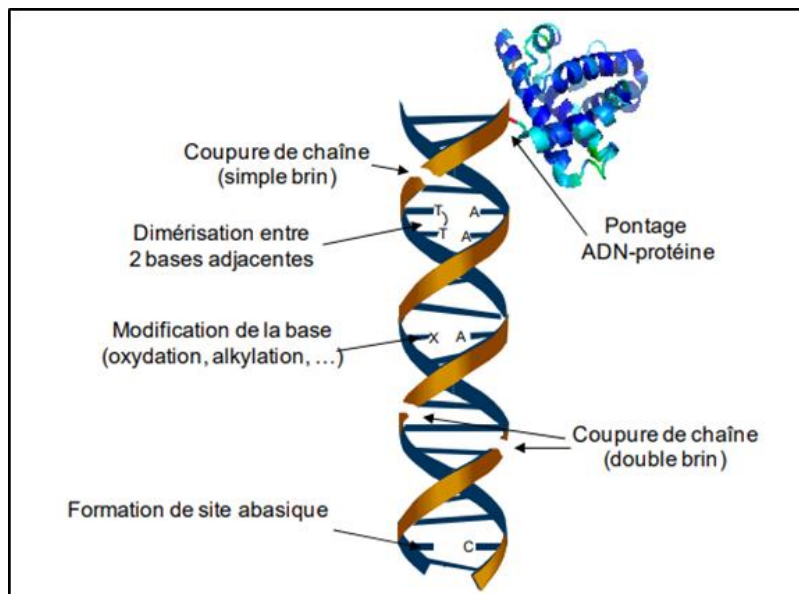


Figure 10: Représentation schématique des différentes lésions de l'ADN (**CORNE, 2010**).

Les agents mutagéniques, carcinogéniques ; antitumoraux ; ou certains antibiotiques interagissent fortement avec la double hélice d'ADN inhibant ainsi sa synthèse ; sa réplication ou sa transcription.

Ces molécules sont généralement chargées positivement et contiennent très fréquemment un noyau aromatique plan. Elles perturbent la double hélice par formation ou non des liaisons covalentes (Gilbert *et al.*, 2008).

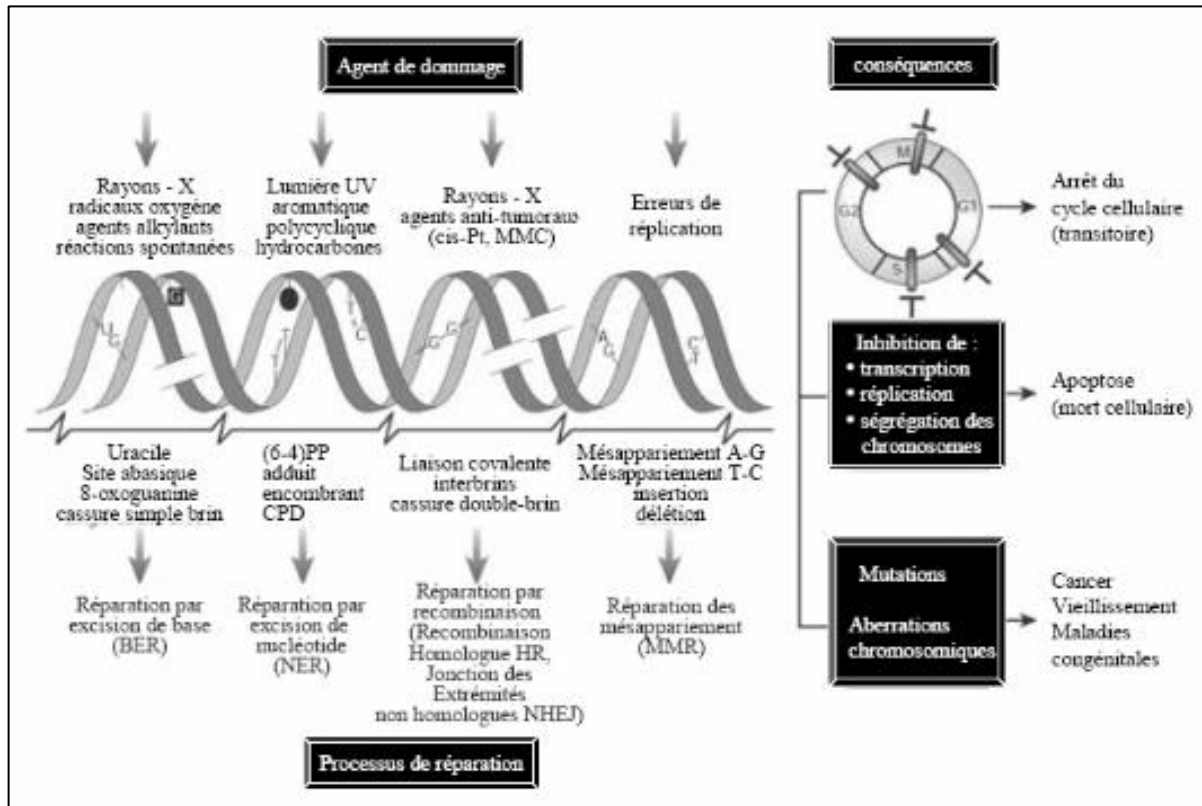


Figure 11 : Schéma synthétisant les différents types de lésions primaires à l'ADN et les mécanismes de réparation associés (BOHAIN, 2017).

II.4.1. La génotoxicité :

Ce corps professionnel est exposé à des risques d'autant plus élevés que certains des pesticides sont aussi des produits génotoxiques c'est-à-dire qu'ils peuvent altérer l'ADN, ce qui peut entraîner des cancers. Plusieurs études montrent une corrélation entre l'exposition à des pesticides et l'incidence de cancers (Ex. leucémie, lymphome non-Hodgkinien...) chez les agriculteurs. Pour mieux appréhender les effets génotoxiques liés à de telles substances, il serait utile de disposer d'un biomarqueur, c'est-à-dire d'une molécule dont la présence signale des dommages à l'ADN.

Les principaux tests de génotoxicité chez l'homme concernent l'étude de l'altération et/ou du changement du nombre de chromosomes (Ex. test d'aberration chromosomique, test du

micronoyau...) et l'altération primaire de l'ADN (Ex. test des comètes). Mais, ces tests présentent des limites. Ils sont notamment d'interprétation délicate, ce qui se traduit par exemple par des résultats qui peuvent varier d'un laboratoire à l'autre. Ils ne sont pas facilement adaptables à de grandes séries d'échantillons.

Il existe de nombreux types de dommages à l'ADN. L'ADN est une double hélice dont l'un des brins peut se briser. On parle alors de cassure simple brin (CSB). C'est un phénomène courant (cela peut arriver de l'ordre de dix mille fois par cellule et par jour). Il existe d'autres types de dommages, induits par une large gamme de mécanismes (**AUDEBERT, 2013**).

On considère deux classes d'agents génotoxiques, les génotoxiques directs qui sont capables de modifier directement la structure de l'ADN, et ceux que l'on appelle des progénotoxiques qui nécessitent une activation métabolique préalable avant de pouvoir exercer leurs effets génotoxiques. On parle dans ce cas de processus de bioactivation (**CACHOT et al., 2009**).

II.4.2. Notion d'adduit :

Lorsqu'un xénobiotique pénètre dans l'organisme, il est soit éliminé sous forme inchangée, soit métabolisé (ou biotransformé) par des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse suivies de réactions de conjugaisons. Dans la majorité des cas, les composés obtenus sont moins réactifs, moins toxiques et plus hydrosolubles, donc plus facilement éliminables. Néanmoins, l'oxydation de certaines substances donne des composés fortement électrophiles, capables de réagir avec les groupements nucléophiles des macromolécules biologiques que ce soit les protéines, les lipides ou les acides nucléiques. Au niveau de l'acide désoxyribonucléique (ADN), le site d'attaque préférentiel des cancérogènes est la guanine. Les autres bases de l'ADN peuvent être également modifiées, notamment l'azote en 1 et en 3 de l'adénine et l'oxygène en 4 de la thymine. Un nucléotide ayant fixé de manière covalente un xénobiotique (ou une partie de celui-ci) constitue ce qu'on appelle un adduit (**HAGUENOR et al., 1995**).

Certains agents mutagènes tels que les HAP et les amines aromatiques sont capables de réaliser ce type de liaison entraînant la formation d'un complexe appelé adduit (pour produit d'addition). Cette lésion entraîne une modification de la structure spatiale de l'ADN au voisinage de l'adduit qui va perturber sa reconnaissance par l'ADN polymérase au cours du processus de

réplication. La formation et la persistance de telles lésions de l'ADN sont des étapes clé vers la mutagenèse et le développement tumoral (**ATSAMENIA, 2019**).

CHAPITRE 03

Le contexte théorique des techniques expérimentales utilisées

Chapitre 03 : Le contexte théorique

I. Les pesticides utilisés pour cette étude :

I.1. PREVICUR ENERGY :

PREVICUR® ENERGY est une combinaison habile des propriétés fongicides de deux substances actives systémiques, à modes d'action différents et complémentaires, très efficace contre un large spectre de maladies (**Bayer, 2020**), tel que phytohtora, Bremia, Pseudoperonospora et Pythium (**Fiche technique de Previcur**).



Photo 01: PREVICUR® ENERGY

I.1.1. Mode d'action :

PREVICUR ENERGY contient du Propamocarbe-Fosétylate, une combinaison particulière des matières actives systémiques Propamocarbe et Fosétyle pour la protection de divers légumes contre le mildiou ainsi que pour le traitement des semis et jeunes plants contre le pied noir. Le Propamocarbe déploie une systémie acropétale et translaminaire avec un effet préventif, curatif et anti-sporulant. D'autre part, il a aussi un effet stimulant sur la croissance des végétaux. Le Fosétyle est entièrement systémique et il stimule principalement le système de défense des plantes envers divers champignons. En plus, son effet fongique inhibe la germination des spores et le développement du mycélium. Le mode d'action avec effet multi-site du Previcur Energy garantit une haute sécurité d'efficacité contre le mildiou. Previcur Energy est aussi bien

adapté pour le traitement des surfaces de multiplication afin de protéger les semis ou jeunes plants contre diverses pourritures des racines et de la tige (**Bayer, 2006**).

Tableau 06: Doses et usages homologués de Previcur Energy (**Fiche technique de Previcur**).

Cultures	Maladies	Doses	DAR
Pomme de terre	Milidiou	2 à 2.5 l/ha	21 jours
Cultures maraîchères	et Pythium	2 à 2.5 l/ha	14 jours

I.2. KARATEKA :

Insecticide polyvalent de la nouvelle génération appartenant à la famille des Pyrèthrinoïdes, à usage exclusivement agricole. Il agit par contact et par ingestion, au niveau du système nerveux des insectes. Il est efficace sur les adultes et sur les larves de nombreuses espèces d'insectes ennemis des cultures et autres insectes nuisibles. Son action est rapide.

Il est utilisé pour contrôler une large gamme de parasites dans une variété d'application. Les parasites contrôlés comprennent la mouche blanche, les pucerons, les mineurs, les vers, les acariens...etc. (**Anonima**)



Photo 02: Pesticide KARATEKA

II. Méthode électrochimique d'analyse :

L'électrochimie est la discipline qui a pour objet l'étude des interfaces entre des conducteurs électroniques (métaux, polymères conducteurs...) et des conducteurs ioniques (solutions électrolytiques, sels fondus, électrolytes solides...). Il est traditionnel de la présenter en deux parties. La première partie traite des mesures concernant l'interface à l'équilibre ou dans des situations dynamiques excluant tout transfert électronique. La seconde partie concerne la réalisation et l'étude du transfert électronique hétérogène à l'interface. Dans les deux cas l'interface porte le nom d'électrode.

Les connaissances des caractéristiques fondamentales d'une réaction électrochimique se font par la mesure des variations du courant en fonction du potentiel appliqué (voltampérométrie), ou par la variation du courant en fonction du temps (chronoampérométrie) au bornes d'une cellule d'électrolyse. Dans ce paragraphe, nous allons présenter le principe de fonctionnement de ces deux techniques.

II.1. La voltampérométrie cyclique :

La voltampérométrie cyclique est la technique la plus utilisée pour acquérir de l'information à propos des réactions électrochimiques. La puissance de cette technique provient du fait qu'elle permet, par exemple, d'obtenir rapidement des informations sur la thermodynamique des processus rédox et sur la cinétique des systèmes électrochimiques. Elle est basée sur un balayage linéaire aller-retour du potentiel, permettant ainsi le tracé des courbes $i = f(E)$ pour l'oxydation et la réduction d'un composé.

Après avoir balayé vers les potentiels anodique et réaliser une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel pour effectuer une exploitation vers les potentiels cathodiques. Si le balayage est suffisamment rapide le produit aussi formé à l'aller et encore présent au balayage retour et peut se réduire, on enregistre donc sur le voltamogramme les courbes de polarisations anodique et cathodique (dites Voltamogrammes cycliques) (KHELEF, 2014); leur allure générale dépend de beaucoup de paramètres tels que : la vitesse de la réaction, la solubilité ou l'insolubilité des espèces réagissantes, les réactions chimiques suivantes et antécédentes aux réactions électrochimiques et la nature du substrat (ATSAMENIA, 2019).

La rapidité de vitesse de balayage donne une bonne résolution et reproductibilité des résultats car l'aller et le retour nettoient la surface de l'électrode de travail (**KHELEF, 2014**).

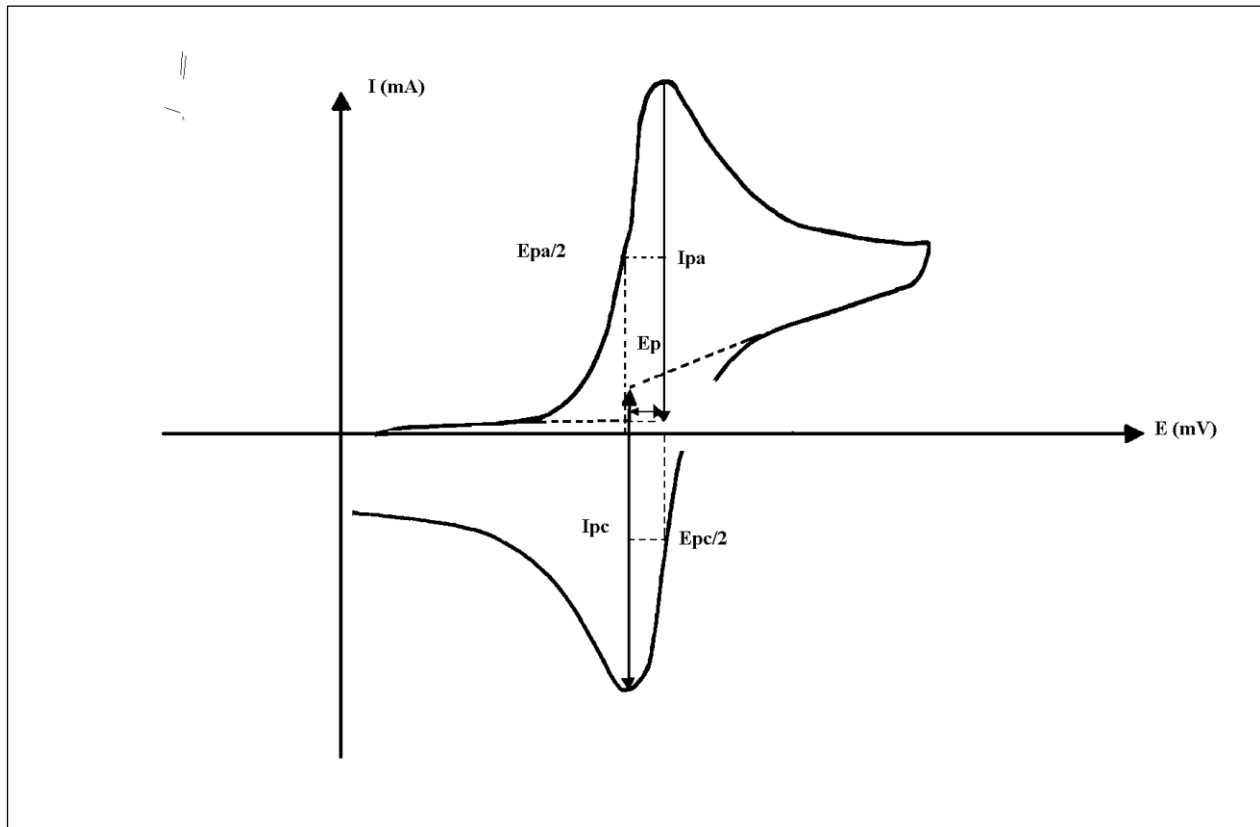


Figure 12: Allure générale de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs Caractéristiques.

Avec : I_{pa} , I_{pc} : Courants de pics anodique et cathodique

E_{pa} , E_{pc} : Potentiels de pics anodique et cathodique

$E_{pa/2}$, $E_{pc/2}$: Les potentiels à mi-hauteur des pics anodiques et cathodiques

ΔE_p : Différence de potentiel entre E_{pa} et E_{pc} (**BOUAOUD, 2014**).

II.2. Le montage électrochimique :

II.2.1. La cellule électrochimique :

La mesure voltampérométrique et d'impédances électrochimiques ont été effectuée dans une cellule électrochimique en verre. Le couvercle de la cellule comporte cinq orifices, trois d'entre eux permettent le passage des électrodes à savoir : l'électrode de travail, la contre électrode en platine (électrode auxiliaire) et l'électrode en platine et l'électrode de référence.

II.2.2. Les électrodes :

Il existe plusieurs types des électrodes, on a utilisé pour cette étude :

- Electrode de référence :

L'électrode de référence est une électrode au calomel, saturée en KCL à qui permet de mesurer le potentiel de l'électrode de travail. A titre indicatif, le potentiel standard de cette électrode, à 25°C.

