



N° d'ordre :

N° de série :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET
MOLECULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

**Contribution à l'étude de l'effet de la métribuzine sur la cytotoxicité et
la reproduction chez les lapines (*Oryctolagus cuniculus*)**

Présenté par: **REZZAG MOHCEN Oum Selma et SEROUTI Asma**

Soutenue le: 30 Mai 2015 devant le jury composé de:

Président	Mr	D. A. BOUTLILIS	MCB	Université D'El-Oued
Promoteur	Mr	S. DEROUICHE	MAA	Université D'El-Oued
Examinatrice	Mme	S. BOUTELIS	MAB	Université D'El-Oued
Invité	Mr	R. AHMADI	MCB	Université D'El-Oued

Année universitaire: 2014/2015

Dédicace

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que nous avons toujours eu pour vous.

Une dédicace particulière et sincère à notre directeur M^R

DEROUICHE SAMIR.

A la mémoire de ma chère amie CHAIEB IMEN; que je souhaite que Dieu ait pitié.

A mon père SEROUTI LAZHAR; ma mère BOUAMRA DJAMILA (HAYET); mes frères et mes sœurs SEROUTI IBRAHIM, LAZHERI, BELKASSIM, KARIM, WAFA, HANA, KHADIDJA, CHAIMA, DONIA, et mon oncle BABA SALEH, à LAMOUDI WALID; tes sacrifices, tes soutiens moral et matériel, tes gentillesse sans égal, tes profond attachement m'ont permis de réussir mes études...

ASMA.

A mon père REZZAG MOHCEN Med DJAMEL; ma mère REZZAG LOBZA FATMA ZAHRA; mes frères et mes sœurs REZZAG MOHCEN SALEM, OUM EL-FADEL, NASSIBA, OUSSAMA, AICHA, ASMA, MARIA; et ma grand-mère DADA SAEDIA; sans tes aides, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour; et malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur, à mon oncle REZZAG LOBZA YUCEF et son famille. Je vous dédie ce travail...

OUM SELMA.

Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.



Remerciements

Avant tous nous remercions ALLAH tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir cette étude.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Mr DEROUCHE SAMIR qui n'a pas cessé de nous donner les conseils et les bonnes orientations et nous prive pas de son temps.

Nos vifs remerciements vont également aux: Dr AHMADI Md RIDA, Dr REBIEI ABDELKERIME, Dr BEN BORDI YAKOUB, Dr ZOUBAIDI YACINE, M^R TLIBA ALI et aussi on remercie tous les personnages de laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie d'UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED et de laboratoire de recherche VTRS, CP 789, Faculté des sciences et de la technologie d'UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED, et de laboratoire d'établissement hospitalier spécialisé BEN NACER BACHIR d'EL-OUED.

Enfin, nous remercions NOS FAMILLES qui nous ont donnés toute l'aide et tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation d'étude.

Résumé

L'alimentation est une source importante d'exposition des consommateurs aux pesticides qui sont associés à l'apparition des diverses pathologies. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'exposition de façon sub-chronique de la métribuzine (couramment utilisés pour le traitement phytosanitaire) sur la toxicité et la reproduction chez les lapines. Notre expérimentation a été réalisée chez quinze lapins pesant entre 1,2-2,2 kg ont été divisés en trois groupes de 5 animaux chacun; le premier groupe n'a exposé à aucun pesticide, le deuxième groupe a contaminé à la métribuzine par une dose quotidienne de 6,44 mg/kg et le troisième groupe a contaminé à la métribuzine par une dose quotidienne de 3,22 mg/kg pendant deux mois avec l'eau de boisson. A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable de poids corporel des lapines contaminés à la métribuzine et une augmentation du poids absolu et relatif des organes prélevés (foie, cœur, ovaire et rein). Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, l'activité sérique de TGO et TGP chez les lapines contaminés à la métribuzine dose 1 et 2 par rapport aux animaux témoins. Alors que, la concentration de l'estradiol, a été diminués et pas de variation pour l'urée et créatinine. Les résultats obtenus révèlent également une toxicité hématologique chez les lots contaminés à la métribuzine dose 1 et dose 2, avec une élévation de nombre des globules blancs, le nombre de lymphocyte et les plaquettes avec une diminution du taux de la concentration d'hémoglobine pendant la contamination à la métribuzine. En outre, la contamination par la métribuzine a augmenté le stress oxydatif qui traduit par une augmentation de la teneur hépatique, rénale myocardique et ovarienne de malondialdéhyde (MDA), de l'activité du glutathion-S-transférase (GST) et de taux du glutathion réduit (GSH). Aussi, les résultats ont montré clairement des altérations de structures des tissus étudiés en comparaison avec les témoins, avec une inflammation rénale. La métribuzine affecte la reproduction des lapines par l'infertilité et la toxicité fœtale et par fois la mort des lapines gestantes. En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition à la métribuzine aux faibles concentrations a des effets toxiques sur plusieurs organes et aussi affecte la reproduction et le développement fœtale. Par conséquent, les pesticides pourraient être considérés comme source de développement de plusieurs pathologies émergées dans notre région dont le cancer, l'hépatite et l'infertilité féminine.

Les mots clé: métribuzine, cytotoxicité, reproduction, stress oxydatif, *Oryctolagus cuniculus*.

SOMMAIRE

Introduction	
PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I: LES PESTICIDES	
I. Définition.....	3
II. Historique.....	3
III. Classification.....	3
1. Classification biologique	3
2. Classification selon le mode d'action.....	4
3. Classification selon la nature.....	5
3.1. Les bio-pesticides.....	5
3.2. Les produits chimiques.....	5
IV. La métribuzine.....	7
1. Définition.....	7
2. Propriétés chimiques.....	7
3. Toxicité.....	8
V. Estimation de la répartition des pesticides utilisés en agriculture.....	8
VI. Valeurs toxicologiques des pesticides	8
1. La dose maximale sans effet nocif observable (DMSENO).....	8
2. La dose minimale pour un effet nocif observable (DMENO).....	9
3. La dose journalière admissible (DJA).....	9
4. La limite maximale de résidus (LMR).....	9
5. Dose de référence aigue (DRfA ou ARfD).....	9
6. La dose maximale tolérée (DMT).....	10
VII. Métabolisme des pesticides.....	10
VIII. Les effets des pesticides sur l'environnement.....	12
IX. Les effets des pesticides sur la santé.....	13
1. Mode d'exposition des pesticides.....	13
1.1. Exposition professionnelle.....	13
1.2. Exposition non professionnelle.....	13

2. Effets sur la santé humaine.....	14
3. Effets sur la fertilité et la reproduction.....	14
4. Effet cancérogène des pesticides.....	15
5. Effets sur le système endocrinien.....	15
Chapitre II: LE STRESS OXYDATIF	
I. Définition.....	16
II. Espèces réactives de l'oxygène.....	16
1. Définition et types.....	16
2. Sources des espèces réactives oxygénées.....	17
2.1. Sources endogènes.....	17
2.2. Sources exogènes.....	18
3. Action biologique des radicaux libres oxygénés.....	19
4. Rôles pathologique des espèces actives de l'oxygène.....	19
4.1. Les membranes.....	19
4.2. Les protéines.....	20
4.3. Les acides nucléiques.....	21
III. Le système de défense des anti-axydants.....	22
1. Le système enzymatique.....	22
2. Le système non enzymatique.....	23
IV. L'effet de stress oxydatif sur la reproduction et le développement embryonnaire.....	24
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	
Chapitre I : MATERIELS ET METHODES	
I. Matériels.....	25
1. Matériels animal.....	25
1.1. Entretien des animaux.....	25
1.2. Elevage et mesure du poids.....	25
1.3. Traitement des animaux.....	25
1.4. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes.....	26
2. Produits et réactifs.....	27
3. Matériels de laboratoire.....	28
II. Méthodes.....	28

1. Méthode de dosage hématologique.....	28
2. Méthode de dosage de la glycémie.....	28
3. Méthode de dosage d'estradiol.....	28
4. Méthode de dosage d'urée sérique.....	28
4.1. Principe de la méthode.....	28
4.2. Réactifs.....	29
4.3. Procédure.....	29
5. Méthode de dosage de créatinine.....	29
5.1. Principe de la méthode.....	29
5.2. Réactifs.....	30
5.3. Procédure.....	30
6. Mesure de l'activité d'aspartate aminotransférase GOT (ASAT).....	30
6.1. Principe de la méthode.....	30
6.2. Réactifs.....	31
6.3. Procédure.....	31
7. Mesure de l'activité d'alanine amino transférase GPT (ALAT).....	31
7.1. Principe de la méthode.....	31
7.2. Réactifs.....	31
7.3. Procédure.....	32
8. Méthode de Dosage des protéines tissulaires.....	32
8.1. Principe.....	32
8.2. Préparation de la solution de travail.....	32
8.3. Mode opératoire.....	32
9. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH) tissulaire.....	33
9.1. Principe.....	33
9.2. Mode opératoire.....	33
10. Mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs) tissulaire.....	34
10.1. Principe.....	34
10.2. Mode opératoire.....	34
11. Méthode de dosage de malondialdéhyde (MDA) tissulaire.....	34
11.1. Principe.....	34

11.2. Réactifs.....	35
11.3. Mode opératoire.....	35
11.4. Expression des résultats.....	35
12. Analyse tissulaire par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	35
13. Analyse histologiques.....	35
13.1. Le prélèvement d'échantillon.....	35
13.2. La préparation des blocs des tissus.....	36
13.3. La coupe.....	36
13.4. La coloration.....	36
13.5. Le montage.....	37
13.6. Microscope + compte rendu.....	37
III. Méthode d'analyse statistique.....	37
Chapitre II: RESULTATS ET DISCUSSION	
I. Résultats.....	38
1. Effet de la métribuzine sur les poids corporels et poids relatifs des organes, et la consommation.....	38
2. Effet de la métribuzine sur des paramètres de reproduction.....	42
3. Effet de la métribuzine sur des paramètres biochimiques et hormonaux.....	42
4. Effet de la métribuzine sur des paramètres de stress oxydatif tissulaires.....	46
5. Effet de la métribuzine sur des paramètres hématologiques.....	53
6. La détection de la métribuzine au niveau des cellules hépatiques des lapins et des fœtus chez les lots traités.....	56
7. Etude histologique.....	61
II. Discussion.....	63
Conclusion et perspectives.....	69
Références bibliographiques.....	70
Annexes.....	81

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Structure de métribuzine	07
2	Processus de détoxification et de biotransformation des xénobiotiques	10
3	Différents types de récepteurs des xénobiotiques	11
4	Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides	13
5	Espèces oxygénées réactives et systèmes antioxydants cellulaires	16
6	Principales sources des espèces réactives de l'oxygène et enzymes antioxydantes	18
7	Représentation schématique des cibles biologiques au cours du processus de stress oxydant	19
8	Peroxydation lipidique, réactions des radicaux libres, et les maladies humaines	20
9	Attaque radicalaire aux protéines	21
10	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	21
11	Les systèmes impliqués dans la défense oxydative	22
12	Action de SOD et GPx à l'attaque radicalaire	23
13	Schéma récapitulatif de protocole expérimental	27
14	Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines	35
15	Evolution du poids par semaine chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	39
16	Evolution de gain de poids chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	39
17	Evolution du poids relatif de foie chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	40
18	Evolution du poids relatif des reins chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	40
19	Evolution du poids relatif de cœur chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	41

20	Evolution du poids relatif d'ovaire chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	41
21	Variation de la concentration sérique du glucose chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	43
22	Variation de la concentration d'urée chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	43
23	Variation de la concentration sérique de créatinine chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	44
24	Variation de l'activité de TGO chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	44
25	Variation de l'activité de TGP chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	45
26	Variation de la concentration plasmatique d'estradiol chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	45
27	Variation de la concentration de MDA hépatique chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	46
28	Variation de la concentration de MDA rénale chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	47
29	Variation de la concentration de MDA myocardiques chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	47
30	Variation de la concentration de MDA ovarienne chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	48
31	Variation de la concentration de GSH hépatique chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	49
32	Variation de la concentration de GSH myocardiques chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	49
33	Variation de la concentration de GSH rénale chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	50
34	Variation de la concentration de GSH ovarienne chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	50
35	Variation de l'activité de GST hépatique chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	51
36	Variation de l'activité de GST rénale chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	52

37	Variation de l'activité de GST myocardiques chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	52
38	Variation de l'activité de GST ovarienne chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	53
39	Variation de nombre de lymphocytes chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	54
40	Variation de nombre des globules blancs chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	54
41	Variation de nombre des globules rouges chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	55
42	Variation de taux d'hémoglobine chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	55
43	Variation de nombre de plaquette chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine	56
44	Chromatogramme de la métribuzine	57
45	Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 1 (groupe 1)	57
46	Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 2 (groupe 1).	58
47	Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 3 (groupe 1)	58
48	Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 1 (groupe 2)	59
49	Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 2 (groupe 2)	59
50	Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 3 (groupe 2)	60
51	Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de fœtus de lapine 3 (groupe 1)	60
52	Coupe histologique du rein de lapine traité par 6,44 mg/kg de la métribuzine.	61
53	Coupe histologique du rein de lapine traité par 3,22 mg/kg de la métribuzine.	61
54	Coupe histologique du rein de lapine de GT.	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Exemples des biopesticides	05
2	Les effets néfastes des pesticides sur l'environnement	12
3	Principaux radicaux libres et comparaison de leur pouvoir oxydant	17
4	Composition de l'alimentation utilisée	25
5	Variation du poids corporel (g) et poids relatif (g/100g) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire), et de quantité d'alimentation (g) et de l'eau de boire (ml) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement	38
6	Variation des paramètres de reproduction chez les lapins témoins et traités par la métribuzine	42
7	Concentration des paramètres biochimiques et hormonale chez les lapins témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement	42
8	La concentration de Malondialdéhyde (MDA) ($\mu\text{mol/g}$ tissus) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement	46
9	Concentration de Glutathion réduit (GSH) (nmol/mg protéine) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement	48
10	Activité de Glutathion S-Transférase (GST) (nmol/min/mg protéine) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement	51
11	Variation des paramètres hématologiques chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement	53
12	Variation des temps de rétention (min) et de surface de pic (mV) de la métribuzine détecté dans les hépatocytes des lots traités par la métribuzine	56

LES ABREVIATIONS

- 2,4-D:** Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique
- ACTH:** Adrénocorticotrope hormone
- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- AGE:** Produit de Glycation Avancée
- AGPI:** Acides Gras Polyinsaturés
- AhR:** Aryl Hydrocarbon Receptor
- ALAT:** Alanine Amino Transférase
- ARN:** Acide ribonucléique
- ASAT:** Aspartate amino Transférase
- BPC:** Biphényles Polychlorés
- BSA:** Albumine Sérique Bovine
- CAR:** Constitutive Androstane Receptor
- Circ:** Centre international de recherche sur le cancer
- CRH:** Corticolibérine
- CYPs:** Cytochromes P450
- DDT:** Dichlorodiphényltrichloroéthane
- DJA:** Dose Journalière Admissible
- DL₅₀:** Dose létale 50
- DMENO:** Dose Minimale Pour Un Effet Nocif Observable
- DMSENO:** Dose Maximale Sans Effet Nocif Observable
- DMT:** Dose Maximale Tolérée
- DRfA:** Dose de Référence Aigue
- DRO:** Dérivés Réactifs de l'Oxygène
- DSENO:** Dose Sans Effet Négative Observable
- EOA:** Espèces Oxygénées Actives
- EPO:** Erythropoïétine.
- ERN:** Espèces Réactives de l'Azote
- ERO:** Espèces Réactives de l'Oxygène
- ES:** Ecart-Types
- FAO:** Food and Agriculture Organization
- FSH:** Hormone Folliculo-Stimulante
- GB:** Globules Blancs
- GLDH:** Glutamate Déshydrogénase