- Electrode auxiliaire :

La contre électrode permet le passage du courant qui passe dans la cellule électrochimique. Elle est constituée d'une plaque de platine, disposée parallèlement à l'électrode de travail afin d'obtenir une homogénéité du champ électrique (**BENMEBROUK et al., 2014**).

- Electrode de travail :

Une électrode de travail sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer.

II.2.3. Potentiostat :

Un Potentiostat est un appareil dont le rôle est d'imposer une différence de potentiel constante entre l'électrode de travail (ET) et l'électrode de référence (ER) tout en fournissant la puissance nécessaire à la cellule. Il mesure le courant traversant l'électrode auxiliaire (EA) et l'électrode de travail.

II.2.4. Electrolyte :

En général, on utilise des solutions contenant outre les espèces électroactives, un sel d'électrolyte support totalement dissocié permettant de saturer la solution. Dans ces conditions le tracé d'un voltampérogramme est de quelques millisecondes à quelques minutes. Afin d'éliminer, quand il est nécessaire, l'oxygène dissous, le mode opératoire généralement utilisé est de faire barboter un gaz inerte pendant quelques minutes (de l'azote dans ce travail) (**GHENABZIA, 2017**).

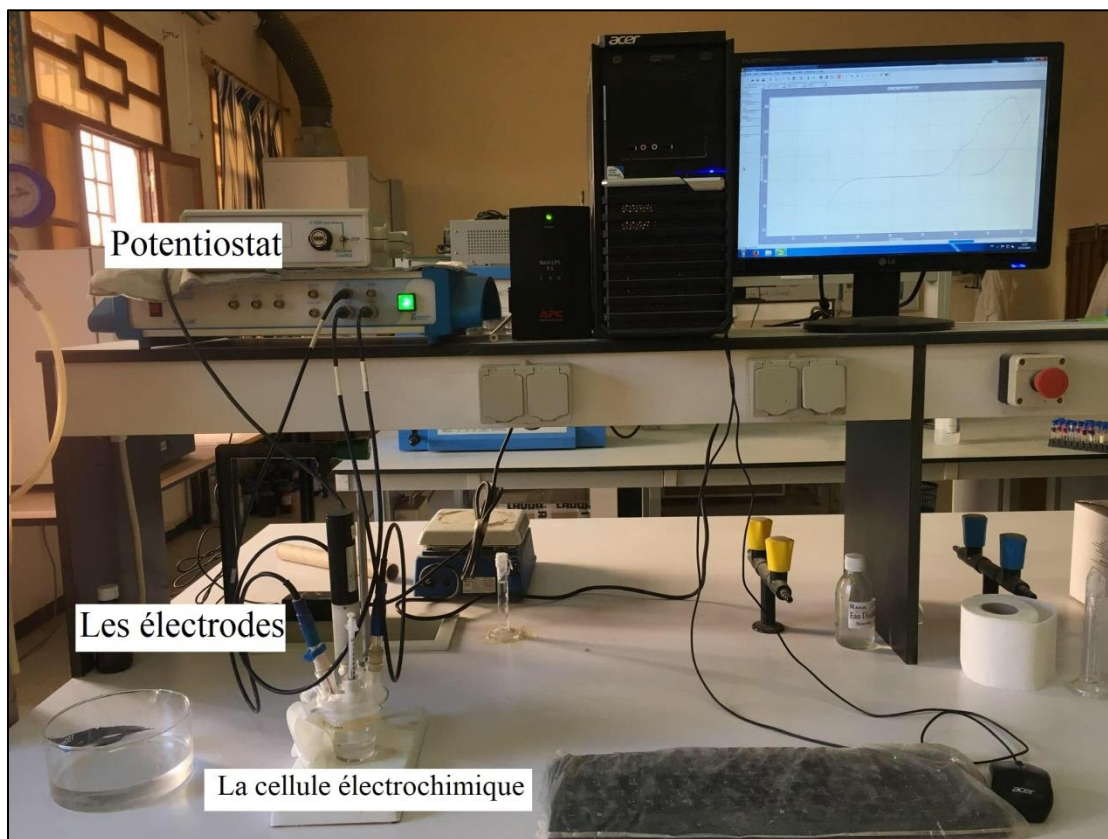


Photo 03 : Dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé voltampérogramme

III. La spectroscopie UV-Visible :

La spectroscopie d'absorption UV /Visible est l'une des méthodes d'analyse de la spectroscopie moléculaire les plus utilisées. Elle permet l'analyse structurale de certaines molécules et de nombreuses déterminations quantitatives. Elle est aussi une méthode très précieuse en chimie - physique pour l'étude des équilibres et des cinétiques en solution.

La spectrophotométrie est une méthode analytique qui repose sur l'absorption de la lumière par les substances à analyser.

En effet, la lumière étant une onde correspondant à la vibration d'un champ électromagnétique et émettant des particules d'énergie lumineuses appelées photons. Cette vibration, en se propageant, décrit une courbe présentant un maximum et un minimum. La longueur d'onde caractéristique de l'onde électromagnétique est définie par la distance séparant deux maximums ou deux minimums successifs.

- Les rayons UV (de 100 à 400 nm).

- La lumière Visible (de 400 à 800 nm) (BENBAHMED et *al.*, 2018).

III.1. Principe de la spectrophotométrie UV-visible :

Le spectrophotomètre est un appareil permettant de mesurer l'absorbance d'une solution, pour différentes longueurs d'ondes. Pour cela, il fait passer un rayon d'une longueur d'onde choisie à travers une cuve contenant la solution à étudier.

Les molécules de la solution absorbent plus ou moins le rayon lumineux, on définit alors l'absorbance pour cette longueur d'onde.

III.2. Loi de Beer-Lambert :

Le domaine spectral de l'UV-Visible est largement exploité en analyse quantitative. La loi de Beer- Lambert est une loi additive qui s'applique aux différentes molécules présentes en solution ou pour une même molécule aux différentes formes qu'elle peut prendre.

La loi de Beer-Lambert sert à établir une relation entre l'absorbance, l'épaisseur de l'échantillon et la concentration des espèces absorbantes.

Cette relation s'écrit : $\text{Log}_{10}(I_0/I) = \epsilon Cl$

Ou bien sous sa forme actuelle est : $A : \epsilon Cl$

Avec:

A : absorbance

ϵ : Coefficient d'extinction ($\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}.\text{L}$).

C : Concentration (mol/L)

l : Epaisseur de la cuve (cm).

I_0 : Intensité de l'énergie d'irradiation arrivant sur l'échantillon (Lumière incidente)

I : Intensité de la radiation qui a traversé l'échantillon (Lumière transmise) (IBRAHIM et *al.*, 2014).

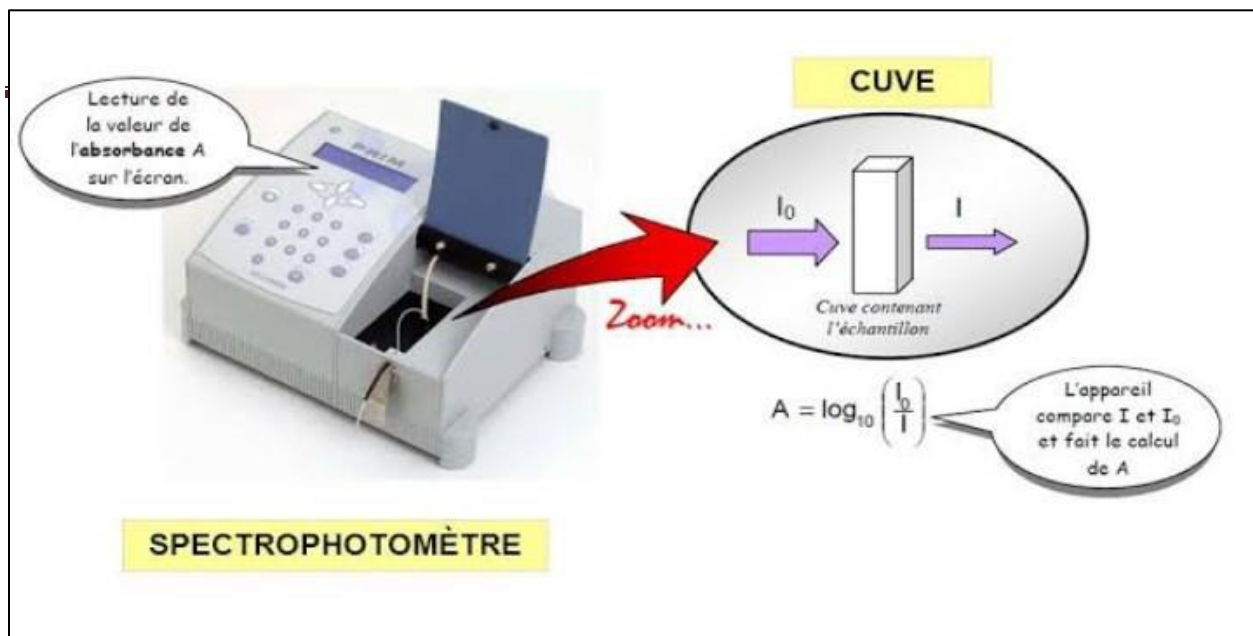


Figure 13 : Principe du spectrophotomètre UV-Visible (ATSAMENIA, 2019).

IV. Amarrage moléculaire avec AUTODOCK :

Il existe de nombreux outils d'amarrage automatique ou Docking, qui se répartissent en deux grandes catégories selon la méthode utilisée : l'ajustement de fragments (Matching) ou la simulation de trajectoire. Les méthodes par ajustement de fragment commencent par construire un modèle « en négatif » du site actif. Ce modèle est constitué par le volume accessible du site et les points d'interaction tels que les sites de liaison hydrogène, les charges ou les sites lipophiles (FORTUNE, 2006).

La première problématique de la biologie structurale est le repliement des macromolécules dans une structure tridimensionnelle biologiquement active. La compréhension de la communication moléculaire pour échanger des informations, s'activer ou s'inhiber est la seconde problématique, enjeu majeur de la biologie intégrée. L'amarrage moléculaire (ou le Docking moléculaire) est l'un des outils qui confère à résolu ces problèmes (MEDELLEL *et al.*, 2018).

Le rôle principal de cette technique est étudié puis prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure de récepteur (protéine) (BOUCHAGRA, 2018).

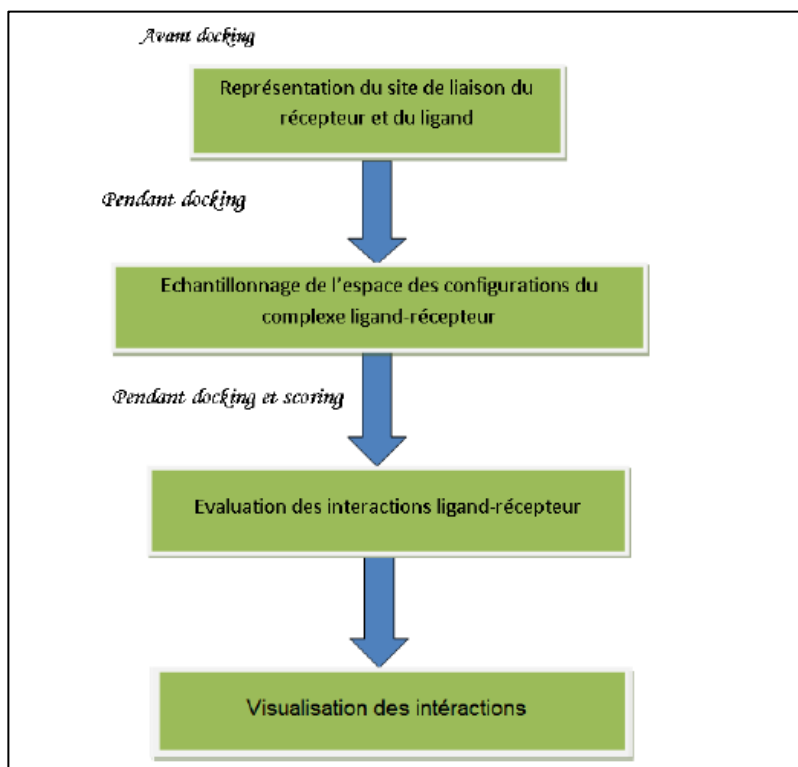


Figure 14: Protocole générale de Docking moléculaire (BOUCHAGRA, 2018).

IV.1. Modélisation du potentiel énergétique :

Pour calculer l'énergie libre du complexe ligand-récepteur, AUTODOCK utilise les termes d'un champ de force traditionnel auxquels sont ajoutés deux termes liés à l'entropie. L'énergie est donnée par l'équation 1 :

Equation 1 : $\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$ (FORTUNE, 2006).

ΔG_{vdw} : énergie de dispersion / répulsion des atomes,

ΔG_{hbond} : énergie des liaisons d'hydrogène,

ΔG_{elec} : énergie des interactions électrostatiques,

$\Delta G_{conform}$: énergie de déviations à partir de géométrie covalente

ΔG_{tor} : est un terme qui traduit l'augmentation d'énergie du système due à la restriction des rotors libres du ligand et à la restriction des rotations et translations du ligand lors de la complexation au récepteur,

ΔG_{sol} : est un autre terme lié à l'entropie qui décrit les variations d'énergie du système lors de la désolvatation du ligand au moment de la complexation au récepteur.

Le passage par une relation empirique de type QSAR est nécessaire pour relier la structure des complexes et l'énergie libre de liaison. Le modèle empirique utilisé dans AUTODOCK est une régression linéaire multiple des différents termes de l'équation d'énergie libre. Chaque terme est ainsi pondéré par un coefficient dérivé d'un jeu étendu de complexes récepteur-inhibiteur pour lesquels la constante d'inhibition K_i est connue. La relation entre la constante d'inhibition et l'énergie libre de liaison est donnée par l'équation 2 :

Equation 2 :

$$\Delta G_{obs} = RT \ln K_i$$

ou R est la constante des gaz parfaits ($1,987 \text{ cal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) et T la température absolue (BOUDEBIA *et al.*, 2017).

IV.2. Principe théorique :

Le Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Les logiciels de Docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique. Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine, le terme Docking seul est couramment employé pour désigner un « Docking protéine-ligand » (EL HADJ SAID, 2016).

IV.3. Les étapes de Docking :

Le processus du Docking est itératif et chaque passe de calcul s'articule en deux étapes :

IV.3.1. Le Docking :

Est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la molécule et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. Les logiciels de Docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique.

IV.3.2. Le Scoring :

Est une méthode mathématique pour le classement, utilisées pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison entre deux molécules et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de Docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées (MEDELLEL *et al.*, 2018).

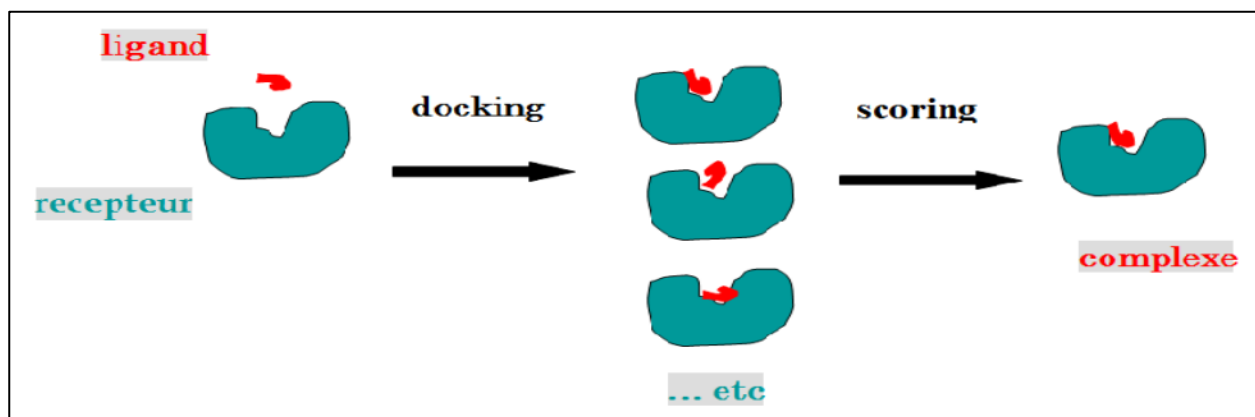


Figure 15: Les étapes de Docking moléculaire (EL HADJ SAID, 2016).

V. Gaussian :

Plusieurs types de méthodes ont été développées dans le but de modéliser précisément les grandeurs thermochimiques (enthalpie, énergie du point zéro,...) qui sont reliées aux fréquences de vibration par l'intermédiaire d'une fonction de répartition selon la mécanique statistique. Nous avons choisi l'une de ces méthodes les plus utilisée qui est le Gaussian. Portée par le programme Gaussian, elle affecte à chaque calcul de fréquences, un calcul des grandeurs thermochimiques du système également (SAOUD, 2015).

GAUSSIAN est un logiciel de chimie quantique, créé à l'origine par John Pople et sorti en 1970 (Gaussian 70). Il a été depuis plusieurs fois mis à jour. Le nom provient de l'utilisation par Pople d'orbitales gaussiennes pour accélérer le calcul par rapport aux logiciels utilisant des orbitales de Slater. Ceci a facilité le développement de la chimie quantique. Gaussian 09 est la dernière version de la série. Il fournit des capacités de pointe pour la modélisation de structure électronique. Ce programme peut effectuer des calculs selon plusieurs méthodes, comme Hartree-Fock, les méthodes post-Hartree-Fock, ou les fonctionnelles de la DFT (MATHIVON, 2013).

Deuxième partie

Partie pratique

CHAPITRE 01

Matériels et méthodes

Partie II : Partie pratique**Chapitre 01 : Matériels et méthodes****I. Matériels d'étude :**

L'ensemble de matériel d'étude regroupe les produits, l'appareillage et les pesticides...

I.1. Matériel biologique :

Le matériel génomique de base de mon travail est constitué du sang collecté de deux poules dans un pot à urines contenant de l'EDTA. L'extraction a été faite à partir du sang entier collecté et congelé.

I.2. Produits chimiques :**I.2.1. Les pesticides utilisés :**

Pour cette étude, on a choisit d'un premier temps de déterminer les pesticides les couramment utilisés par les agriculteurs de la région d'El oued. Donc, le choix des pesticides a été fait à partir des données de la direction des services agricoles de la Wilaya.

Le premier pesticides c'est bien un fongicide systémique en cultures légumières d'où son nom commercial est Previcur® Energy ; qui contient du Propamocarbe-Fosétyle, une combinaison particulière des matières actives systémiques Propamocarbe et Fosétyle.

Le deuxième pesticide est connu par le nom Karateka ; un insecticide pyréthrinöide d'action composant de la lambda-cyhalothrine comme matière active.

I.2.2. Les solutions de lyse :

Les solutions de lyse utilisées et leur composition :

- 1- Solution de lyse des globules rouges (TLR) : NH_4Cl - NaHCO_3 – EDTA
- 2- Solution de lyse des globules blancs (TLB) : TRIS - EDTA – NaCl
- 3- Solution tampon : KH_2PO_4 - K_2HPO_4

I.2.3. Poudres et solutions utilisées :

Ethanol, SDS, Tris, EDTA, NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , eau distillé, NH_4Cl , NaHCO_3

I.3. Matériels non biologiques (appareils et instruments) :

- Centrifugeuse Sigma
- Vortex
- Agitateur
- Balance
- Bain de glace
- pH mètre
- Spectrophotomètre UV-Vis
- Micropipette avec des embouts stériles
- pH mètre
- Tubes spéciaux pour la centrifugation
- Tubes en verre
- Eprouvette
- Cuillère
- Portoir
- Béchers
- Papiers abrasif p 4000
- Aiguille à insuline
- Cuves de Quartz

I.4. Matériel informatique :

Pour l'étude *in silico*, j'ai utilisé la molécule d'ADN sous forme pdb concernant le Docking.

II. Méthodes d'étude :**II.1. Etude *in vitro* :****II.1.1. Prélèvement sanguin :**

Le sang préconisé pour l'extraction d'ADN a été récupérer à partir de deux poulets lors de l'abattage dans un pot à urines contenant de l'EDTA pour bloquer l'action des DNases qui sont capables de dégrader l'ADN.

II.1.2. Extraction d'ADN :

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible (**SOMMA**).

❖ Séparation des leucocytes par hémolyse :

Selon les étapes suivantes :

- On ajoute un volume de solution de lyse de globules rouges (TLR) à un volume du sang ($v=v$), incubé pendant 20min à 4°C.
 - Centrifugez à 2500 trs/min pendant 15min à 4°C.
 - Élimine le surnageant.
 - Répète le lavage avec le TLR trois fois à chaque fois vous devez agiter par vortex.
 - Enlève le surnageant et recueille le culot qui doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine.
 - Laisse le culot sécher 5min à température ambiante
- ⇒ Le culot obtenu est utilisé pour l'extraction d'ADN.

❖ Extraction d'ADN :

- 1- Ajoute au culot 2ml de solution de lyse des globules blancs et vortexez.
 - 2- Ajoute 150 µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (20%) qui permet de détruire les membranes des cellules.
 - 3- Laisse l'extrait 1h30 à 55°C sous agitation.
 - 4- Ajoute 3ml NaCl de 6M après le refroidissement et vortexez pendant 6min jusqu'à avoir un aspect laiteux.
 - 5- Centrifuge le tube pendant 10min à 1300 trs/min.
 - 6- On obtient ainsi une phase inférieure organique contenant les débris (protéines, lipides...), une phase supérieure aqueuse contenant l'ADN et l'interface contient en majorité des protéines et peu l'ADN. Le surnageant, contenant l'ADN dispersé.
 - 7- Transvase le surnageant dans un tube propre.
 - 8- Ajoute 2 volumes d'isopropanol 99% froid pour précipiter l'ADN.
 - 9- Mélange délicatement le tube jusqu'à ce que les filaments d'ADN forment une **méduse**.
 - 10- Centrifuge pendant 10 min à 1300 trs/min, puis éliminez le surnageant.
 - 11- Lave avec éthanol 70% puis ré-centrifuge pendant 5 min à 1300 trs/min.
 - 12- Laisse sécher le tube toute une nuit à une température ambiante pour que l'éthanol s'évapore et la pelote séchée
- ⇒ Dissolution de l'ADN :

Quand l'ADN est en pelote sèche, il ne peut être utilisé pour des analyses de biologie moléculaire. On doit donc réhydrater l'ADN dans un volume d'eau distillée stérile qui sera choisi en fonction de la taille de la méduse.

Cette solubilisation nécessite une bonne agitation ; L'ADN sera totalement réhydraté lorsque la pelote aura disparu. Après dissolution complète, la DO de la solution d'ADN obtenu est mesurée à 260 nm et à 280 nm afin de déterminer la concentration et la pureté de l'ADN extrait.

L'ADN dissout peut être conservé à +4°C pendant quelques jours ou à - 20°C pour une conservation à plus long terme (**ADAIKA, 2016**).

❖ La qualité de l'ADN extrait :

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260 nm ; cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN.

L'estimation de la DO se fait dans une cuve en quartz contre de l'eau distillée à 260 nm et 280 nm afin de pouvoir calculer le rapport DO_{260} / DO_{280} , ce rapport renseigne sur le degré de pureté de l'ADN et sa contamination éventuelle par des protéines. Un rapport compris entre 1.6 et 2 indique que l'ADN est propre.

❖ **Quantification et analyse de la pureté d'ADN par spectrophotométrie :**

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur purification. La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques (**Anonima**).

Préparation de la solution tampon :

On dissout 1.36 g de KH_2PO_4 et de 1.4196 g de K_2HPO_4 , puis on ajoute de l'eau petit à petit jusqu'à l'obtention d'une solution à pH autour de 7 à 7.4. Une fois le pH est ajusté on ajoute de l'eau jusqu'à l'obtention d'un volume égale à 100 ml.

II.1.3. Méthodes utilisées pour la détermination des effets mutagènes et/ou cancérogènes :

II.1.3.1. Spectrophotométrie UV-VIS :

Dans le spectrophotomètre, l'échantillon est traversé par un faisceau lumineux et un détecteur mesure, pour chaque longueur d'onde, l'intensité avant et après absorption (I_0 et I) (**BOUNAB, 2011**).

- **Appareillage :**

L'expérience est réalisée par un spectrophotomètre de type UV visible (SHIMADZU 1800) lié à un ordinateur doté avec un logiciel, la réaction a été faite dans des cuves en Quartz (1ml). Le spectrophotomètre contient deux emplacements l'un pour le blanc et l'autre pour l'échantillon (pesticide seulement ou avec l'ADN).



Photo 04 : Spectrophotométrie UV-Visible (SHIMADZU1800).

- **Echantillon :**

Les spectres enregistrés des échantillons des pesticides avec des concentrations bien déterminées et solubilisés dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.09 M à pH = 7.4 ont été incubés dans une cuve de 1 ml, après il y'avait la lecture des pesticides à 0 concentration d'ADN puis l'addition des concentrations croissantes d'ADN à l'aide d'une seringue à insuline de volume = 1ml.

- **Pratique :**

- 1- On prépare le spectrophotomètre et le maître connecter avec l'ordinateur.
- 2- Choisir le mode lecture Absorbance et choisir le domaine de la longueur d'onde (200-900nm) correspond à l'étude de mes échantillons.
- 3- Faire premièrement la lecture du blanc.
- 4- Auto zéro.
- 5- Cliquer sur Baseline et relire le blanc pour confirmer que le blanc est nul.

- 6- Lis les échantillons des pesticides et sauvegarder les pics.
- 7- A chaque fois, j'ajoute des concentrations croissantes d'ADN et enregistrer les données acquises.
- 8- Traite les données obtenues avec le logiciel OriginePro 9.0 à l'aide d'Excel 2010.

II.1.3.2. Méthode électrochimique :

L'analyse électrochimique regroupe l'ensemble des méthodes d'analyses quantitatives. Celles-ci font appel aux propriétés électriques d'une solution lorsque celle-ci fait partie d'une cellule électrochimique. Les méthodes électrochimiques sont basées sur la caractérisation des réactions d'oxydoréduction qui sont le siège d'un échange d'électrons entre l'oxydant et le réducteur. Elles sont capables d'atteindre des limites de détection très basses et de fournir de nombreuses informations concernant le système étudié. Pour faire, le suivi des paramètres potentiel (E), courant (I) et temps (t) est réalisé dans une cellule électrochimique à trois électrodes.

- **Appareillage et milieu réactionnel :**

La voltamétrie cyclique est réalisée à partir d'un potentiostat (Galvanostat Model PGZ 301(radiomètre analytical SAS))

Les voltamogrammes sont enregistrés dans une cellule de mesure à trois électrodes :

- ✓ Une électrode de travail : en carbone vitreux
- ✓ Une électrode de référence : Hg/HgCl₂/KCl saturé ; désignée pour maintenir un potentiel de référence connu et stable (ABOURICHE. BOUDJELLAL, 2019).
- ✓ Une électrode auxiliaire en platine diamètre 3mm²(ADAIKA, 2016).

Le tout est piloté par un micro-ordinateur Pentium IV (CPU 4.0 GHz et RAM 2 Go) doté d'un logiciel VoltaMaster4, version 7.08.

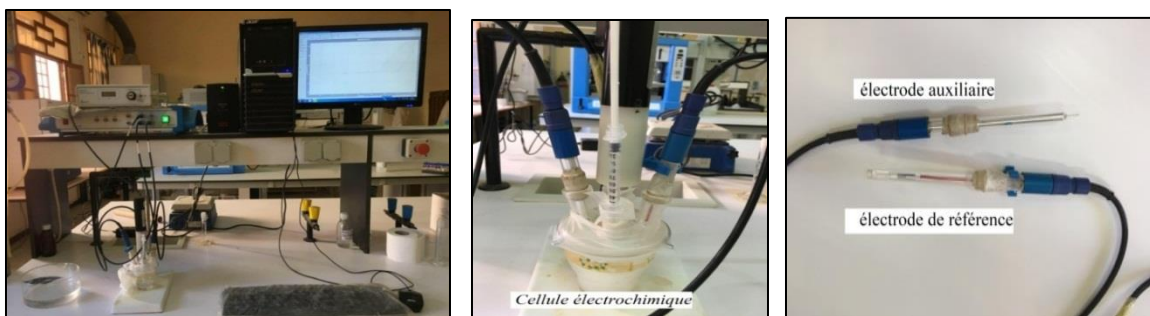


Photo 05: Dispositif expérimental voltampérométrique utilisé.

- **Echantillon :**

Le travail a été effectué sur deux pesticides; la réaction ADN-pesticide se déroule dans une cellule électrochimique de 25 ml, contenant une solution tampon ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) à 0.09 M.

Un volume de chaque pesticide est ajouté au début avant l'addition de différentes concentrations d'ADN par une seringue à insuline de 1 ml.

- **Pratique :**

- 1- J'allume le potentiostat et préparer les électrodes.
- 2- Nettoie bien l'électrode de travail avec le papier abrasif.
- 3- Programme la voltamaster 4 sur la voltamétrie cyclique en déterminant la vitesse de balayage, domaine de balayage, nombre de cycle.
- 4- Prépare la paillasse de travail.
- 5- Prépare la cellule électrochimique de 25ml et on ajoute le tampon ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.09M placer les électrodes dans la cellule, et faire un barbotage d'azote pendant quelques minutes pour chasser l'oxygène de la cellule puis on trace un voltamogramme qui doit être nul (blanc).
- 6- Injecte ensuite une concentration bien déterminée d'un pesticide dans la cellule, bien mélanger puis tracer les voltammogrammes à différentes vitesses.
- 7- Injecte l'ADN d'une concentration croissante dans la cellule à l'aide d'une seringue d'insuline (1ml).
- 8- Le balayage successif enregistré dans le même domaine de potentiel de chaque Echantillon (pesticide+ les différents doses d'ADN, à différentes vitesses de balayage de 100mv à 500mv.
- 9- Ferme l'appareil, nettoyer tous les instruments à l'aide de l'eau distillé puis avec l'acétone.
- 10- Calcule les différents paramètres électrochimiques à l'aide d'un logiciels (OriginPro 9.0).

- **Logiciels et calculs :**

Les valeurs obtenus sont prises par les courbes des pics et voltamogrammes obtenues par un logiciel OriginPro 9.0 (Logiciel de traitement et d'analyse de données scientifiques).

II.2. Etude *in silico* :

II.2.1. Préparation des pesticides (ligand) :

Les structures des pesticides ont été préparées et optimisées avec le logiciel Gaussian 09, puis elles sont enregistrées sous forme pdbqt. L'AutoDock exige le format pdbqt, Le ligand est donc converti en format pdbqt.

II.2.2. Préparation d'ADN :

Dans cette étude on a utilisé l'ADN disponible dans le PDB (code : 1BNA), la molécule d'ADN a été téléchargée au format pdb.

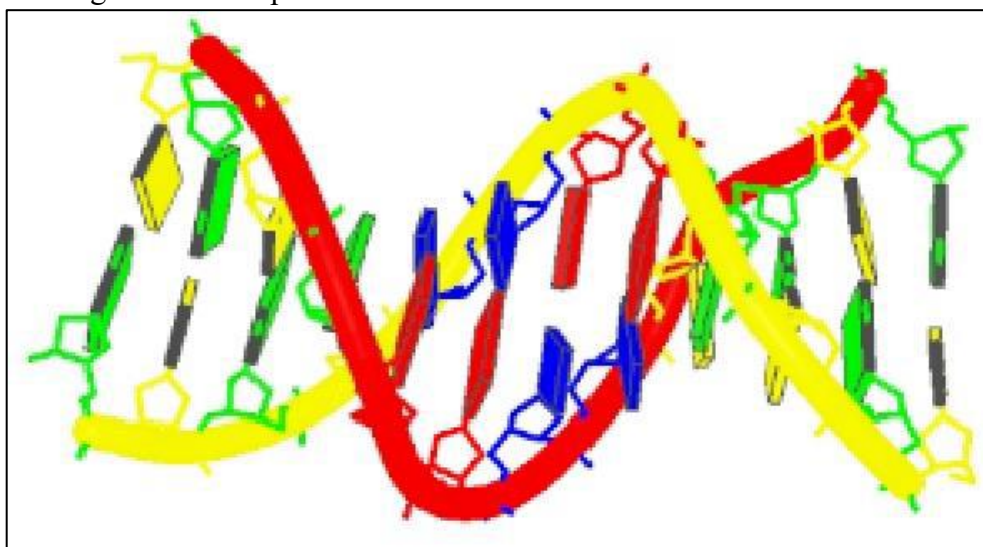


Figure 16: Structure de l'ADN d'un Dodécamère (Drew *et al.*, 1981).

La longueur de structure de l'ADN téléchargée est 12 nucléotides. Dont, la succession nucléotidique pour les chaînes A et B comme suivant :

Chaîne A: DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')

Chaîne B: DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')

II.2.3. Processus d'AutoDock :

Le processus de Docking consiste à faire interagir le pesticide avec l'ADN en utilisant le logiciel AutoDock 4.2.6. La procédure d'amarrage avec AutoDock, six étapes sont nécessaires :

1. Préparation de l'accepteur.

2. Chargement de récepteur et du ligand.
3. Configuration des paramètres de l'AutoGrid.
4. Exécution de l'AutoGrid.
5. Exécution de l'AutoDock.
6. Analyse de résultats.

C.1. Préparation de l'accepteur :

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes :

- File → Read Molecule → select1BNA.pdb.
- Edit → Delete → Delete Water.
- Edit → Hydrogens → Add Hydrogens.
- Edit → Hydrogens → Merge Non-Polar.
- Edit → Charges → Compute Gasteiger Charge.

C.2. Chargement de récepteur et du ligand :

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes :

- ligand → Input → Open → Ligand.pdbqt
- Ligand → Torsion Tree → Detect Root

C.3. Configuration des paramètres de l'AutoGrid :

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes :

- Grid → Macromolecule → Chose
- Grid → Select Map Types → Choose Ligand → select Ligand
- Grid → Select Map Types → Set Up Covalent Map → set Energy Barrier Height to 1000 and set Half-width (angstrom) to 5.00
- Grid → Grid Box → Set number of points in x, y and z-dimension to 100 and set Spacing;(angstrom) to 0.200

C.4. Exécution de l'AutoGrid :

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes :

- Run-AutoGrid

C.5. Exécution de l'AutoDock

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes :

- Doking → Macromolecule → Rigid Filname → select 1BNA.pdbqt
- Docking → ligand → Choose and select ligand
- Docking → Search Parametres → Genetec → Algorithm → set Number of GA Runs to 25
- Docking → output → Lamarckian GA (4.2) and save output as dock.dpf
- Run-Autodock

C.6. Analyse de résultats

Cette étape est réalisée grâce aux commandes suivantes :

- Analyze → Confirmation → Play, Ranked by energy and analyze interactions.