GOT: Glutamate Oxaloacétique
GPT: Transaminase Glutamique Pyruvique
GPX: Glutathione Peroxydase
GR: Glutathion Réductase
GSH: Glutathion Réduit
GSH-Px: Glutathion Peroxydase
GSSG: Glutathion Oxydé
GST: Glutathion S-Transférase
H₂O₂: Peroxyde d'Hydrogène.
HB: Hémoglobine.
HCL: Chlorure d'Hydrogène.
HOCl: Acide Hypochloreux.
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography.
JMPR: Réunion conjointe FAO/OMS sur les résidus de pesticides
LDH: Lactate Déshydrogéné.
LDL: Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéines de basse Densité)
LH: Hormone Lutéinisante
LIPOX: Lipo-Peroxydation
LMR: Limite Maximale de Résidus
LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level
LYM: Lymphocytes
MDA: Malondialdéhyde
MDH: Malte Déshydrogénase
mg/kg: Milligrammes/kilogrammes
mm Hg: Millimeter de Mercure
MRP: Multidrug Resistance-associated Proteins
NAD⁺: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduite
NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NH₃: Ammoniac
NOAEL: No Observed Adverse Effect Level.
O₂⁻: Anion Superoxide
OH[·]: Radical Hydroxyl
OMS: Organisation Mondiale de Santé.
P-gp: P-glycoprotein

PIP: Produits Phytosanitaires Incorporé

PLA: Plaquette

ppb: parts per billion (partie par milliard)

ppm : partie par million

PXR: Pregnancy X Receptor

R*: Radicaux Libres

RDL: Radicaux Libres

RLO: Espèces Réactives de l'Oxygène

ROO[•]: Radicaux peroxyde

ROS: Espèces Réactives de l'Oxygène

SOD: superoxydes dismutases

TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances

UI: Unité national

UV: Ultra-Violet

VTR: Valeur Toxicologique de Référence

Introduction

Le terme ‘‘pesticide’’ est utilisé pour désigner les produits chimiques agricoles utilisés à des fins phytosanitaires. Un pesticide est une substance qui est sensée prévenir, détruire, repousser ou contrôler tout ravageur animal et toute maladie causée par des micro-organismes ou encore des mauvaises herbes indésirables (BOLAND *et al.*, 2004). Les pesticides représentent, de loin, les composés xénobiotiques les plus systématiquement introduits dans l'environnement et les plus largement utilisés sur les cultures les plus variées (AMIARD., 2011). Les pesticides agricoles contribuent à augmenter la productivité agricole, mais posent dans le même temps des risques potentiels pour la santé humaine et l'environnement (OECD., 2008). L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent plus grandes quantités de pesticides, dont l'Association Algérienne pour la protection de l'environnement tire la sonnette d'alarme «L'Algérie est un grand consommateur de pesticides: 30000 tonnes sont épandues chaque année » (CHIALI., 2013).

Chaque aliment est susceptible de contenir différents résidus de pesticides (AMIARD., 2011). Le contrôle sanitaire des produits alimentaires occupent une place importante dans le programme des activités du Comité de santé publique de l'Accord partiel dans le domaine social et de la santé publique (COUNCIL OF EUROPE., 1992). Les limites pour les résidus de pesticides présents dans les aliments devraient être subordonnées au contrôle et devraient tenir compte des limites internationales maximales recommandées pour les résidus de pesticides élaborées par la Commission du Codex Alimentarius (FAO., 2001).

Les pesticides peuvent être très nocifs, et ils sont soupçonnés de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement en s'accumulant dans les écosystèmes. Ils sont en effet fréquemment mis en cause dans la dégradation de la qualité des eaux douces souterraines et des eaux côtières, de l'air et du sol, dans la réduction de la biodiversité terrestre constatée dans les zones agricoles et dans les milieux naturels contaminés ou bien encore dans des cas de surmortalité des abeilles et de baisse de production des ruches (INRA-CEMAGREF., 2005). L'accès des pesticides aux structures vivantes est soit volontaire (toxicologie expérimentale, suicide) soit involontaire (exposition accidentelle). On distingue généralement 3 modes principaux d'accès; inhalation (cas de vapeurs, aérosols), contact (application topique) (peau, muqueuses), ingestion (voie orale) (spontanée ou forcée, y compris les actes criminels) (BOUNIAS., 1999). Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle des pesticides et l'apparition de certaines pathologies dans les populations concernées. Des effets cancérogènes,

neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne, des problèmes d'infertilité ou encore du système immunitaire affaibli sont plus fréquents chez eux (ALAVANJA *et al.*, 2004; ASCHERIO *et al.*, 2006; BALDI et LEBAILLY., 2007).

L'exposition aux pesticides est l'un des facteurs de risque qui favorise l'augmentation du stress oxydatif en produisant des radicaux libres oxygénés. Ce risque du stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de la plupart des voies pathologiques (BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 1997). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres résultant du métabolisme de l'oxygène. Ils sont constamment générés à l'intérieur de cellules suite à l'exposition aux xénobiotiques dans notre environnement ambiant (KEBIECHE., 2009). Les ERO peuvent endommager la structure des macromolécules (acides nucléiques, protéines, lipides, hydrates de carbone), générer de nouveaux produits oxydants, provoquer de la toxicité cellulaire et des mutations génétiques (MASSART., 2011).

L'objectif de ce travail est l'évaluation de la cytotoxicité et l'effet des pesticides sur la reproduction chez les lapines en utilisant des marqueurs biochimiques, hématologiques, histologique et de stress oxydant. A cette fin ,nous étudierons tout d'abord la métribuzine choisis comme modèle des pesticides.



Partie I

Etude bibliographique



Chapitre I
Les pesticides

I. Définition

Les pesticides sont des produits chimiques complexes que l'on utilise en agriculture (ANSAY., et THILL., 1990), détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies des humaines ou animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou le commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et d'autres parasites dans ou sur leur corps (COUNCIL OF EUROPE., 1992). Les pesticides sont des substances qui possèdent une activité biologique qui agit sur diverses fonctions physiologiques et entraîne le plus souvent la mort de l'organisme vivant qui a pu l'absorber (CALVET *et al.*, 2005).

II. Historique

L'utilisation des substances chimiques pour réaliser le contrôle de la végétation remonte à plus d'un siècle, c'est en Allemagne, vers les années 1850, que la première substance herbicide voit le jour, un mélange de sel et de jus de lime était alors utilisé. Il a fallu ensuite plusieurs décennies avant de voir apparaître de nouveaux produits chimiques pour contrôler la végétation (FORTIER *et al.*, 2005). En outre, en 1896, les premiers herbicides sélectifs, sulfate de fer, a été trouvé pour tuer les mauvaises herbes à feuilles larges. Ensuite, en 1944, fait la première hormone à base herbicide 2,4-D disponibles (JESSE UNEKE., 2007). A la fin des années 1960, le premier cas de résistance à un herbicide est signalé et en 1968, les expressions "système de gestion intégrée des ravageurs" et "révolution verte" sont employées pour la première fois. A partir des années 1950 jusqu'à aujourd'hui, l'industrie chimique synthétise de nombreux nouveaux pesticides (DEGUINE *et al.*, 2008).

III. Classification

Il existe trois façons de classer les pesticides: par leurs usages, par les organismes vivants visés et par leurs natures, les trois sont utiles mais ne répondent pas aux mêmes préoccupations (CALVET *et al.*, 2005).

1. Classification biologique

Les pesticides peuvent être classés sur la base de leurs objectifs de ravageurs visés. Ces catégories sont décrites ci-dessous (FREEDMAN., 1995):

- 1- Les fongicides sont utilisés pour protéger les plantes et les animaux cultures de champignons.
- 2- Les herbicides sont utilisés pour tuer les plantes adventices, de manière à libérer des plantes cultivées souhaitées de la concurrence.
- 3- Les insecticides sont utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les vecteurs de maladies humaines mortelles telles que le paludisme, la fièvre jaune, trypanosomais, la peste et le typhus.
- 4- Les acaricides sont utilisés pour tuer les acariens, qui sont nuisibles en agriculture, et les tiques, qui peuvent transporter l'encéphalite de l'homme et des animaux domestiques.
- 5- Les molluscicides sont utilisés contre les escargots et les limaces, qui peuvent être importants ravageurs des plantations d'agrumes et de jardins de légumes et de fleurs.
- 6- Les nématicides sont utilisés pour tuer les nématodes, qui peuvent être importants parasites des racines des plantes cultivées.
- 7- Les rodenticides sont utilisés pour lutter contre les rats, les souris, les gaufres et autres rongeurs nuisibles de l'agriculture de l'habitation humaine.
- 8- Les avicides sont utilisés pour contrôler les oiseaux, qui sont parfois considérés comme des ravageurs dans l'agriculture.