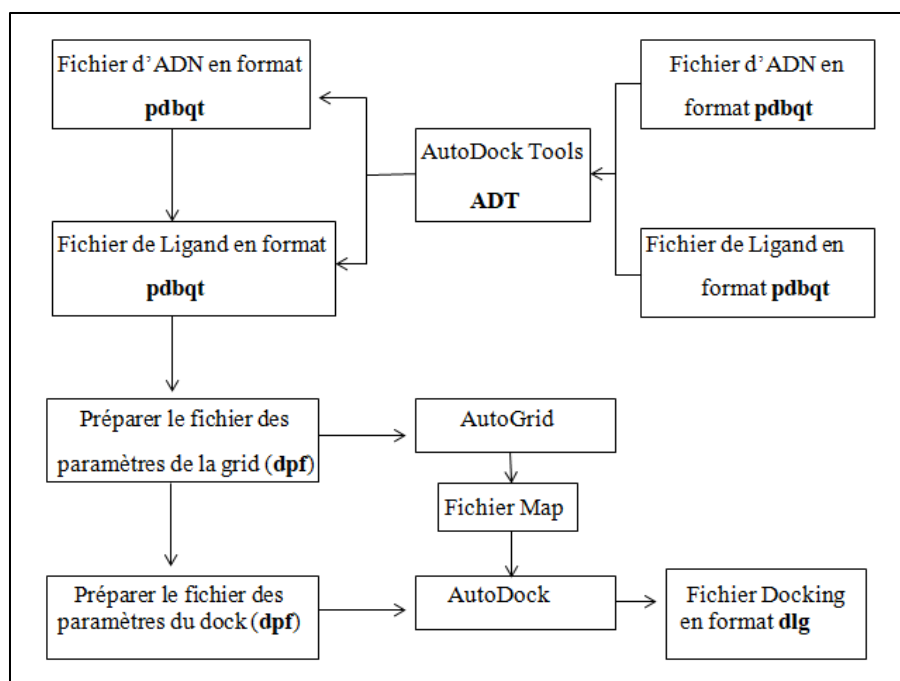


Figure 17 : Procédure de Docking avec AutoDock (BOUDEBIA et al., 2017).

CHAPITRE 02

Résultats et discussion

Chapitre 02 : Résultats et discussion

I. Résultats :

I.1. Etude *in vitro* :

I.1.1. Quantification et analyse de la pureté des échantillons d'ADN

○ Spectre d'absorption d'ADN :

Les bases A, T, G, C, U ont une absorption maximale à ≈ 260 nm (LUNARDI, 2012).

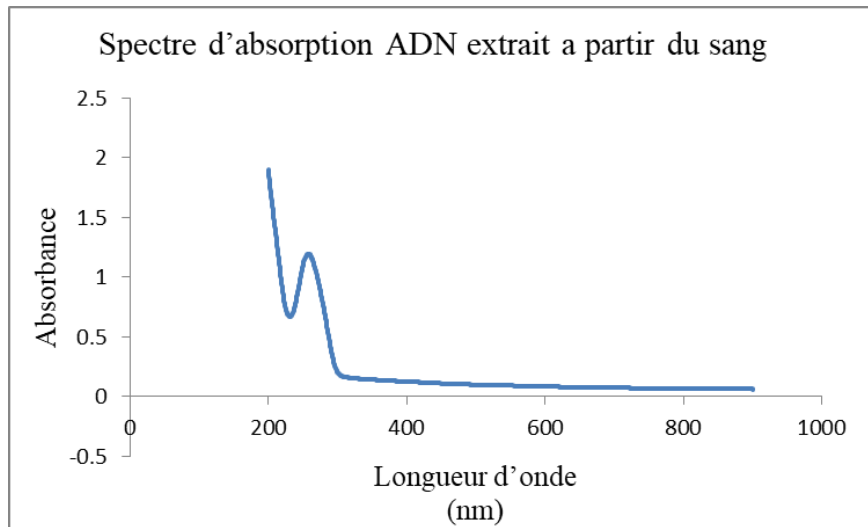


Figure 18: Spectre d'absorption d'ADN extrait

I.1.1.a. La concentration d'ADN :

Selon l'équation de Beer- Lambert, on calcule la concentration d'ADN. En mesurant l'absorbance à 258 nm avec le coefficient d'extinction molaire $\epsilon=6600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

$$A = \epsilon.l.c$$

Avec : « C » concentration d'acide nucléique en mol.l^{-1} , « ϵ » coefficient d'extinction, et « l » trajet optique en cm (ADAIKA et al., 2019).

Le dosage d'ADN à 258 nm donne une concentration : $181 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$.

I.1.1.b. Analyse de la pureté d'ADN :

Le ratio DO260/DO280 est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques. La pureté d'une solution d'ADN est considérée comme acceptable lorsque ce ratio est compris entre 1,6 – 2,0.

Tableau 07: La ratio DO260/DO280 de la solution d'ADN extrait.

Longueur d'onde	DO d'ADN
260	1.189
280	0.744
Ratio = DO₂₆₀/DO₂₈₀	1.598 ≈ 1.60

I.2. Etude de l'interaction entre l'ADN et Previcur :**I.2.1. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-Previcur :**

En spectroscopie électronique, si un composé interagit avec l'ADN, l'absorbance et la longueur d'onde de ce composé subit une variation suite à l'addition de l'ADN. Ces variations peuvent être utilisées pour la détermination des paramètres de liaison.

La constante de liaison peut être évaluée par spectrophotométrie d'après l'équation de Benesi-Hildebrand suivante :

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon - \varepsilon_0} + \frac{\varepsilon_0}{\varepsilon - \varepsilon_0} \frac{1}{K[ADN]}$$

Où A_0 est l'absorbance du composé libre, A l'absorbance de l'adduit, ε_0 et ε sont respectivement leurs coefficients d'extinction molaire.

La constante de liaison est calculée par le rapport pente/interception, du tracé du $A_0/(A - A_0)$ en fonction de $1/[ADN]$ (BOUDEBIA *et al.*, 2017).

Les valeurs de la constante de liaison K et d'énergie libre de liaison ΔG de l'adduit ADN-Previcur résultant ont été déterminés par l'étude de la variation d'absorbance de pesticide en absence et en présence d'ADN par méthode spectroscopique dans une solution tampon dans la (fig.19).

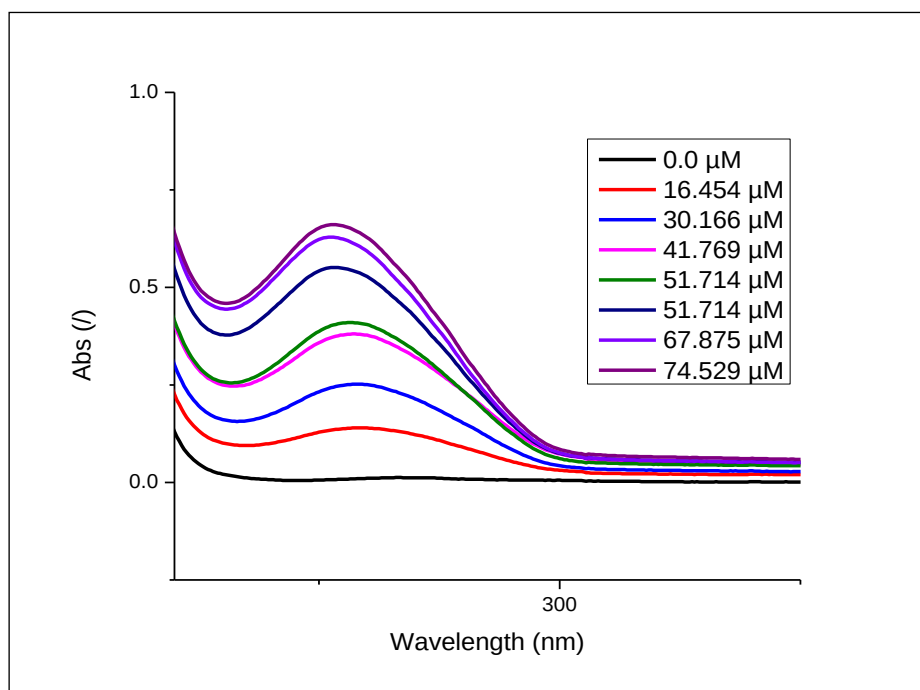


Figure 19: Spectre d'absorption UV-Vis de Previcur 0.29×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.09M à pH=7.4

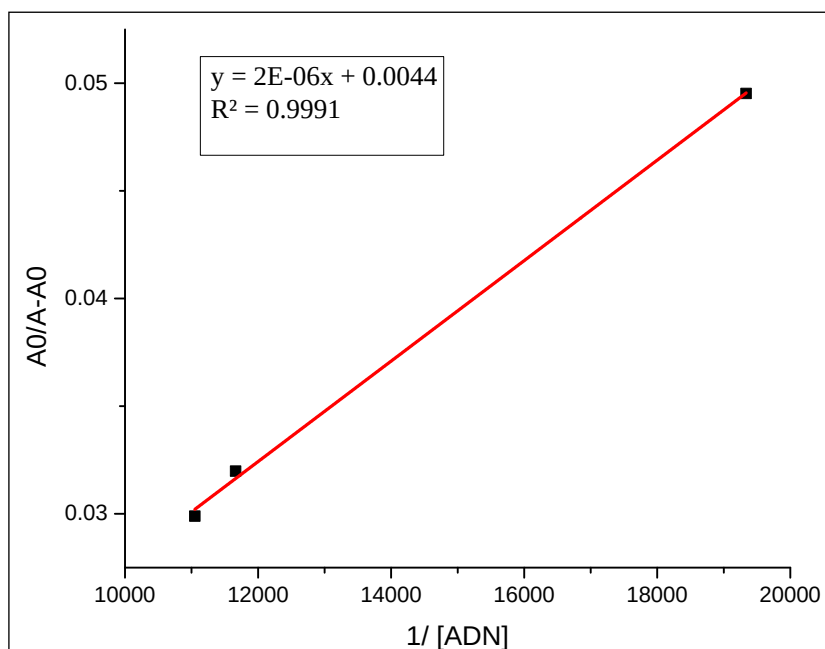


Figure 20: La droite de régression d'absorbance $A_0/A-A_0$ en fonction de l'inverse de la concentration d'ADN de Previcur 0.29×10^{-3} M.

L'énergie libre est calculée à partir de cette équation :

$$\Delta G = -RT \ln K \text{ (Aslanoglu et al., 2005)}$$

Les valeurs obtenues de la constante de liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-Previcur sont regroupés dans le tableau ci-dessous (tab.9) avec, $A_0 = 0.0119$.

Tableau 08: Valeurs de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-Previcur obtenues à partir des données spectrophotométriques UV-Vis.

[ADN] mol/l $\times 10^{-5}$	1/[ADN]	A	$A_0/A-A_0$	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
5.1714	19337.02	0.2522	0.049521	2.200×10^3	-5.55
8.5736	11663.6	0.384	0.031981		
9.05	11049.72	0.41	0.029892		

I.2.2. Etude électrochimique par voltammétrie cyclique d'ADN-Previcur :

I.2.2.1. Constante et énergie libre de l'interaction ADN-Previcur :

L'énergie libre de liaison ΔG de l'ADN avec Previcur a été déterminé par l'étude du comportement anodique de ce pesticide en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN, cette étude du comportement électrochimique a été réalisé par la technique de la voltammétrie cyclique dans une solution tampon phosphate 0.09 M de pH=7.4.

Les Voltammogrammes cycliques de Previcur 0.29×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN sont représentés dans la (fig.21).

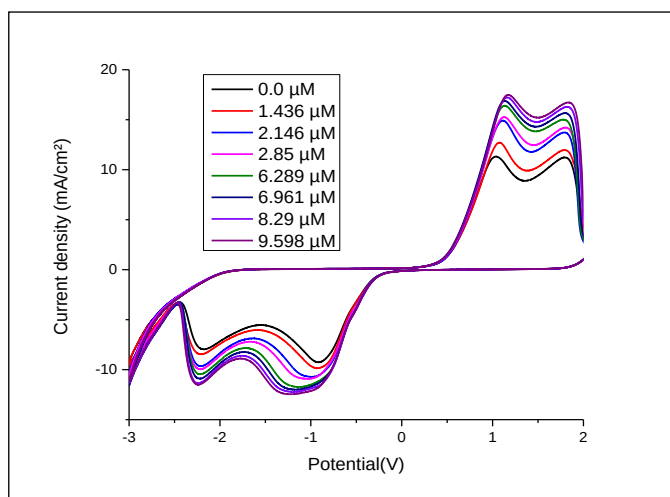


Figure 21: Voltammogrammes cycliques de Previcur 0.29×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.09 M pH=7.4 à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S.

Les voltammogrammes cycliques représentés dans la figure 20 montrent que l'addition d'ADN provoque toujours une augmentation de la densité du courant des pics anodiques et cathodiques i_{pa} et i_{pc} (cela peut être dû au facteur de diffusion selon l'équation de RANDLES et SEVICK) s'accompagne d'un déplacement du potentiel des pics anodiques vers les valeurs les plus positives alors que le déplacement du potentiel des pics cathodiques vers les valeurs les plus négatives.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la (fig.20) sont regroupés dans le tableau suivant (tab.09) :

Tableau 09: Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure 20

[ADN] mol/l	E_{pa} (mV)	i_{pa} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	E_{pc} (mV)	i_{pc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
0.0×10^{-6}	1.0757	12.7112	-2.2117	-8.4657
2.14×10^{-6}	1.1137	14.8987	-2.2133	-9.6581
2.85×10^{-6}	1.1292	15.2571	-2.2146	-9.96
6.28×10^{-6}	1.1324	16.4067	-2.2150	-10.4471
6.96×10^{-6}	1.1366	16.8628	-2.2224	-10.91
9.59×10^{-6}	1.1723	17.4771	-2.2345	-11.5204

L'augmentation du courant des pics anodiques de Previcur après l'ajout de différentes concentrations d'ADN a été utilisée pour quantifier la constante de liaison en utilisant l'équation suivante :

$$\log \frac{1}{[ADN]} = \log K + \log \frac{i}{i_0 - i}$$

Avec, [ADN] : concentration d'ADN, K : constante de liaison, i_0 et i sont les densités de courant anodiques en absence et en présence d'ADN respectivement (Sirajuddin et al., 2013).

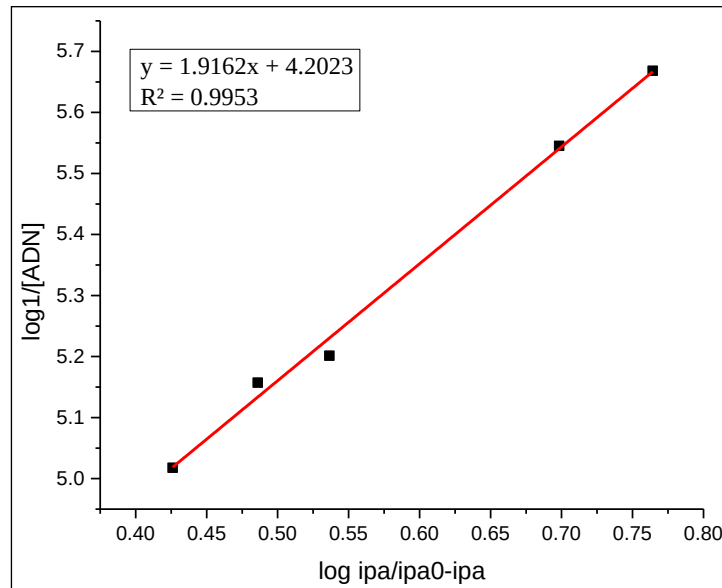


Figure 22: La droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa_0 - ipa)$ de Previcur 0.29×10^{-3} M.

Les valeurs obtenues de la constante de liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-Previcur sont regroupées dans le tableau suivant (tab.10):

Tableau 10: La constante et l'énergie libre de liaison calculées à partir du tracé du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa_0 - ipa)$ pour Previcur.

$\log 1/[ADN]$	$\log ipa/(ipa_0 - ipa)$	Equation	R ²	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
5.66832	0.764238	$y = 1.9162x + 4.2023$	0.9953	15.8489×10^3	-8.27
5.5451	0.698345				
5.20138	0.536513				
5.15729	0.485971				
5.0178	0.426042				

I.2.2.2. Coefficient de diffusion :

Afin de calculer les coefficients de diffusion de Previcur et celui de l'adduit ADN-Previcur, plusieurs voltammogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400, 500 mV/s en absence ($0.0 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$) et en présence de ($3.55 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$) d'ADN ; représentés dans (fig.23).

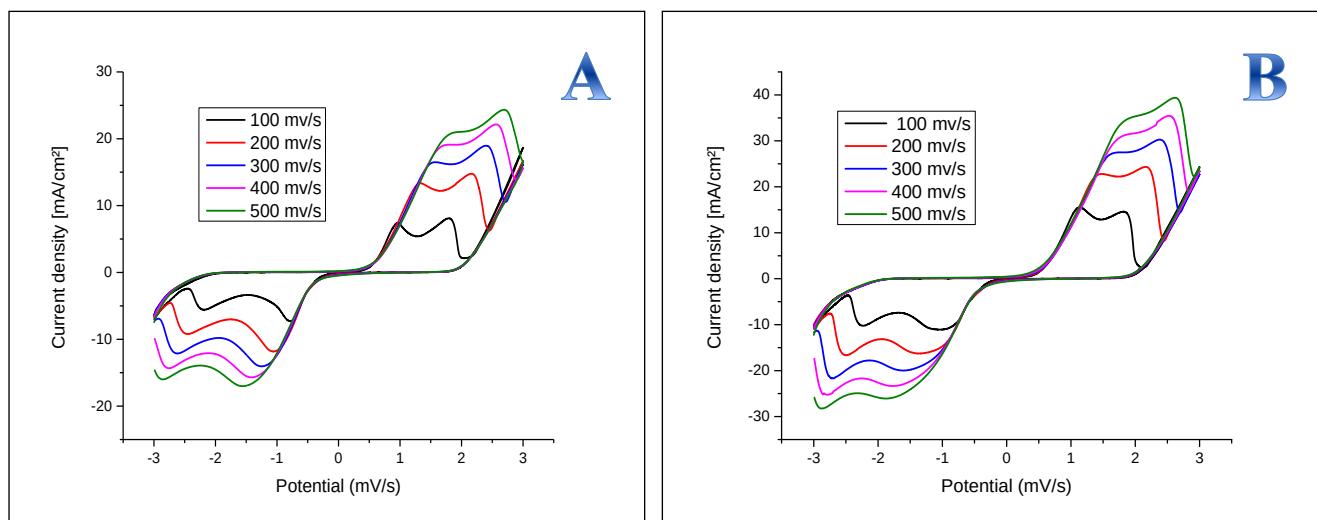


Figure 23: Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de $3.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ d'ADN de Previcur de $0.29 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure, ainsi que la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel sont regroupés dans le tab11.

Tableau 11: Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel de Previcur 0.29×10^{-3} M.

Vitesse (mV/s)	$V^{1/2}$	0 mol/l ADN	3.55×10^{-6} mol/l d'ADN
		IPa ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)	IPa ($\mu\text{A.cm}^{-2}$)
100	10	7.3668	15.5201
200	14,142	13.3317	22.8488
300	17,32	16.5061	27.4359
400	20	19.09	31.1002
500	22,36	20.8248	34.5764

Les coefficients de diffusion de Previcur et de ADN-Previcur ont été déterminés en utilisant l'équation suivante de Randles-Sevcik :

$$i = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

Avec, i_{pa} : la densité du courant de pic anodique, n : nombre des électrons mise en jeu

A : surface de l'électrode du travail, C : la concentration d'ADN

D : coefficient de diffusion, et v : la vitesse de balayage du potentiel (ADAIKA, 2016).

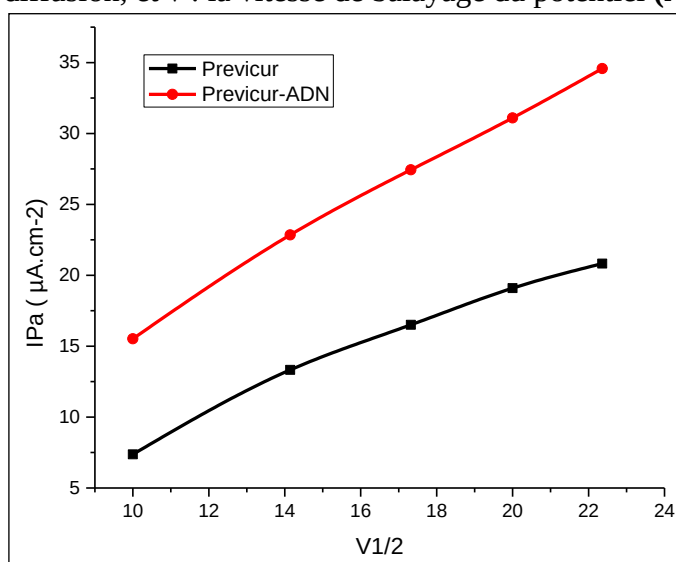


Figure 24: Courant des pics anodiques de Previcur 0.29×10^{-3} M tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence de 3.55×10^{-6} M d'ADN (ligne rouge).

Les coefficients de diffusion de Previcur et de ADN-Previcur sont tabulés dans le tableau suivant (tab.12) :

Tableau 12: Coefficients de diffusion de Previcur et de ADN-Previcur

Complexe	Equation	R ²	D (cm ² /s)
Previcur	1.0839x - 2.7471	0.9842	1.1 x 10 ⁻⁶
ADN-Previcur	y = 1.5249x + 0.7326	0.9969	2.3 x 10 ⁻⁶

Les résultats montrent que le coefficient de diffusion de 'Previcur' est plus petit que celui de complexe.

I.2.2.3. Taille de site de liaison :

La taille des sites de liaison S de Previcur avec l'ADN peut être déterminée à partir des données électrochimiques en utilisant de l'équation suivante : (Aslanoglu et al., 2006)

$$\frac{C_l}{C_n} = \frac{ip_0 - ip}{ip}$$

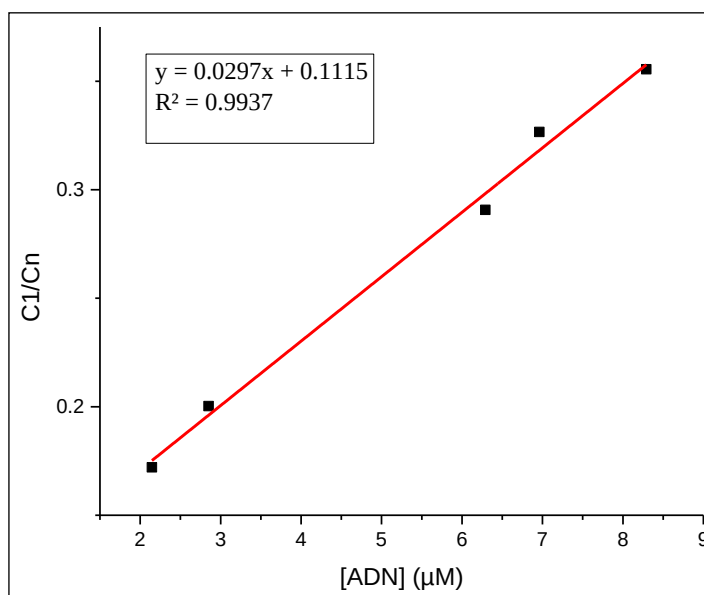


Figure 25 : Tracé de $C1/Cn$ ((i-i₀)/i₀) en fonction de [ADN] de Previcur 0.29 x 10⁻³ M.

La taille de site de liaison déterminée à partir de la pente de Tracé de $C1/Cn$ en fonction de [ADN] en mettant : $\frac{K}{2S} = \text{pente}$

Tableau 13: Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et Previcur

Pente	K	S (bp)
0.0297	15848	0.235

I.3. Etude de l'interaction entre l'ADN et Karateka :

I.3.1. Etude spectroscopique UV-Visible de l'interaction ADN-Karateka :

Les valeurs de la constante de liaison K et d'énergie libre de liaison ΔG de l'adduit ADN-Karateka résultant ont été déterminés par l'étude de la variation d'absorbance de pesticide en absence et en présence d'ADN par méthode spectroscopique dans une solution tampon.

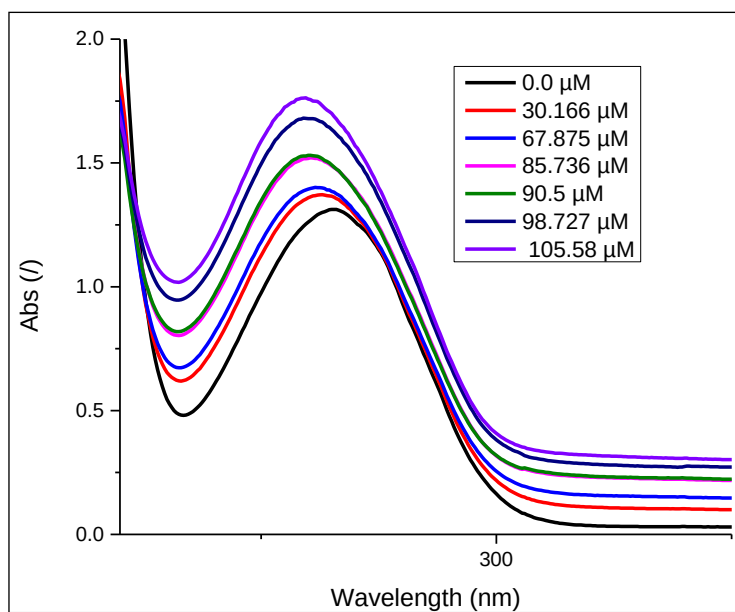


Figure 26 : Spectre d'absorption UV-Vis de Karateka 0.34×10^{-3} M en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN.

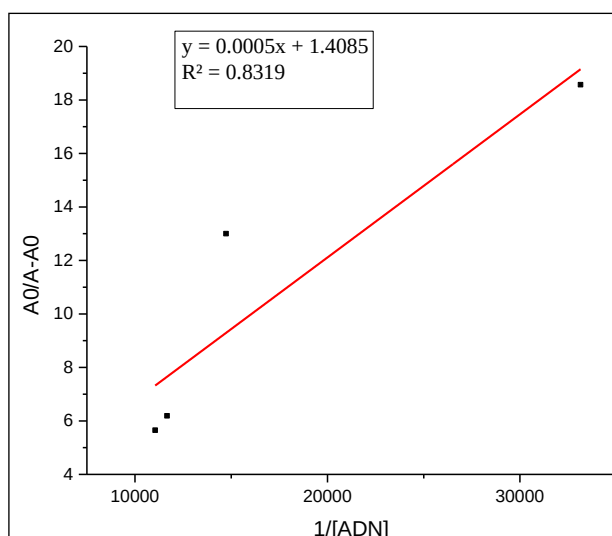


Figure 27 : La droite de régression d'absorbance $A_0/A-A_0$ en fonction de l'inverse de la concentration d'ADN de Karateka 0.34×10^{-3} M.

Les valeurs obtenues de la constante de liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-Karateka sont regroupés dans le tableau ci-dessous (tab.14) avec, $A_0 = 1.3$.

Tableau 14: Valeurs de la constante de liaison et l'énergie libre de liaison de l'interaction ADN-Karateka obtenues à partir des données spectrophotométrique UV-Vis.(Karateka)

[ADN] mol/l $\times 10^{-5}$	1/[ADN]	A	$A_0/A-A_0$	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
3.0166	33149.17	1.37	18.57143	2.82×10^3	-6.70
6.7875	14732.97	1.4	13		
8.57368	11663.6	1.51	6.190476		
9.05	11049.72	1.53	5.652174		

I.3.2. Etude électrochimique par voltamétrie cyclique d'ADN-Karateka :

I.3.2.1. Constante et énergie libre de l'interaction ADN-Karateka :

L'énergie libre de liaison ΔG de l'ADN avec Karateka a été déterminé par l'étude du comportement anodique de ce pesticide en absence et en présence des concentrations différentes d'ADN, cette étude du comportement électrochimique a été réalisé par la voltammétrie cyclique dans une solution tampon.

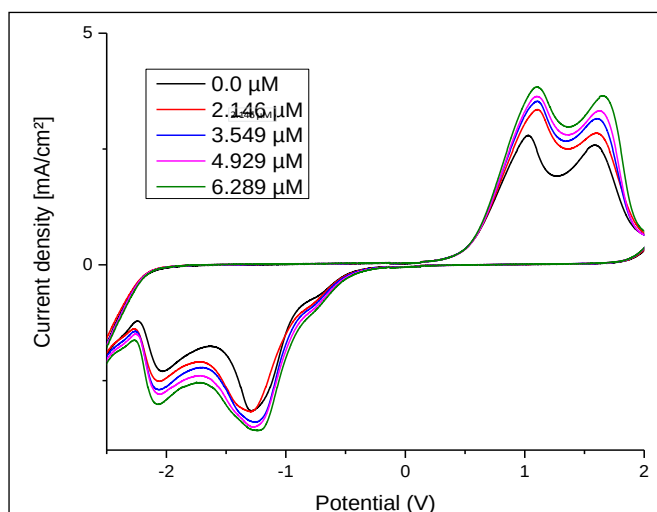


Figure 28 : Voltammogrammes cycliques de Karateka $0.34 \times 10^{-3} \text{ M}$ en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN enregistré sur une électrode de carbone vitreux dans un tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.09 M à une vitesse de balayage du potentiel 100 mV/S .

Les voltammogrammes cycliques représentés dans la figure (fig.28) montrent que l'ajout des concentrations croissantes d'ADN été suit toujours par une augmentation de la densité du courant des pics anodiques et cathodiques i_{pa} et i_{pc} avec un déplacement du potentiel des pics anodiques vers les valeurs les plus positives alors que le déplacement du potentiel des pics cathodiques vers les valeurs les plus négatives.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure sont regroupés dans le tableau suivant (tab.15):

Tableau 15: Paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure 27.

[ADN] mol/l	$E_{pa} \text{ (mV)}$	$i_{pa} \text{ (}\mu\text{A/cm}^2\text{)}$	$E_{pc} \text{ (mV)}$	$i_{pc} \text{ (}\mu\text{A/cm}^2\text{)}$
0.0×10^{-6}	1.5885	2.7897	-2.0333	-2.3078
2.14×10^{-6}	1.6017	3.350	-2.0603	-2.5205
3.54×10^{-6}	1.6068	3.5282	-2.0647	-2.7004
4.92×10^{-6}	1.6247	3.6313	-2.0582	-2.797

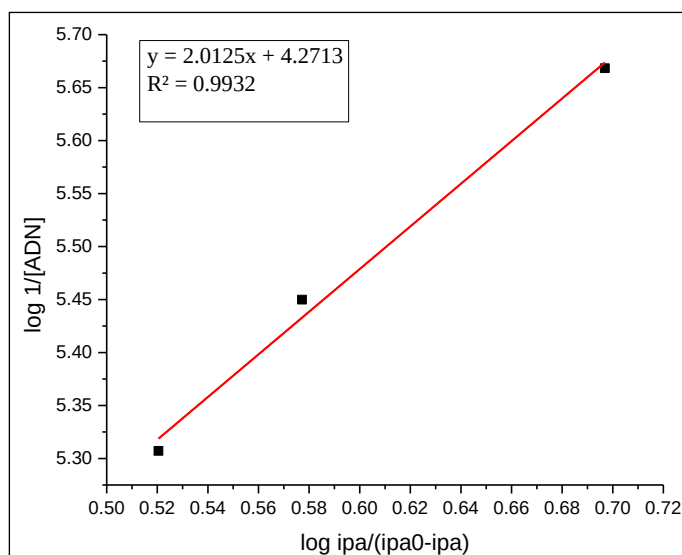


Figure 29 : La droite de régression du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa_0 - ipa)$ de Karateka 0.34×10^{-3} M.

Les valeurs obtenues de la constante de liaison et d'énergie libre de l'interaction ADN-Karateka sont regroupées dans le tableau suivant (tab.16):

Tableau 16: La constante et l'énergie libre de liaison calculées à partir du tracé du $\log 1/[ADN]$ en fonction de $\log ipa/(ipa_0 - ipa)$

$\log 1/[ADN]$	$\log ipa/(ipa_0 - ipa)$	Equation	R ²	K (mol ⁻¹)	ΔG (KJ.mol ⁻¹)
5.668321	0.764238	$y = 2.0125x + 4.2713$	0.9932	18.620 $\times 10^3$	-7.17
5.449892	0.698345				
5.307157	0.536513				

I.3.2.2. Coefficient de diffusion :

Afin de calculer les coefficients de diffusion de Karateka et celui de l'adduit ADN-Karateka, plusieurs voltammogrammes cycliques ont été enregistrés à différentes vitesses de balayage du potentiel 100, 200, 300, 400, 500 mV/s en absence (0.0×10^{-6} mol/l) et en présence de (3.55×10^{-6} mol/l) d'ADN.

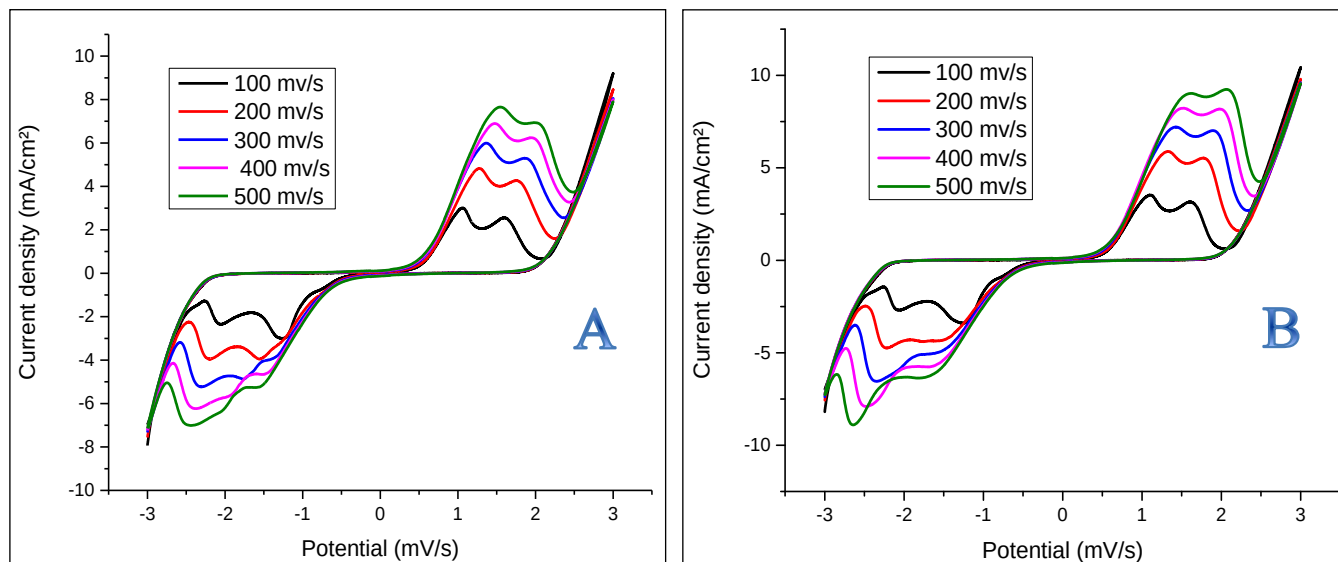


Figure 30 : Voltammogrammes cycliques à différentes vitesses de balayage du potentiel de 100 à 500 mV/s en absence (A) et en présence (B) de l'ADN de Karateka 0.34×10^{-3} M.

Les paramètres électrochimiques tirés à partir des voltammogrammes cycliques de la figure, ainsi que la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel sont regroupés dans le (tab.17).

Tableau 17: Courant des pics anodiques enregistrés à différentes vitesses de balayage de potentiel en absence et en présence de l'ADN, et la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel.