2. Classification selon le mode d'action

Les pesticides peuvent également être classés en fonction de leur mode d'action sur les organismes nuisibles comme suit (JESSE UNEKE., 2007):

- **Large spectre:** Tue large éventail de parasites, habituellement référence à des insecticides, des fongicides et des bactéricides.
- **Contactez-poison:** Tue par l'agent de contrôle.
- **Désinfectant (curative):** inhiber la germination des graines de mauvaises herbes, les spores de champignons, et les spores bactériennes.
- **Non sélective:** Tue large éventail d'organismes nuisibles et/ou des plantes cultivées, généralement utilisés en référence aux herbicides.
- **Nerve poison:** interfère avec le fonctionnement du système nerveux.
- **Protecteur:** protège les cultures s'elle est appliquée avant pathogènes infectent la culture.

- **Répulsif:** Repousse les ravageurs des cultures ou interférer avec des ravageurs ont la capacité de localiser les cultures.
- **Systémique:** Absorbée et traduit dans toute l'usine pour fournir une protection.
- **Estomac poison:** Tue après l'ingestion par un parasite.

3. Classification selon la nature

Les pesticides sont classés en deux grandes catégories des bio-pesticides toxiques traditionnels et des produits chimiques (JESSE UNEKE., 2007).

3.1. Les bio-pesticides

Parmi les méthodes de lutte biologique, les bio-pesticides (tableau 1) occupent une place de choix car ils se prêtent souvent à la production de masse requise pour l'industrie et ils s'appliquent avec un pulvérisateur conventionnel ce qui en facilite l'adoption par les producteurs agricoles. Ils sont généralement compatibles avec des méthodes de lutte biologique classiques (ex. lâchers de prédateurs ou de parasites), même s'ils peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes utiles. Les bio-pesticides peuvent être à base de bactéries, champignons, virus, nématodes et d'extraits de plantes (VINCENT *et al.*, 2000).

Tableau 1: Exemples des biopesticides (VINCENT *et al.*, 2000).

Bactéries entomopathogènes	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Mycopesticides	<i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>M. flavoviride</i> <i>Beauveria bassiana</i> , <i>B. brognardtii</i> , etc.
Virus entomopathogènes	Baculovirus (carpovirusine)
Bioherbicides	<i>Colletotrichum</i> sp (Waage, 1995)
Microorganismes antagonistes de maladies	<i>Trichoderma viridae</i> ; <i>Gliocladium</i> sp; <i>Pseudomonas</i> sp.
Nématodes entomopathogènes	Genres <i>Steinernema</i> et <i>Heteroabditis</i>

Les bio-pesticides peuvent être classés en six groupes qui comprennent: (i) les plantes, (ii) produits phytosanitaires incorporé (PIP), (iii) les pesticides biochimiques, (iv) les régulateurs de croissance des insectes, (v) les pesticides microbiens et (vi) les produits de fermentations (avermectines) (JESSE UNEK ., 2007).

3.2. Les produits chimiques

3.2.1. Les pesticides inorganiques

Les pesticides inorganiques ne contiennent pas de carbone dans le cadre de leur composition chimique. Ces composés ont généralement des poids moléculaires relativement faibles et contiennent souvent moins de 10 atomes. Plusieurs sels inorganiques (souvent blancs et cristallins) sont classés dans cette catégorie de pesticides. Quelques pesticides

inorganiques ont été utilisés pendant plus de 1000 ans, mais leur utilisation considérablement augmenté de 1850 à 1950. La popularité de nombreux pesticides inorganiques diminués après le développement de pesticides organiques plus efficaces et moins persistants (PIMENTEL., 2002).

3.2.2. Les pesticides organo-métalliques

Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal tel que le zinc et le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate. Des exemples de ces pesticides sont le mancozèbe (avec le zinc) et le manèbe (avec le manganèse) (CALVET *et al.*, 2005).

3.2.3. Les pesticides organiques

Les composés organiques ont une structure à base d'atomes de carbone combinés avec de l'hydrogène et d'autres éléments. Le pétrole et le gaz sont actuellement la source de 90% des composés organiques produits et ont, en grande partie, remplacé le charbon ainsi que les matières premières employées précédemment, qu'elles soient d'origine végétale ou animale (STELLMAN., 2000b). Les pesticides organiques de synthèse peuvent être séparés en groupes en fonction de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires (CHIALI., 2013). On distingue comme principales familles:

- **Les organochlorés:** Les pesticides organochlorés comprenant les composés aromatiques comme le DDT (bis(4-chlorophényle)-1,1,1-trichloroéthane) et les cyclodiènes comme la dieldrine. Parmi les organochlorés; le lindane, biphényles polychlorés (BPC) (STELLMAN., 2000b).
- **Les organophosphorés:** La grande échelle de synthèse et l'évolution des esters d'acide phosphorique sont étroitement associées à leur rôle comme insecticides en protection des cultures, en particulier après la Seconde Guerre mondiale. Petits stocks de gaz de deux de guerre potentiel serine et tabun ont été transformées en armes et cela a conduit à l'identification des composés comme insecticides, parce qu'ils étaient plus mortelle pour les insectes que pour les humains (DIKSHITH., 1990).
- **Pyréthrinoïdes de synthèse et les carbamates:** Les pyréthrinoïdes de synthèse sont des analogues stables de dérivés naturels du pyrèthre. Elles représentent actuellement 30% du marché mondial, et sont utilisées comme phytosanitaires, insecticides ménagers et antiparasitaires vétérinaires et humains. Les carbamates sont agi là d'un groupe chimique très important du point de vue phytosanitaire puisqu'on y trouve à la fois des insecticides, des fongicides et des herbicides (BARRIOT., et DANEL., 1999).

- **Les organoazotés:** principalement utilisés comme herbicides (Exemple: atrazine, simazine, triazine, etc...) (CHIALI., 2013). Au suivant, on a présenté le triazine-métribuzine.

IV. La métribuzine

1. Définition

Les herbicides de type triazine peuvent être divisés en quatre classes structurales différentes; chlorotriazine, méthylthiotriazines, méthoxytriazines et triazines atypiques ou asymétriques. Le groupe de chlorotriazine comprend; atrazine, simazine, propazine, terbuthylazine et cyanazine. Le groupe méthylthiotriazine comprend l'amétryne, la prométryne, et terbutryne. Le groupe de méthoxytraizine comprendra prometon et secbuméton. Hexazinone et métribuzine ont été choisis pour représenter le groupe de triazine atypique (McFARLAND *et al.*, 2011).

2. Propriétés chimiques

La métribuzine est un membre du groupe comme triazinone substitué d'herbicides. Leur activité est due à une interférence avec le transport des électrons de photosystème II dans les chloroplastes des plantes. Le métabolisme de la métribuzine dans les plantes a été l'objet de nombreuses études à court terme et à long terme datant du début des années 1970 (ARCHIBALD AULD., et WILLIAM MEDD., 1987). La métribuzine (4-amino-6(1,1-diméthyléthyl)-3-(méthylthio)-1,2,4-triazine-5(4H) one) (figure 1), est un solide cristallin blanc avec une pression de vapeur de $1,2 \cdot 10^{-7}$ mm Hg à 20°C, une solubilité dans l'eau de 1100 mg/l (ppm) à 20°C, ce qui rend mobiles dans le sol, un sol demi-vie de 30 à 60 jour, et une DL₅₀ orale (rat) de 1090 mg/kg (MONACO *et al.*, 2002). La métribuzine a une toxicité orale aiguë (mammifère) modérée (DL50 322 mg / kg de poids corporel) et une faible cutanée et la toxicité par inhalation (DL50 > 5000 mg / kg de poids corporel et CL50 > 2,0 mg / L, respectivement) (EFSA., 2006). La métribuzine est relativement stable et non soumis à photo-décomposition UV (MONACO *et al.*, 2002).