Vitesse (mV/s)	$V^{1/2}$	0 mol/l ADN	3.5×10^{-6} mol/l d'ADN
		$IPa (\mu A.cm^{-2})$	$IPa (\mu A.cm^{-2})$
100	10	3.0179	3.5221
200	14,142	4.8198	5.8798
300	17,32	5.973	7.22
400	20	6.8868	8.2281
500	22,36	7.643	9.0223

Le courant des pics anodiques ont été tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence et en présence de 3.55×10^{-6} d'ADN

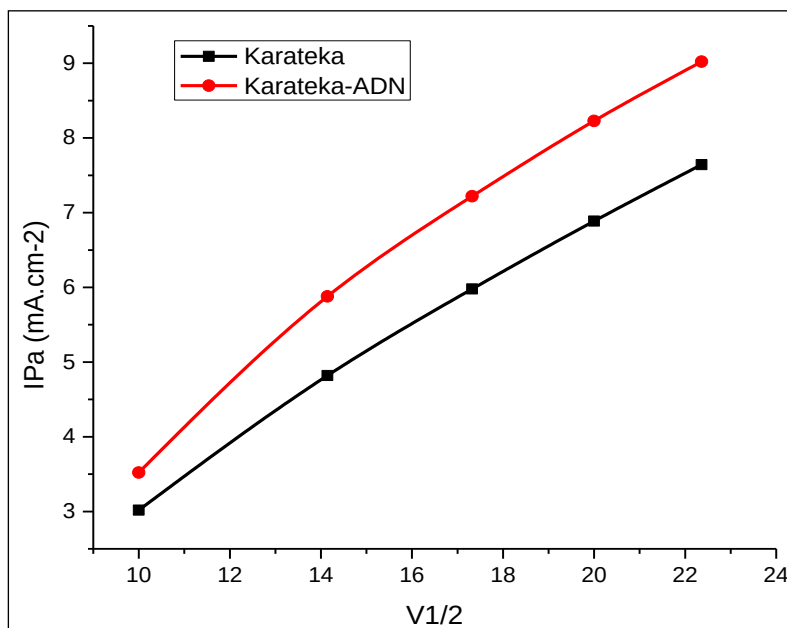


Figure 31 : Courant des pics anodiques de Karateka 0.34×10^{-3} M tracé en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage du potentiel en absence (ligne noire) et en présence de 3.55×10^{-6} M d'ADN (ligne rouge).

Les coefficients de diffusion de Karateka et de ADN-Karateka sont tabulés dans le Les valeurs de coefficients de diffusion de Karateka et ADN-Karateka sont regroupés dans le (tab.18)

Tableau 18: Coefficients de diffusion de Karateka et de ADN-Karateka.

Complexe	Equation	R ²	D (cm ² /s)
Karateka	$y = 0.3728x - 0.5813$	0.9957	9.83×10^{-8}
ADN-Karateka	$y = 0.4421x - 0.6367$	0.9877	1.38×10^{-7}

La valeur de coefficient de diffusion de Karateka est plus petite que celle lorsque le pesticide est lié à l'ADN.

I.3.2.3. Taille de site de liaison :

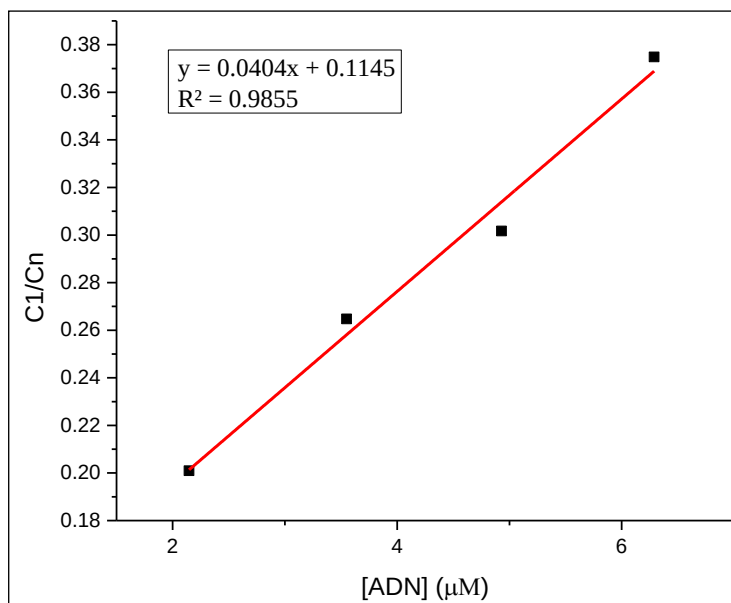


Figure 32 : Tracé de $C1/Cn$ ((i-i0)/i0) en fonction de [ADN] de Karateka 0.34×10^{-3} M.

La taille de site de liaison déterminée à partir de la pente de Tracé de $C1/Cn$ en fonction de [ADN] en mettant : $K/2S = \text{pente}$

Tableau 19: Détermination de la taille de site de liaison entre l'ADN et Karateka

Pente	K	S (bp)
0.0404	18620.87	0.376

I.3. Etude *in silico* :

L'amarrage moléculaire par le logiciel AUTODOCK de l'interaction des deux pesticides avec l'ADN permet d'obtenir les paramètres de cette interaction à savoir : l'énergie libre de liaison ΔG et la constante de liaison K.

I.3.a. Previcur :

Tableau 20: Différentes conformations de l'interaction Pesticides-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.

Conformation	ΔG (KJ.mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
Previcur-ADN	-24.91	2.3085×10^4

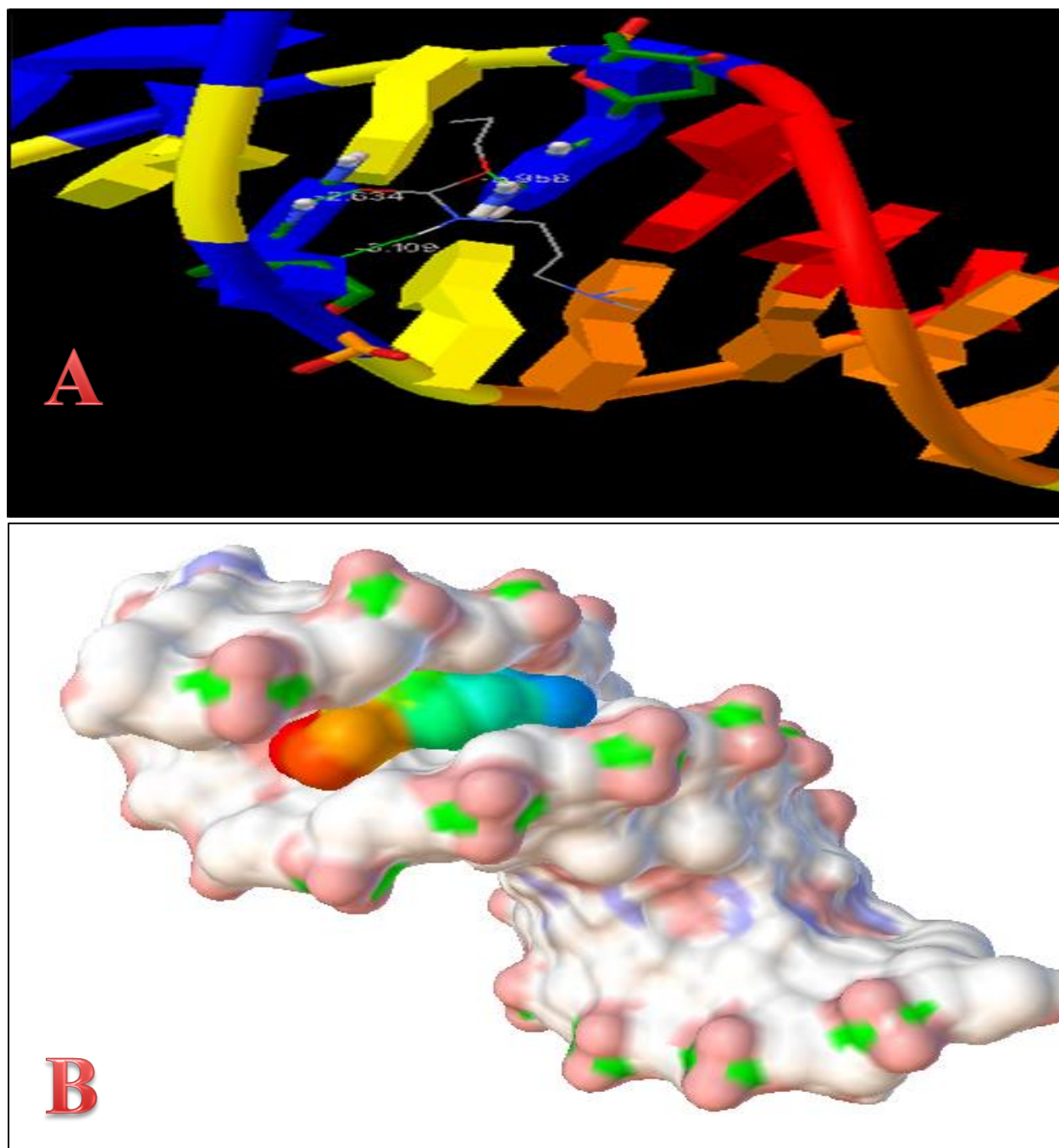


Figure 33 : Interaction de Previcur avec l'ADN. (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction Previcur-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé, Vue en surface de Previcur amarré avec l'ADN.

Il montre que Previcur est attaché dans le petit sillon par liaison H. Previcur se lie avec l'ADN en formant 3 liaisons hydrogènes (figure 33, tableau 23), la première entre l'hydrogène n° 3 de déoxyguanine (DG) n°10 de la chaîne A d'ADN et l'oxygène de Previcur, la deuxième entre

l'hydrogène n° 16 de déoxyguanine (DG) n°22 de la chaîne B de l'ADN et l'oxygène de Previcur et la dernière entre l'hydrogène de Previcur et l'oxygène de l'ADN déoxyguanine (DG) n°10.

Tableau 21: Distances et énergies des liaisons hydrogènes, et les atomes de Previcur et d'ADN impliqués dans ces liaisons.

Liaisons	Distances (Å)	Energies (KJ.mol ⁻¹)
ADN : chaîne A : DG10: H3 <=> Ligand : O	1.696	-2.634
ADN : chaîne B : DG16: H22 <=> Ligand : O	1.918	-5.958
Ligand : H <=> ADN : chaîne A : DG10 : O	2.139	-3.109

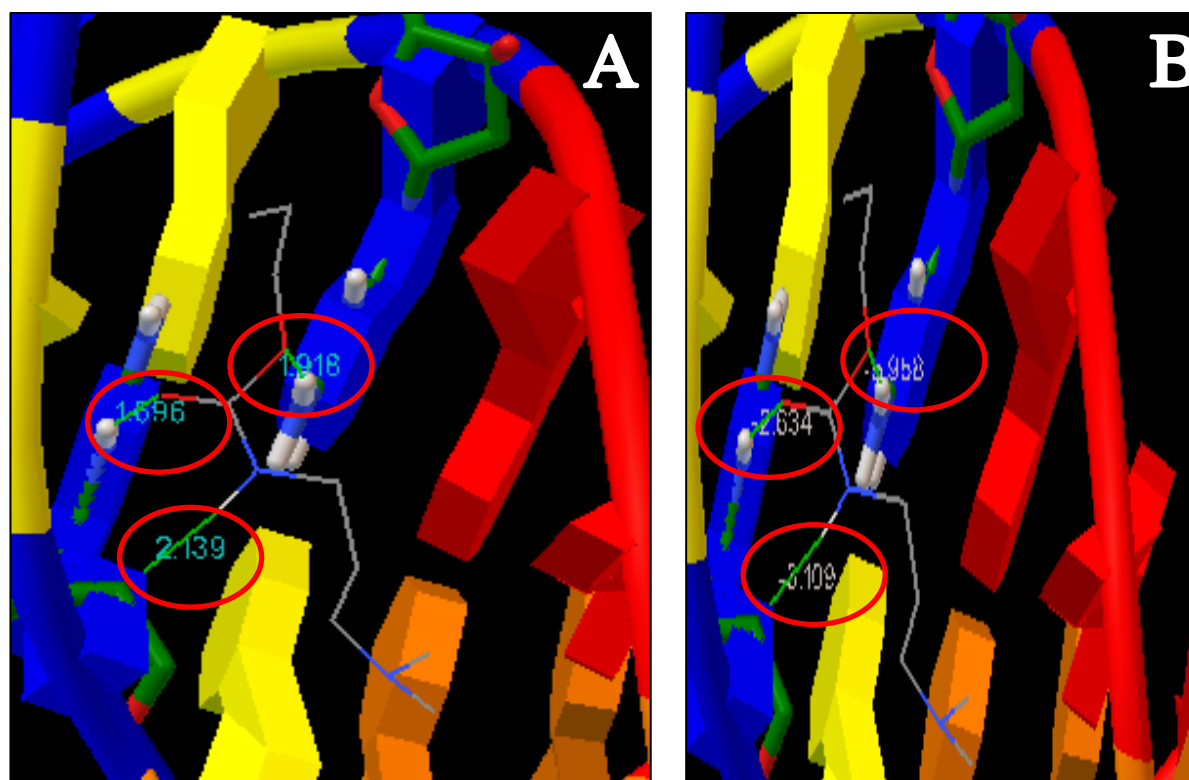


Figure 34 : Distances exprimées en Å (a) et énergies exprimées par Kcal. mol⁻¹ (b) des liaisons hydrogènes formées entre Previcur et l'ADN.

I.2.b. Karateka :

Tableau 22: Différentes conformations de l'interaction Pesticides-ADN et leurs énergies libres ΔG et constantes de liaison K.

Conformation	ΔG (KJ.mol ⁻¹)	K (mol ⁻¹)
Karateka-ADN	-17.69	1.2550×10^4

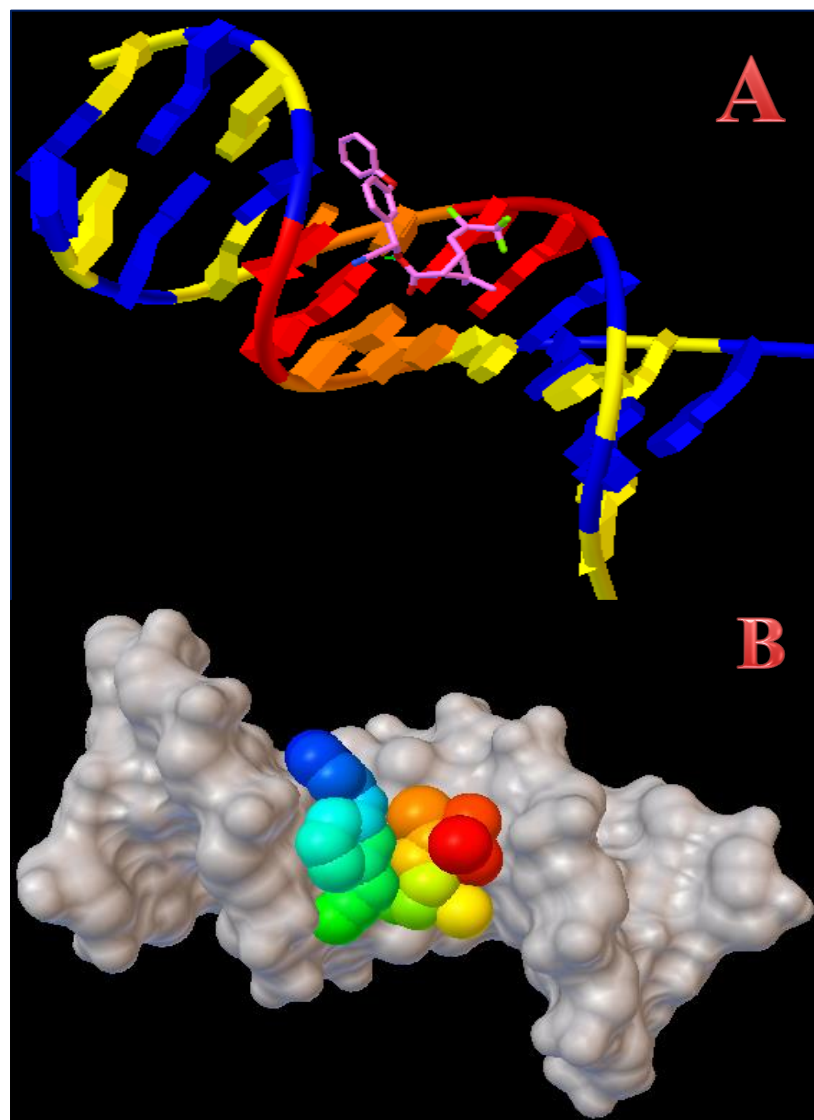


Figure 35 : Interaction de Karateka avec l'ADN. (A) : Amarrage moléculaire de l'interaction Previcur-ADN, désoxyadénosine (DA) : rouge, désoxycytosine (DC) : jaune, désoxyguanine (DG) : bleu, désoxythymidine (DT) : brun foncé, Vue en surface de Previcur amarré avec l'ADN.

Il montre que Karateka est attaché dans le grand sillon par liaison H. Karateka se lie avec l'ADN en formant une seule liaison hydrogène (fig.34, tab.25) entre l'hydrogène n° 62 de désoxyadénosine (DA) n°18 de la chaîne B d'ADN et l'oxygène de Karateka.

Tableau 23: Distance et énergie de la liaison hydrogène, et les atomes de Karateka et d'ADN impliqués dans cette liaison.