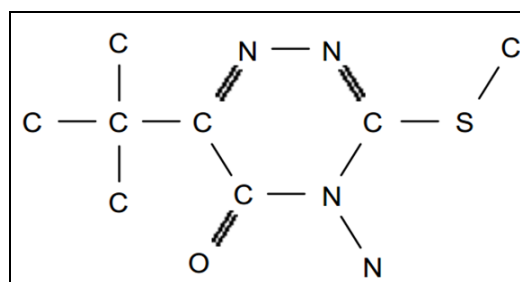


Figure 1: Structure de métribuzine (MORGAN., 2001).

3. Toxicité

La métribuzine expose des différents effets nocifs (POHANISH., 2012):

-L'exposition à court terme: la métribuzine peut vous affecter quand respiré et en passant par votre peau. L'intoxication aiguë peut causer la respiration et de la somnolence difficile. Expositions élevées peuvent provoquer des maux d'estomac, la fatigue et la dépression du système nerveux central, provoquant une mauvaise coordination, des tremblements et une faiblesse. Humaine Tox = 200,00000 ppb (très faible).

-L'exposition à long terme: forte exposition ou autre répétée peut provoquer des modifications des enzymes hépatiques, le goitre, et peut affecter la fonction thyroïdienne.

-Points d'attaque: système nerveux central, de la thyroïde, du foie.

V. Estimation de la répartition des pesticides utilisés en agriculture

Les pesticides à usage agricole représentaient en 2005 un marché mondial d'environ 31 millions de dollars répartis pour 29% en Europe, 25% en Amérique du nord, 17% en Amérique latine et 25% en Asie. Au niveau mondial, 47% des pesticides utilisés sont des herbicides, 25% des insecticides et 24% fongicides (LEBAILLY *et al.*, 2007). L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent les plus grandes quantités de pesticides, dont l'Association Algérienne pour la protection de l'environnement tire la sonnette d'alarme «L'Algérie est un grand consommateur de pesticides: 30000 tonnes sont épandues chaque année» (CHIALI., 2013). Dans la wilaya d'El-Oued, les quantités de pesticides utilisés augmentent régulièrement avec l'expansion des champs de cultivassions (GHENABZIA., et TOUHAMI., 2014).

VI. Valeurs toxicologiques des pesticides

1. La dose maximale sans effet nocif observable (DMSENO)

Pour presque tous les types d'effets toxiques (organospécifiques, neuro-comportementaux, immunologiques, cancérogènes épigénétiques...), on estime généralement qu'il existe une dose ou une concentration en dessous de laquelle aucun effet indésirable ne se produit: il existe un seuil de toxicité. L'objectif est alors de déterminer la dose ou la concentration en dessous de laquelle la probabilité de survenue de l'effet critique sera en théorie nulle: la dose maximale sans effet nocif observable (DMSENO ou NOAEL en anglais pour No Observed Adverse Effect Level). Plus précisément, elle correspond à la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe pas d'augmentation statistiquement (ou biologiquement) significative en fréquence ou en sévérité d'un effet nocif, dans un groupe exposé à la substance par rapport à

un groupe non exposé (BONVALLOT., et DOR., 2002). Le NOAEL de la métribuzine est <30ppm (McMAHON., 1993).

2. La dose minimale pour un effet nocif observable (DMENO)

L'étude expérimentale ne permet pas toujours d'avoir accès à ce NOAEL. Il est alors proposé de déterminer la dose ou la concentration théoriquement la plus faible pour laquelle un effet indésirable est observé. C'est la dose minimale pour un effet nocif observable (DMENO ou LOAEL en anglais pour Lowest Observed Adverse Effect Level). Plus précisément, elle correspond à la plus faible dose de substance pour laquelle on constate une augmentation statistiquement (ou biologiquement) significative en fréquence ou en sévérité d'un effet nocif observé dans le groupe exposé par rapport au groupe non exposé (BONVALLOT., et DOR., 2002). Le LOAEL de la métribuzine est = 30 ppm (McMAHON., 1993).

3. La dose journalière admissible (DJA)

La DJA est usuellement rapportée au kilo de poids corporel. C'est la dose de la substance susceptible d'être absorbée en une journée et par kilo de poids corporel par un individu sans entraîner d'effets toxiques, même si l'absorption a lieu quotidiennement toute la vie (LEYRAL., et VIERLING., 2007). Elle apparaît comme comportant le moins de risques pour la santé du consommateur, la DJA étant fondée sur tous les faits connus au moment de l'évaluation du produit par la Réunion conjointe FAO/OMS sur les résidus de pesticides (JMPR). Elle est exprimée en milligrammes par kilogramme de poids corporel (FAO., 1994). La DJA pour la métribuzine a été établie à 0,013 mg/kg de poids corporel/jour (EFSA., 2006).

4. La limite maximale de résidus (LMR)

Limite maximale Codex pour les résidus de pesticides (LMR), la concentration maximale du résidu d'un pesticide (exprimée en mg/kg) que la Commission du Codex Alimentaire recommande d'autoriser officiellement dans ou sur des produits alimentaires ou des aliments pour animaux (FAO., 1994). La LMR pour la métribuzine a été établie à 0.6 ppm pour la pomme de terre, et de 0.1 ppm pour la tomate (PMRA., 2013).

5. Dose de référence aiguë (DRfA ou ARfD)

Est pour le risque de court terme (un repas, un jour). L'évaluation de l'exposition aiguë ne concerne pas tous les pesticides (INRA., 2008). L'évaluation des risques aigus pour les substances ayant un seuil de toxicité repose sur des VTR communément appelées doses de références aiguës (ARfD) (RETY., 2013). La DARf pour métribuzine est de 0,02 mg/kg de

poids corporel/jour, basée sur la DSENO de 2 mg/kg pc/j de l'étude sur la neurotoxicité aiguë, avec un facteur d'évaluation de 100 (EFSA., 2006).

6. La dose maximale tolérée (DMT)

La DMT est définie comme la dose induisant des signes de toxicité tels que des niveaux de doses supérieurs à cette dose, dans les mêmes conditions d'administration, seraient susceptibles d'avoir des effets létaux (OECD., 2013). La dose maximale tolérée (DMT) de métribuzine = 900 ppm (McMAHON., 1993).

VII. Métabolisme des pesticides

Le métabolisme des pesticides chez les animaux est un mécanisme important par lequel les organismes à se protéger contre l'effet toxique des xénobiotiques (produits chimiques étrangers) dans leur approvisionnement alimentaire. Les différents organes, notamment le foie, peuvent être impliqués, en fonction de la substance chimique. L'énergie utilisée pour métaboliser les pesticides et autres produits chimiques xénobiotiques (étrangers) n'est pas disponible pour d'autres fonctions du corps et peut sérieusement nuire à la croissance et la reproduction de l'organisme (ALPAS *et al.*, 2011).

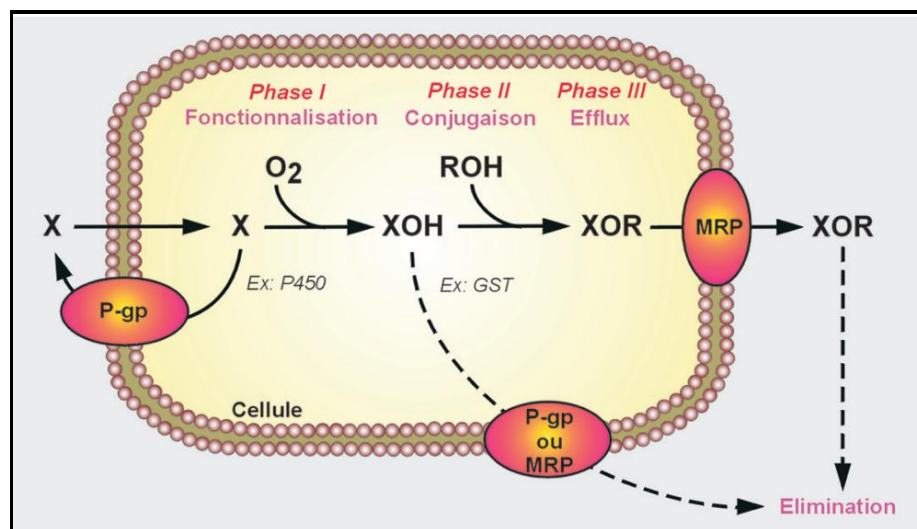


Figure 2: Processus de détoxification et de biotransformation des xénobiotiques (INSERM., 2013).

Comme tous les xénobiotiques, les pesticides peuvent être absorbés par voie cutanée, orale ou pulmonaire et distribués dans les tissus de l'organisme de manière active ou passive. L'absorption dépend de la barrière à franchir (peau, poumon, paroi intestinale...), des propriétés physicochimiques des molécules. Les petites molécules peuvent franchir une ou plusieurs barrières de manière passive (figure 2). Les substances lipophiles (hydrophobes) semblent capables de traverser plus facilement les membranes cellulaires dont les constituants

sont principalement des phospholipides alors que les substances ionisées (hydrophiles) seront arrêtées sauf au niveau des pores ou des transporteurs membranaires pour les plus petites molécules. La membrane des cellules constitue ainsi une barrière efficace protégeant les cellules contre des xénobiotiques hydrosolubles. Après pénétration dans une cellule, le xénobiotique est rapidement pris en charge par des transporteurs membranaires ou pompes d'efflux qui vont l'exporter à l'extérieur de la cellule. Il peut également être transformé par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques au cours de plusieurs réactions afin de faciliter son excrétion. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques représentent un système complexe essentiel à la protection de l'organisme. La première étape (phase I) ou phase de fonctionnalisation met souvent en jeu des cytochromes P450 (CYPs). Elle consiste en une activation métabolique qui conduit à la formation d'intermédiaires électrophiles hautement réactifs qui seront alors soumis aux enzymes de la phase II (enzymes de conjugaison ou transférases comme la glutathion-S- ou glucuro- transférase), capables de greffer des résidus hydrophiles (comme le glutathion). Les métabolites ainsi transformés sont excrétés de la cellule par des transporteurs membranaires d'efflux dits de phase III (INSERM., 2013).

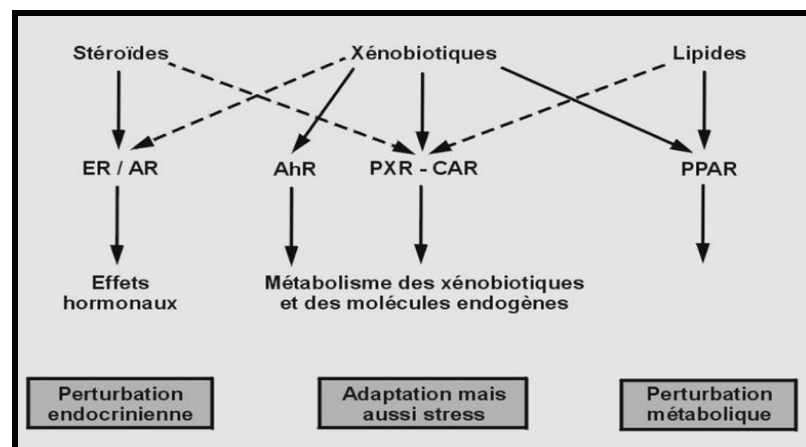


Figure 3: Différents types de récepteurs des xénobiotiques (INSERM., 2013).

L'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques peut dans certains cas être augmentée lors d'expositions répétées à ces xénobiotiques. Ce système « inductible » dépend généralement de la liaison des xénobiotiques à des récepteurs nucléaires. La fixation des xénobiotiques sur différents récepteurs nucléaires ou cytoplasmiques (figure 3) (PXR, Pregnane X Receptor ; CAR, Constitutive Androstane Receptor; AhR, Aryl hydrocarbon Receptor) déclenche la transduction d'un signal permettant l'induction des enzymes du métabolisme et des transporteurs nécessaires à leur élimination. Cette signalisation met également en jeu tous les processus nécessaires à l'adaptation d'une cellule face au stress. Dans ce sens, les récepteurs aux xénobiotiques sont considérés comme des xénosenseurs car

ils permettent de coordonner une réponse cellulaire adaptée. Parmi les xénosenseurs, le PXR et dans une moindre mesure le CAR sont capables de lier de nombreux pesticides. Les mécanismes de toxicité des pesticides sont multiples et certains de ces mécanismes sont liés aux processus de détoxification lui-même avec la génération de métabolites très toxiques, la formation de métabolites intermédiaires réactifs pouvant réagir avec des macromolécules cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides membranaires). L'activité de certains cytochromes P450 (par exemple des cytochromes CYP1A1 et CYP2E1) peut conduire à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (INSERM., 2013).

VIII. Les effets des pesticides sur l'environnement

Les pesticides ont largement contribué à l'augmentation de la production de la productivité agricole et à la qualité de la production végétale mais, une fois introduits dans l'environnement, ils peuvent s'accumuler dans le sol et dans l'eau et provoquer des dommages à la flore et à la faune, lorsque les concentrations dans les chaînes alimentaires deviennent assez élevées pour nuire à la faune et à la flore sauvage (tableau 2). Par ailleurs, les résidus des pesticides portent atteinte à la qualité des eaux potables, contaminent les aliments destinés à la consommation humaine, ont des effets négatifs sur la santé des travailleurs agricoles qui y sont directement exposés, tandis que certains pesticides contiennent des composés de bromure qui, une fois volatilisés, se transforment dans la stratosphère en gaz responsables de l'appauvrissement de la couche d'ozone (OECD., 1999).

Tableau 2: les effets néfastes des pesticides sur l'environnement (SIBIEUDE *et al.*, 1993)

Pratiques agricoles	Sols	Eaux souterraines	Eaux de surface	Flore et faune	Autres: air, bruit, paysage
Pesticides	Accumulation de pesticides et de produits de dégradation	Lessivage des résidus mobiles de pesticides et des produits de dégradation		-Effet sur la microflore du sol; résistance de certaines mauvaises herbes -Empoisonnement résistance	Evaporation ,mauvais, épandage aérien, résidus

IX. Les effets des pesticides sur la santé

1. Mode d'exposition des pesticides

En l'absence d'observations faites sur l'homme, on doit classer les produits d'après les informations disponibles provenant d'essais sur l'animal. Trois modes d'exposition possibles sont à examiner (figure 4). Ces modes sont l'exposition (Unies. Nations, Comité d., 2003):

- a- Par ingestion;
- b- Par absorption cutanée;
- c- Par inhalation de poussières, de brouillards ou de vapeurs.

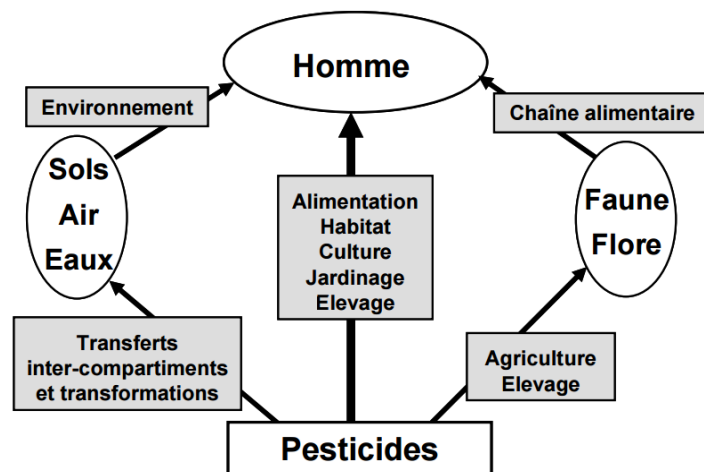


Figure 4: Modes d'exposition de l'homme et des milieux par les pesticides (MERHI., 2008).

1.1. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle aux pesticides des agriculteurs est très variable et complexe selon les exploitations agricoles. La reconstitution de l'exposition est également compliquée par l'évolution des pratiques agricoles au cours du temps (MERHI., 2008). L'exposition professionnelle est également une source potentielle d'exposition indirecte pour les nourrissons si l'un des parents travaille dans un domaine qui utilise des pesticides. L'exposition à ces derniers peut se faire par absorption cutanée, inhalation et ingestion. Plus de 50 pesticides ont été déclarés cancérigènes chez l'animal (STELLMAN., 2000a). En général, l'exposition est essentiellement cutanée, à moindre mesure aérienne et secondairement orale (repas, tabac,... sur le lieu de travail) (MERHI., 2008).