Liaisons	Distances (Å)	Energies (KJ.mol ⁻¹)
ADN: chaîne B: DA18: H62 <=> Ligand: O	1.81	-7.384

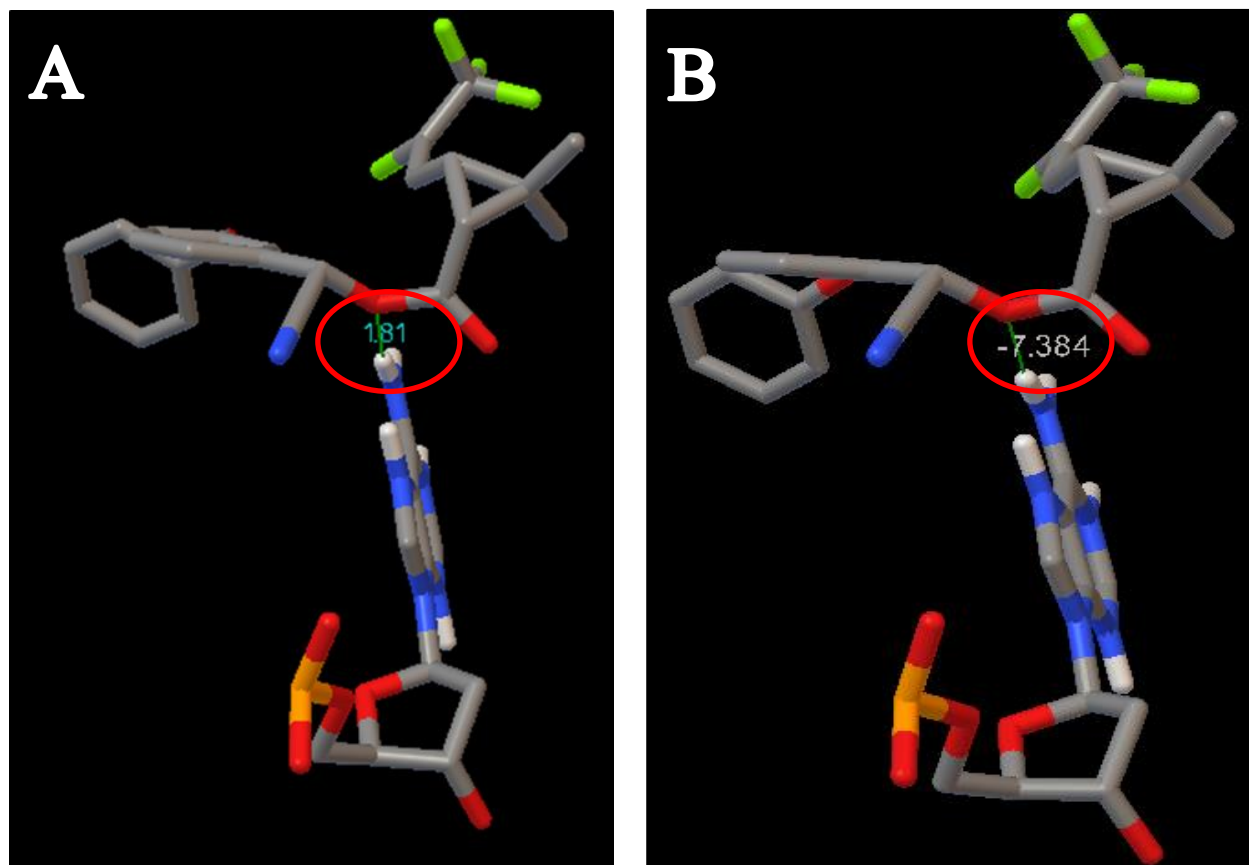


Figure 36 : Distance exprimée en Å (a) et énergie exprimée par Kcal. mol⁻¹ (b) de liaison hydrogène formée entre Karateka et l'ADN.

II. Discussion :

L'augmentation importante, dans la population générale, de certains cancers, pour lesquels il existe un lien étroit avec l'utilisation de pesticides, pose la question de savoir quel peut être l'impact des pesticides lorsqu'ils sont apportés quotidiennement et à long terme (toute une vie), à faibles doses et en mélanges. L'accent est mis aujourd'hui sur les interactions *in vitro* entre les nucléosides de l'ADN et ces contaminants. En revanche, les études de l'évaluation de risque mutagène et/ou cancérogène des pesticides sont relativement rares en raison de la difficulté, la complexité et l'ambiguïté entourant cette notion (SIMMONS, 1995 ; EL-MASRI *et al.*, 1997 Cité par GHENABZIA, 2017).

Cette étude a été faite pour évaluer et déterminer l'existence ou non des effets mutagènes et/ou cancérogènes de deux pesticides (Previcur et Karateka) les fréquemment utilisés par les agriculteurs de la région d'El Oued.

Plusieurs méthodes sont appliquées pour détecter et caractériser cette interaction, dans ce présent travail, nous avons utilisés deux méthodes de mesure spectroscopique UV-Visible : le spectre UV- Vis peut être utilisé pour une évaluation préliminaire de la constance de liaison et du mode de l'ADN avec les pesticides (Bing *et al.*, 2019). et électrochimique en absence et en présence des concentrations croissantes d'ADN . Ces dernières donnent à la fin d'expérience une variation des valeurs de la constante de liaison (K), de l'énergie libre de Gibbs (ΔG), le coefficient de diffusion (D) et la taille de site de liaison (S).

Ensuite, pour confirmer nos résultats nous avons étudiés ces interactions théoriquement, *in silico* par amarrage moléculaire.

In vitro, l'étude de la variation d'absorbance des pesticides en absence et en présence d'ADN donne des valeurs négatives de l'énergie libre de Gibbs pour les deux pesticides Previcur et Karateka ($\Delta G = -5.55$ KJ/mol et $\Delta G = -6.70$ KJ/mol respectivement) ; En général, quand une petite molécule interagit avec l'ADN et forme un complexe, les changements d'absorbance se produisent. Les valeurs négatives de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G = -RT \ln K$) indiquent la spontanéité (la réversibilité) de l'interaction de ces pesticides avec l'ADN par interaction physique.

Depuis que le concept d'intercalation dans l'ADN a été formulé pour la première fois par Lerman, il est devenu largement reconnu que de nombreux composés biologiquement actifs

corrèlent leurs activités biologiques avec la capacité d'interaction avec l'ADN (**Kamila et al., 2019**).

L'intercalation induit un changement de la structure locale du brin d'ADN, comme un "débobinage" de la double hélice ou un allongement du brin d'ADN. Ces changements structuraux induisent des modifications fonctionnelles, dont souvent une inhibition du procédé de réplication, ce qui fait des agents d'intercalation des composés potentiellement mutagènes. Les composés d'intercalation dans l'ADN sont souvent pathogènes et cancérigènes (**Anonima**).

La liaison de petites molécules à l'ADN implique une interaction électrostatique, une intercalation entre les paires de bases et une interaction de liaisons de petit et grand sillon d'ADN (**Sirajuddin et al., 2013**).

La voltamétrie cyclique (CV) est utilisée pour étudier les différents processus électrochimiques qui prennent place lors de l'application d'une analyse potentielle. Les pics de courant mesurés fournissent des informations sur le processus d'oxydation et de réduction d'une espèce électroactive. En outre, il fournit des informations sur le type de procédé objet de l'étude : (i) réversible ; (ii) irréversible ou (iii) quasi-réversible, dépend sur la séparation entre les pics anodiques et cathodiques. Une autre caractéristique qui popularise le CV est sa capacité à donner des informations sur la nature d'un procédé en termes d'adsorption et caractéristiques de diffusion (**Beatriz et al., 2019**).

L'étude par méthode électrochimique de l'interaction des deux pesticides (Previcur et Karateka) avec l'ADN montre que la valeur de l'énergie libre est négative ($\Delta G = -6.70$ et 7.17 respectivement) et moins de 30 KJ/mol , ce qui confirme que l'interaction des pesticides avec l'ADN se fait spontanément par interaction physique.

En outre, l'augmentation de l'absorbance ou du courant de pic anodique est généralement due à l'interaction covalente (**ADAIKA, 2016**). Le déplacement des pics de potentiel vers des valeurs moins négatives suggère une intercalation des pesticides avec l'ADN (**Sirajuddin et al., 2013**).

Ainsi que, L'augmentation du courant de pic anodique en voltamétrie cyclique est due à l'augmentation de coefficient de diffusion (D) de l'ADN à simple brin. Il pourrait aussi due à l'augmentation de la concentration de l'ADN dans la cellule électrochimique suite à la diminution de la masse molaire de l'ADN à simple brin (**Sirajuddin et al., 2013**).

La faible valeur de S indique la dominance de l'interaction d'intercalation ou l'interaction électrostatique entre les pesticides et l'ADN.

Les coefficients de diffusion des formes libres pour les deux pesticides sont inférieurs que celles liés avec l'ADN. Les tailles des sites de liaison des pesticides avec l'ADN ont été déterminées à partir des données électrochimiques.

In silico, le Docking représente le calcul mathématique de l'orientation spatiale la plus probable de deux molécules en interaction, généralement une protéine et un petit ligand, deux protéines en interaction ou ADN et protéine. Divers paramètres sont calculés pour évaluer la possibilité d'une telle interaction protéine-ligand (**Amit et al., 2011**).

In silico, l'étude de l'interaction entre le dérivé ferrocénique et l'ADN révèle que Previcur interagit avec l'ADN d'une façon spontanée traduit par la valeur de l'énergie libre ($\Delta G = -24.91$). En effet, Previcur se lie à l'ADN en formant 3 liaisons hydrogènes.



Conclusion générale

Conclusion générale

La présente étude a pour but de détecter la présence ou non des risques mutagènes et/ou cancérigènes de deux pesticides couramment utilisés par les agriculteurs d'El Oued (Previcur et Karateka). Il s'agit d'une étude expérimentale par méthode électrochimique en utilisant la technique de la voltampérométrie cyclique et par une méthode spectrophotométrique UV-Vis ; cette dernière a été confirmée théoriquement par le Docking.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent qu'il y'a une interaction physique, spontanée et favorable et que l'ADN se lie par des liaisons électrostatiques et/ou par intercalation en raison de leurs valeurs de ΔG négatives pour Previcur et Karateka : (en spectroscopie; $\Delta G = -5.55$ et $\Delta G = -6.70$ et en électrochimie ; $\Delta G = -6.70$ et 7.17 respectivement). Les deux produits forment des liaisons d'hydrogène avec l'ADN (Previcur : trois liaisons, Karateka : une seule liaison). D'autre part on remarque une relation corrélacionnelle entre les valeurs obtenues de la constante de liaison, le coefficient de diffusion ainsi que la taille de site de liaison de l'interaction des deux pesticides.

In silico, l'amarrage moléculaire par Docking donne aussi des valeurs négatives de ΔG et inférieurs à 30, ce qui confirme les résultats *in vitro*, par contre le décalage des valeurs de ΔG par les deux méthodes expérimentales est dû à la différence des conditions de milieu du Docking.

Ces résultats indiquent que ces deux pesticides n'ont pas des effets mutagènes et/ou cancérigènes à des faibles concentrations mais ils restent toujours des produits chimiques capables de provoquer des effets néfastes et toxiques pour la santé à des fortes concentrations et à des expositions à long terme.



Annexes

Annexes

Annexes 01 :

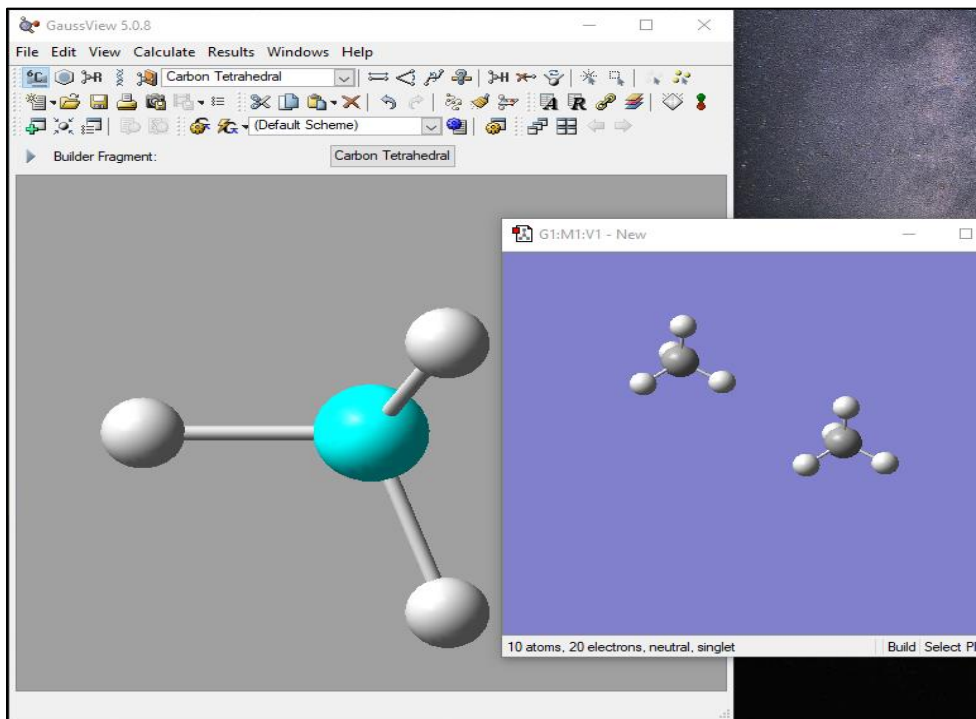
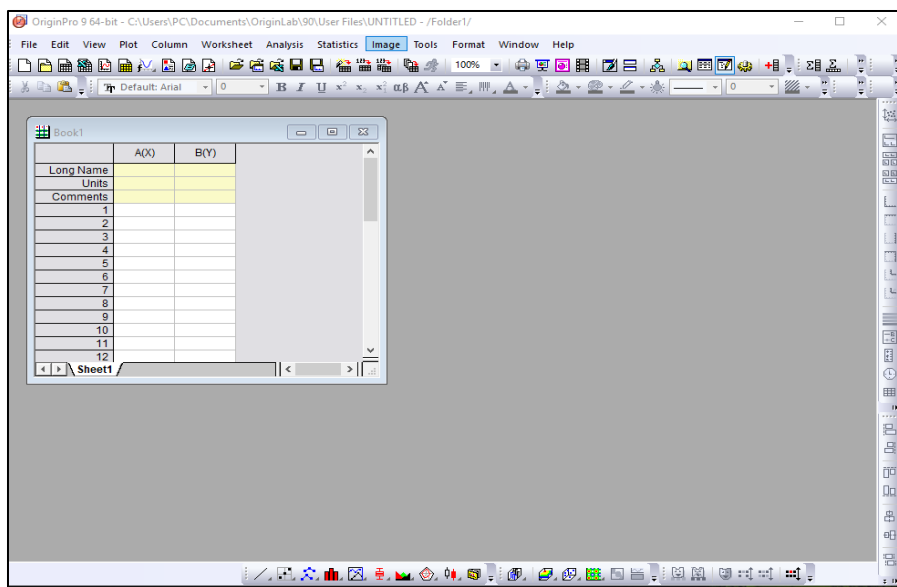


Figure 01 : Logiciel Gaussian 09.



The image shows the OriginPro 9.0 software interface. The main window displays a spreadsheet titled 'Book1'. The spreadsheet has three columns: 'Long Name', 'Units', and 'Comments'. The rows are numbered 1 through 12. The 'Long Name' column is highlighted in yellow. The 'Units' column is empty. The 'Comments' column is empty. The spreadsheet is shown in a 'Sheet1' view. The top menu bar includes File, Edit, View, Plot, Column, Worksheet, Analysis, Statistics, Image, Tools, Format, Window, and Help. Below the menu is a toolbar with various icons for file operations, editing, and visualization. The bottom status bar shows the current sheet and a zoom level of 100%.

	A(X)	B(Y)
Long Name		
Units		
Comments		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		

Figure 02 : Logiciel OriginPro 9.0

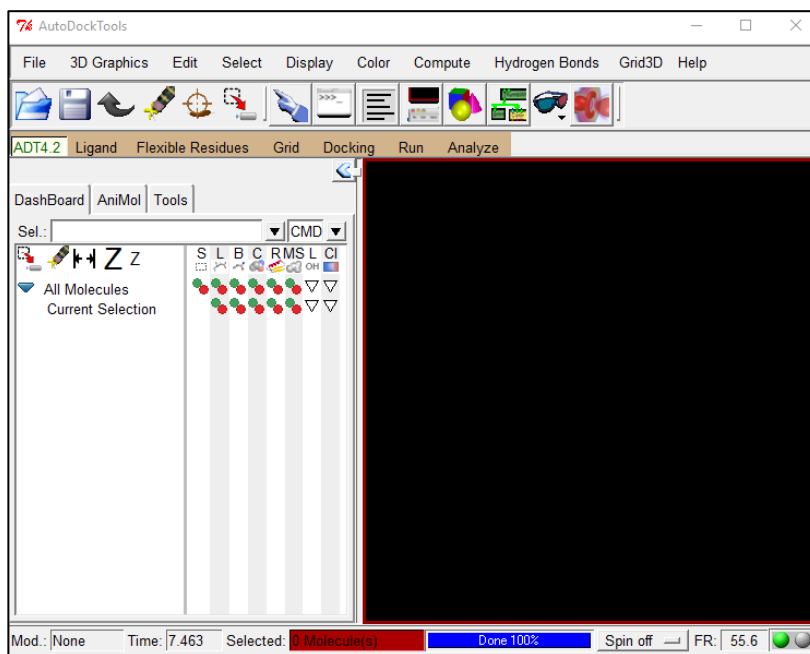


Figure 03 : Logiciel AutodockTools.