1.2. Exposition non professionnelle

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

du traitement et via l'autoconsommation) et l'ingestion de pesticides via l'alimentation. La consommation alimentaire de pesticides se fait via l'eau, les produits animaux (lait, viande, poisson, etc.) ou végétaux et peut être aiguë ou chronique. La connaissance précise du risque "pesticides" global pour le grand public nécessite de renseigner indépendamment les différentes solutions d'exposition. Les expositions sont multiples car chaque facteur agit sur l'intensité du risque et les facteurs peuvent se combiner entre eux (MEDJDOUB., 2013). Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante, sauf exception. Les évaluations de risque attribuent 90% de l'exposition à l'alimentation contre 10% à l'eau (CPP., 2002).

2. Effets sur la santé humaine

L'homme et les animaux en général, absorbent les pesticides et leurs produits dérivés via la nourriture, l'eau, l'air respiré ou par contact avec la peau ou les cuticules (SCHEYER., 2004). Les herbicides ont une toxicité très variable. En plus de formulaire de toxicité aiguë de fortes expositions, on s'inquiète de la cancérogénicité possible ainsi que d'autres problèmes à long terme comme la contribution à la maladie de Parkinson. Certains herbicides provoquent une gamme d'effets de santé allant des éruptions cutanées à mort. La voie d'attaque peut provenir de la consommation directe, intentionnelle ou non, mauvaise application entraînant l'herbicide entrer en contact direct avec des personnes ou des animaux sauvages, l'inhalation de pulvérisations aériennes, ou la consommation alimentaire avant le délai avant récolte marqué (ALPAS *et al.*, 2011).

3. Effets sur la fertilité et la reproduction

Les pesticides et leurs sous-produits ont été également identifiés en tant qu'agents susceptibles de porter atteinte au processus de fertilité masculine, via une toxicité testiculaire (SANCHEZ-PENA *et al.*, 2004). Le lien entre pesticides et infertilité chez la femme est mal connu et mériterait d'être mieux étudié (BALDI *et al.*, 2013). Des études faites sur des rats ont clairement montré les effets nocifs du méthyl-parathion sur le système de reproduction (JOSHI *et al.*, 2003). Il a été remarqué que chez des femmes exposées à des pesticides, le risque de mortalité intra-utérin augmentait et que la croissance fœtale diminuait. A noter aussi que des pesticides ont été retrouvés dans le cordon ombilical mais aussi dans le lait maternel, ce qui pourrait expliquer le mauvais développement du fœtus, les malformations congénitales et les anomalies du système nerveux central (LEVARIO-CARILLO *et al.*, 2004). Les principaux troubles de la reproduction concernent le fœtus qui est exposé par sa mère. Les conséquences sont des avortements spontanés, des enfants mort-nés et des malformations

congénitales. Il est souvent invoqué aussi une baisse de la fertilité qui est peut-être dû à une perturbation endocrinienne (AMIARD., 2011). Une diminution du poids de naissance, des atteintes neurodéveloppementales et une augmentation significative du risque de leucémie sont également rapportées (BALDI *et al.*, 2013).

4. Effet cancérigène des pesticides

La nocivité des pesticides sur la santé humaine a été démontrée de longue date, dès 1962, Rachel Carson montrait les effets délétères de ces derniers sur l'environnement et l'homme, en particulier avec le développement des cancers. Comme l'écrit aujourd'hui le professeur de cancérologie Dominique Belpomme, «le nombre de ces molécules déversées dans l'environnement est devenu considérable». L'effet cancérigène de plusieurs pesticides est certain, probable ou possible selon le Circ (Centre international de recherche sur le cancer). Ce lien entre exposition aux pesticides et cancers est aujourd'hui démontré par les travaux de certains épidémiologistes. Par ailleurs, les agriculteurs qui utilisent des pesticides pour leurs cultures développent plus fréquemment certains types de cancers et en particulier les leucémies, les lymphomes et des myélomes multiples. Les autres pathologies développées par les agriculteurs (trouble de la reproduction ou maladies neurologiques) sont moins étudiées (DELEAGE., 2013).

5. Effets sur le système endocrinien

Les effets toxiques induits par l'exposition chronique aux polluants environnementaux impliquent des dérèglements physiologiques qui vont affecter les fonctions essentielles de l'organisme, parmi lesquelles les fonctions endocriniennes et immunitaires. Les perturbations induites par la présence de polluants dans le milieu environnant vont affecter le rôle que joue le système endocrinien dans le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité physiologique. Ces effets vont se répercuter sur la croissance, le métabolisme et sur la reproduction, mettant ainsi en danger la survie de la population. Parmi les polluants environnementaux, les modulateurs endocriniens tels que les pesticides et les métaux sont aujourd'hui largement étudiés. Capables de mimer ou d'altérer la synthèse et le métabolisme hormonal, ces toxiques affectent la réponse normale de l'organisme à un stress en affectant le rôle que joue le système endocrinien dans la coordination des processus physiologiques et dans le maintien de l'hémostasie. Après avoir pénétré dans l'organisme, ces polluants pourront interférer avec les processus hormonaux en agissant à plusieurs niveaux d'organisation anatomique et fonctionnelle, tel l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénale (PELLETIER *et al.*, 2004).



Chapitre II
Le stress oxydatif

I. Définition

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène résulte dans la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés. En situation normale, les EOA (figure 5) sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif (PINCEMAIL *et al.*, 1999).

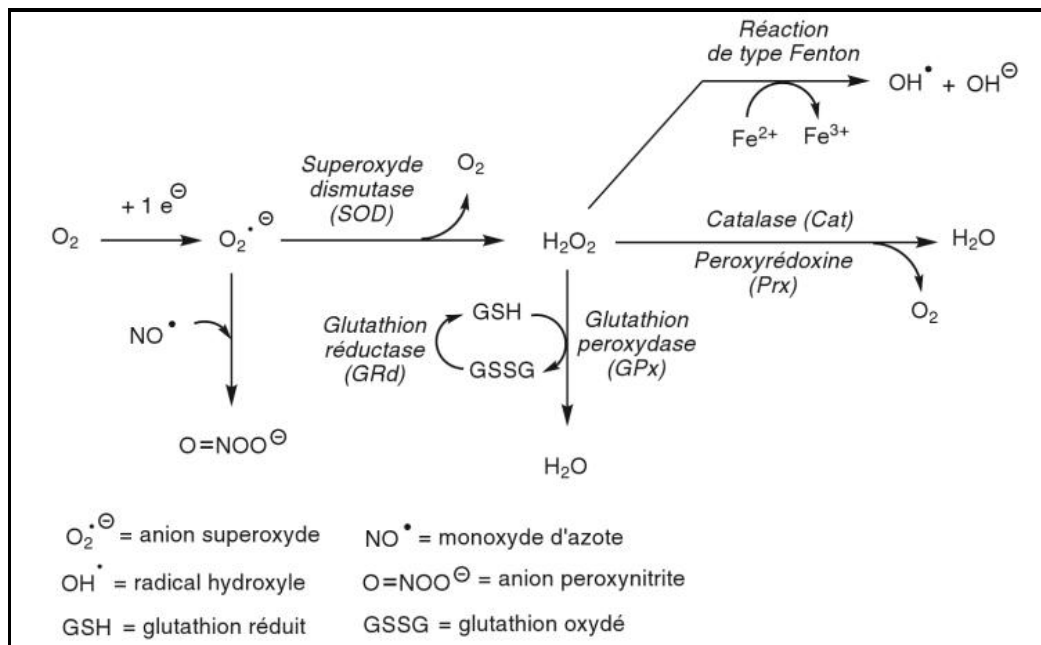


Figure 5: Espèces oxygénées réactives et systèmes antioxydants cellulaires (AFECT., 2011).

II. Espèces réactives de l'oxygène

1. Définition et types

Les EOA sont des éléments possèdent un électron célibataire présent de façon prédominante sur un atome d'oxygène: l'anion superoxyde [O_2^-]; cette notation indique la présence d'un électron célibataire et la charge nette (-1) de la molécule, le radical hydroxyle ($\bullet OH$; la notation OH^{\bullet} que l'on rencontre souvent a le défaut de ne pas indiquer que l'électron

célibataire est localisé sur l'atome d'oxygène) et les différents radicaux peroxyde ROO[•] (Tableau 3). Les RLO proprement dits engendrent aussi des molécules non radicalaires mais également très réactives, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ ou eau oxygénée) ou encore l'acide hypochloreux (HOCl). Pour la commodité, elles sont assimilées à des RLO (RUSSO-MARIE., 1998).