Annexes 02 :



Figure 01 : Méduse d'ADN extrait



Figure 02 : Processus d'extraction d'ADN (Le refroidissement)



Figure 03 : Dilution du pesticide

Références bibliographiques

1. ABOURICHE, M., BOUDJELLAL, A. (2019). Etude et conception d'un biocapteur basé sur la voltamétrie cyclique pour la détection enzymatique : application à la détection du glucose. Université SAAD Dahleb Blida 1, Faculté des sciences. Mémoire de Master en physique
2. ADAIKA. A. (2016). Etude et détermination des paramètres de l'Interaction de trois médicaments anticancéreux Cisplatine, Dacarbazine et Doxoleme avec de l'ADN. Université Echahid Hamma Lakhdar –El OUED. Mémoire de Master en Biochimie appliquée.
3. ADAIKA. A., LANEZ. E., Lanez. T. (2019). *In vitro* and *in silico* evaluation of anticancer activity of n,n-dimethylaminomethylferrocene. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. University of El Oued, VTRS Laboratory, B.P.789
4. AHAKOUD. M. (2015). Le séquençage d'acide désoxyribonucléique : Principe technique, indications médicales et expérience du CHU Hassane II de Fes. Université SIDI MOHAMMED BEN ABDALLAH. Thèse de Doctorat.
5. AIT MOHAMMED. K., IMADOUCHENE. S. (2017). Contribution à l'étude de l'utilisation des pesticides dans les régions de Fréha et d'Azeffoun (Tizi-Ouzou). Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. Mémoire de Master.
6. ALFORT. M. (2010). Relatif à la méthode de construction de Valeurs toxicologiques de référence (VTR) pour les substances chimiques cancérogènes. Auto-Saisine Afsset n° « 2004/AS16 ».
7. ALTERRE. B. (2009). Pesticides au quotidien ; Rapport technique.
8. AMARI. Y., BOUDEBBANE. C., LALAOUI. A. (2014). Etude génotoxicologique de l'herbicide ' ZOOM' en appliquant le test des micronoyaux. Université de Constantine 1. Mémoire de Master en Toxico en Santé.
9. Amit. K., Karuna. G., Rajeev. T., & Mulayam Singh., G. (2011). Computational interaction analysis of organophosphorus pesticides with different metabolic proteins in humans. *Journal of Biomedical research*. Doi: 10.1016/S1674-8301(11)60045-6
10. ANZIVINO. L., MONTESTRUCQ. L., DRENEAU. M. (2006). Les pesticides (Les dossiers santé -environnement de l'ors). Document réalisé par l'Observatoire Régional de la Santé Rhône-Alpes.

Références bibliographiques

11. AOUF, A. (2016). Cours de biologie moléculaire et génie génétique. Université Ferhat Abbas-Sétif 1. Destiné aux étudiants de 3e année Licence de Microbiologie.
12. Aslanoglu, M. (2006). Electrochemical and Spectroscopic Studies of the Interaction of Proflavine with DNA. Anal. Sciences , 22, 439.
13. Aslanoglu, M., Oge, N. (2005). Voltammetric, UV Absorption and Viscometric Studies of the Interaction of Norepinephrine with DNA, Turk. J. Chem. 29, 477-485.
14. ATSAMENIA. B. (2019). Etude de l'effet des paramètres de synthèse sur les propriétés des dépôts de Nickel en utilisant la méthode des plans d'expériences. Université 8 Mai 1945 Guelma. Mémoire de Master en Génie des Procédés des Matériaux.
15. AUDEBERT. M. (2013). La génotoxicité des pesticides chez les agriculteurs Évaluation de nouveaux biomarqueurs indicatifs de la génotoxicité des pesticides chez les agriculteurs. Inra, Toulouse.
16. AYAD-MOKHTARI. N. (2012), Identification et dosage des pesticides dans l'agriculture et les problèmes d'environnement liés, Laboratoire de synthèse organique appliquée (LSOA), Université d'Oran, Mémoire de Magister.
17. BATSCH. D. (2011). L'impact des pesticides sur la santé humaine. Université Henri POINCARÉ-NANCY 1. Université de Lorraine. Thèse de Doctorat en pharmacie.
18. Bayer. (2020). <https://www.algeria.cropscience.bayer.com/fr/FR/Products/Fongicides/Previcur-Energy.aspx>
19. Beatriz. P., Agustín. C., & Alfredo. M. (2019). Electrochemical (Bio)Sensors for Pesticides Detection Using Screen-Printed Electrodes. NanoBioAnalysis Group-Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería
20. BELMEHEL. N. (2019). Effets des traitements pesticides sur les composés phénoliques de la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* Var Sylvana), Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, Mémoire de Master en Biochimie appliquée.
21. BENATTIA. I., BOUAZZA. N. (2017). Cancer mammaire et la mutation BRCA1. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. Mémoire de Master en Génétique moléculaire.
22. BENBAHMED. N., OUTALEB.S.(2018). Etude comparative de quelques herbes aromatiques commercialisées en Algérie en utilisant des méthodes analytiques et chimiométriques. Université A. MIRA – BEJAIA. Mémoire de Master Génie des Procédés.

Références bibliographiques

23. BENMEBROUK. S., MOKADDAM. R. (2014). Electrodeposition et caractérisation d'oxyde de titane sur verre conducteur. Université d'El Oued. Mémoire de Master.
24. BETTICHE.F. (2017). Usages des produits phytosanitaires dans les cultures sous serres des Ziban (Algérie) et évaluation des conséquences environnementales possibles. Université Mohamed KHIDER-Biskra. Thèse de doctorat.
25. Bing. Y., Chao.Q., Xiaojie.H., Kang.X., Chao. L., Fredrick. O., Zhao. M., Yanzheng.G.(2019). Enzymatic degradation of extracellular DNA exposed to chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl in an aqueous system. *Environment International*. Vol 132. Page 2
26. BLADI. I., CORDIER. S., COUMOUL. X., ELBAZ. A., GAMET. L., LEBAILLY. P., MULTIGNER. L., RAHMANI. R., SPINOSI. J., MAELA FABRY. G. (2019). Pesticides : Effets sur la santé.
27. BOHAIN. D. (2017). Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale : le cas des études de cancérogenèse. Université de Lille 2. Mémoire de Master Ingénierie de la Santé.
28. BOUAOUD, M. (2014). Tenue à la corrosion en milieu acide d'un dépôt de Zn Sn sur acier inoxydable. Mémoire de Magister, Université Ferhat ABBAS - Sétif, Faculté de Technologie.
29. BOUCHAGRA. S. (2018). Modélisation des interactions protéine-petites molécules : étude de la relation structure – fonction dans le cas des lipases. Université BADJI Mokhtar-Annaba.Thèse de Doctorat en sciences.
30. BOUDEBIA. O., BOUTERA. S. (2017). Evaluation in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocényl-méthyltrishydroxylméthylaminométhane. Université Echahid Hamma Lakhdar –El Oued. Mémoire de Master en Biochimie appliquée.
31. BOUGUERRA, Y & BOUMAZA, N (2015). Étude de la génotoxicité du pesticide «Tilt 250» *in vivo* (*Allium cepa* test). Université 8 MAI 1945 GUELMA. Mémoire de Master.
32. BOLAND. J., KOOMEN. I., LIDTH. J., OUDEJANS. J. (2004). Les pesticides : composition, utilisation et risques. Edition 1.
33. BROSSELIN. P. (2006). Perturbateurs du système endocrinien. Afsset
34. BRUNET, A. (2015). Étude à l'échelle de la molécule unique des changements conformationnels de la molécule d'ADN. Influence de la présence de défauts locaux présents sur l'ADN et de paramètres physico-chimiques de la solution environnante. Thèse de doctorat, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier.
35. Bayer. (2006). Fiche technique de Previcur Energy.

Références bibliographiques

36. BOUNAB. N. (2011). Synthèse de nouveaux complexes de bases de Schiff de métaux de transition asymétriques de cuivre et de nickel contenant un résidu pyrrolique électropolymérisable. Université FERHAT Abbas-Setif. Mémoire de Magister en Chimie appliquée.
37. CACHOT. J., DEGREMONT. C. (2009). La génotoxicité : Quel risque pour les espèces aquatiques ?
38. CARRIER. G., LEFEBVRE. L., SAMUEL. O. (2007). Atteinte de systèmes consécutive à une exposition aux insecticides organophosphorés ou carbamates. Document d'appui à la définition nosologique direction de la toxicologie, Québec (2007).
39. C.A.S.A.P. Fiche technique de Previcur, Bayer CropScience. Lot 424 Coopérative, casap-alger2001@yahoo.com
40. CORNE. C. (2010). Etude des interactions entre protéines et lésions de l'ADN par Résonance Plasmonique de Surface par imagerie (SPRi). Université de Grenoble I. Thèse de Doctorat.
41. COUMOUL. X., JURICEK. L. (2019). Alimentation, pesticides et pathologies neurologiques. Cahiers de nutrition et de diététique 49-2 (2014).
42. DEBBACHE. M., FOUGHALI. I., MERGHID. M. (2017). Impact des pesticides utilisés dans la plasticulture sur la santé humaine en Algérie –Etude de cas la Wilaya de Constantine- Université des frères Mentouri Constantine. Mémoire de Master en Toxicologie
43. DESBIOLLES. A., GAILLOT. J. (2019). Perturbateurs endocriniens. Fiches repères : Institut national du cancer
44. Dossier découverte : Le Kit ADN Extraire au niveau moléculaire (2015).
45. Drew, H.R., Wing, R.M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura. (1981). Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. conformation and dynamics, DOI: 10.2210/pdb1bna/pdb (<https://www.rcsb.org/structure/1bna>)
46. EL HADJ SAID. K. (2016). Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. Université de Tlemcen. Mémoire de Master en chimie organique.
47. FORTUNE. A. (2006). Techniques de Modélisation Moléculaire appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance. Université JOSEPH Fourier - GRENOBLE I. Thèse de Doctorat en sciences du médicament.

Références bibliographiques

48. JAWICH.D. (2006). Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. Ecole doctorale Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés de Toulouse. Thèse de doctorat d'institut.
49. HAGUENOR. J.M., GUILLEMAUT. G., MASFARAUD. J.F., PFOHL. A., RETHER. B. (1995). Détection des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux substances génotoxiques de l'environnement.
50. HAMLAOUI. H., LAZEZIA. N., ZEDADRA. K. (2013). Optimisation d'un protocole d'extraction d'ADN d'un annélide polychète « *Perinereis cultrifera* ». Université 8 Mai 1945 Guelma. Mémoire de Master.
51. HAYO. M.G. (1997), évaluer l'impact des pesticides sur l'environnement, Courrier de l'environnement de l'INRA n°31. Station d'Agronomie, BP 507, 68021 Colmar.
52. HAZARD. (2009). The WHO recommended classification of pesticides.
53. IBRAHIM, H., OUAZINE, Y. (2014). Utilisation de la spectrophotométrie UV-visible pour l'étude de l'extraction solide-liquide du thym. Université A. MIRA-BEJAIA, Faculté de Technologie.
54. Invasion et métastase, <http://www.metastasis.icr.ac.uk> : The Metastasis Research Society (UK).
55. GHENABZIA, I. (2017). Evaluation de risques mutagènes et cancérigènes de quelques pesticides utilisés par les agriculteurs dans la région du sud algérien. Université KASDI Merbah Ouargla, Thèse de Doctorat.
56. GILBERT, RAMBO, VAN.T, BATEY. (2008). Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. *Nature Struct & Mol Biol* 15, 177.
57. GORE. A., CREWS. D., DOAN. L., MERRIL. M., PATSAUL. H., ZOTA. A. (2014). Introduction aux perturbations du système endocrinien par les substances chimiques.
58. GUEDDOU, A. et NEDJAA, K. (2017). Evaluation de la toxicité des pesticides par l'utilisation d'un biotest. Mémoire de Master, Université A. MIRA – Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
59. Jean-Loup. H. (2006). ADN : Structure Moléculaire. Genetics, Dept Medical Information, University of Poitiers, CHU Poitiers Hospital. (<http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/DNAID30001FS.html>).

Références bibliographiques

60. Kamila. M., Katarzyna. J., Sylwia. S., Radovan. M., Witold. C & Dariusz. G. (2019). Analysis and DNA interaction of the profluralin herbicide, *Environmental Chemistry*. Lett 17, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00865-1>
61. KEBAIL, S. (2018). Effet de L'utilisation des Pesticides sur L'évolution de la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* Targioni-Tozzetti, 1892 (Homoptera, Diaspididae) dans la Région de Ouargla, Université KASDI Merbah Ouargla, Faculté des sciences de la nature et de la vie.
62. KHEDDAM. N. (2012), Enquete sur la gestion des pesticides en Algérie et recherche d'une méthode de lutte alternative contre *Meloidogyne incognita* (Nematoda : *Meloidogynidae*), Ecole nationale supérieure agronomique El Harrach-Alger. Mémoire de Magister.
63. KHELEF. A. (2014). Synthèse et étude du comportement anodique de quelques N-ferrocenyl-N-phenylalkanamides et N'-ferrocenyl-N'-phenylalkanehydrazides et étude structurale de leurs phases cristallines. Université Mohamed Khider – Biskra, Thèse de Doctorat.
64. LENAERS. G., REYNIER. P., THANY. S. (2013). Neurotoxicité des pesticides, Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? Vol. 29, Médecine/sciences.
65. LOUCHAHI. M. (2015). Enquête sur les conditions d'utilisation des pesticides en agriculture dans la région centre de l'algérois et la perception des agriculteurs des risques associés à leur utilisation. Ecole nationale supérieure d'Agronomie. Mémoire de Magister.
66. LUNARDI. J. (2012). Les acides nucléiques et génomes, Chapitre 2 de Biochimie – Biologie moléculaire. Université Joseph Fourier de Grenoble.
67. MAIRIF. S. (2015). Contribution à l'étude de l'effet toxique des pesticides à usage domestique utilisé en Algérie, Université 8 Mai 1945-Guelma, Thèse de doctorat 3ème cycle en Sciences Biologiques.
68. MAMANE, A. (2015). Effets sanitaires aigus de l'exposition aux pesticides en milieu rural : Etude dans un Pays du Nord : PhytoRiv / Etude dans un pays du Sud : PhytoNiger. Université De Bordeaux, Santé publique et épidémiologie. Thèse de Doctorat.
69. MATHIVON. K. (2013). Étude théorique de l'interaction Molécule – Substrat. Université Paris-Est. Thèse de Doctorat en chimie3.
70. MEDELLEL. S., TEDJANI. A. (2018). Synthèse et étude in silico, in vitro et in vivo de l'activité biologique de dérivé N-ferrocénylméthylaniline. Université Echahid Hamma Lakhdar-El OUED. Mémoire de Master en Biochimie appliquée.

Références bibliographiques

71. 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. Université de Toulouse. Thèse de Doctorat en Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition.
72. MOHAMED, E. (2012). Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les diazines) dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et sa dégradation électrochimique. Université Ibn Zohr & Université de Reims Champagne- Ardenne, Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'AGADIR & Groupe de Spectrométrie Moléculaire et Atmosphérique de Reims.
73. MOUSTOIFA. F. (2010). Nouveaux outils moléculaires de diagnostic des étapes invasives des cancers. Université Bordeaux 1. Thèse de Doctorat e Chimie organique.
74. MORIZET. A. (2009). Risques de cancers et pesticides. Fiches repère (www.e-cancer.fr)
75. Organisation mondiale de la santé (OMS). (1991). L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique. Genève.
76. OTMANI. A., YAHIAOUI. S. (2016). Etude de la toxicité aiguë et subaiguë des Alcaloïdes de *Fumaria officinalis* sur des souris *albinos Wistar*. Université Abderrahmane Mira de Béjaia. Mémoire de Master en pharmacologie moléculaire.
77. PERIQUET. A. (2004), Pesticides, risques et sécurité alimentaire, Aprifel (Agence pour la recherche et l'information en fruit et légumes frais).
78. RAHOUI. W. (2012), Détermination de quelques paramètres biochimiques et des marqueurs du statut redox chez les agriculteurs utilisateurs de pesticides de la Wilaya de Tlemcen (région de Hennaya), Université Abou Bekr BELKAID Tlemcen, Mémoire de Master.
79. SAADANE. O. (2018). L'impact des pesticides sur l'environnement e la santé humaine et méthodes alternatives. Université Mohammed V de Rabat. Thèse de Doctorat en pharmacie.
80. SAOUD. T. (2015). Calcul computationnel des modes vibrationnels d'un dérivé de l'adénine : Adéninium hémisulfate hydrate. Université des frères MENTOURI Constantine. Mémoire de Magister en Physique.
81. SAVARY. C. (2014). Préparée à l'unité de recherche INSERM UMR 991 Foie, Métabolismes et Cancer (Pharmacie). Université de Rennes. Thèse de Doctorat.

Références bibliographiques

82. Sirajuddin, M., Saqib, Ali., Amin, Badshah. (2013). Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence, spectroscopies and cyclic voltamétrie, Elseviers, jornal of photochemistry and photobiology B: Biology science direct 124(1-19).
83. SOMMA. M. Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Module 4 : Extraction et purification de l'ADN. (WHO)
84. TUBIANA. M.(2008). Généralités sur la cancérogenèse. C. R. Biologies 331 (2008) 114–125
85. YAHIA. K.(2016). Effet de certains perturbateurs endocriniens (pesticides) sur la production chez le rat *Wistar*. Université BADJI Mokhtar- Annaba. Thèse de Doctorat en reproduction et développement.
86. Anonyme. (2013). http://ipubli-inserm.inist.fr/bitstream/handle/10608/4820/Chapitre_21.html
87. Anonyme. (2018). [https://fr.wikipedia.org/wiki/Intercalation_\(chimie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chimie))
88. Anonyme.A. (2020). https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure-1-.fr.svg?uselang=fr
89. Anonyme.B. (2020). <https://www.ozyme.fr/ressources/cyberlettres/techozyme/techozyme31-quantification-acides-nucleiques.asp>
90. Anonyme.C. (2020). <https://www.syngenta.ma/product/crop-protection/insecticide/karater-5-ec>