Tableau 3: Principaux radicaux libres et comparaison de leur pouvoir oxydant (KEBIECHE., 2009).

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	•OH
Radical alkoxyde	RO•
Radical hydroperoxyde	HOO•
Radical peroxyde	ROO•
Radical oxyde nitrique	NO•
Peroxyde d'hydrogène*	H₂O₂
Peroxynitrite	ONOO•
Anion superoxyde	O₂•-

*Espèces active de l'oxygène, non radicalaire

2. Sources des espèces réactives oxygénées

2.1. Sources endogènes

Les espèces activées de l'oxygène (EOA) proviennent de sources endogènes et exogènes aux organismes (figure 6). La principale source endogène est la respiration aérobie de laquelle O₂ est réduit en H₂O, à la fin de la chaîne respiratoire aérobie lors de laquelle O₂ est réduit en H₂O, à la fin de la chaîne respiratoire mitochondriale. La molécule d'O₂ reste liée au complexe IV (cytochrome C oxydase), jusqu'à ce qu'elle soit complètement réduite en H₂O₂. Cependant, des pertes d'électrons peuvent avoir lieu en amont au niveau des complexes I, II et III. Ce phénomène peut mener à la réduction partielle d'O₂ en O₂^{•-}. Ces pertes d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale surviennent continuellement durant le métabolisme aérobie normal. Il a été estimé que de 1 à 2% de tous les électrons qui passent dans la chaîne respiratoire mitochondriale forme de l'O₂^{•-} et son produit de dismutation, H₂O₂ (RESS *et al.*, 2004).

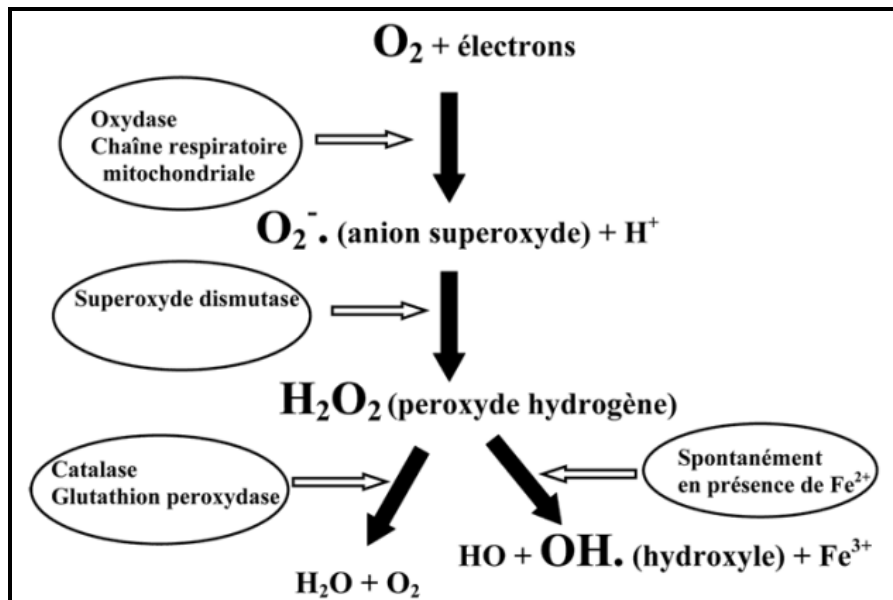


Figure 6: Principales sources des espèces réactives de l'oxygène et enzymes antioxydantes (ICHAÏ *et al.*, 2011).

Les RDL peuvent également être formés au niveau du réticulum endoplasmique, du cytoplasme et de la membrane cytoplasmique. Dans le muscle, les sites de production sont aussi les lysosomes, les peroxysomes, le réticulum nucléaire et sarcoplasmique, le sarcolemme et le sarcoplasme (THIEBAULD., et SPRUMONT., 1997). Le peroxysome est une source importante dans la production cellulaire de H_2O_2 car cet organe contient de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 . Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein. Il semble cependant que seule une faible quantité de H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (BELKHEIRI., 2010).

2.2. Sources exogènes

Les sources exogènes d'espèces réactives de l'oxygène sont nombreuses: produits ménagers, herbicides, médicaments, pollution atmosphérique, rayonnements ionisants, etc (JUNGBLUTH., 2008). L'environnement externe est également une source d'EOA. Il y a, par exemple, les UV A et UV B qui sont connus pour interagir avec des molécules endogènes à la peau (photo-sensibilisateurs tels que les porphyrines) et générer de l'oxygène singulet ou des intermédiaires actifs (RESS *et al.*, 2004).

Les rayonnements ionisants X et gamma sont une source potentielle d'espèces réactives de l'oxygène. Ils provoquent la rupture des liaisons chimiques par transfert d'énergie. Dans les cellules, la molécule la plus touchée est l'eau. Ce phénomène - la radiolyse de l'eau - décompose en quelques nanosecondes H_2O en radicaux libres H^{\cdot} et OH^{\cdot} , en électrons

hydratés ($e^- aq$) et en ions H^+ . Les radicaux hydroxyles HO peuvent se recombinaer pour former le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . En présence d'oxygène, les électrons hydratés et H° forment respectivement des radicaux superoxydes $O_2^{\circ-}$ et peroxydes HO_2° : c'est « l'effet oxygène » utilisé en radiothérapie (JUNGLUTH., 2008).

3. Action biologique des radicaux libres oxygénés

Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule (HALENG *et al.*, 2007).

4. Rôles pathologiques des espèces actives de l'oxygène

Lorsque les moyens de défense sont "débordés", les radicaux libres oxygénés en excès vont agir au niveau de trois grandes cibles cellulaires: les membranes, les protéines et les acides nucléiques (figure 7) (JADOT., 1994).

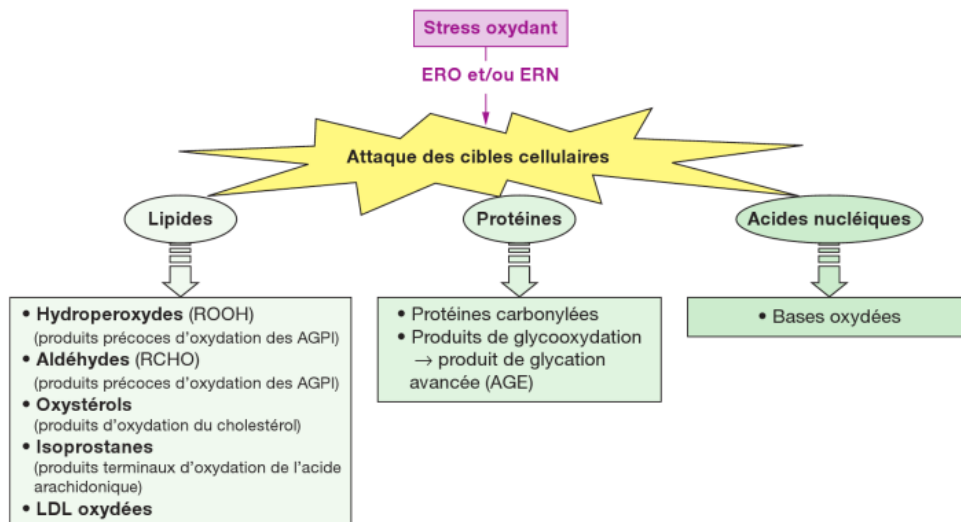


Figure 7: Représentation schématique des cibles biologiques au cours du processus de stress oxydant (BEAUDEUX., et DURAND., 2011).

AGE: produit de glycation avancée; ERO: espèces réactives de l'oxygène; ERN: espèces réactives de l'azote; LDL: lipoprotéines de basse densité; R: résidu d'acides gras.

4.1. Les membranes

Une action caractéristique des RDL est la lipoperoxydation (LIPOX) (figure 8). C'est un phénomène permanent que l'on retrouve dans une grande variété de tissus, et qui résulte de l'attaque des acides gras polyinsaturés (AGPI) par les RDL. La LIPOX provoque une

diminution de la fluidité et une augmentation de la perméabilité membranaire, livrant ainsi le passage à des substances qui normalement ne passent pas la membrane. La LIPOX est aussi responsable de l'inactivation d'enzymes membranaires structurales. L'oxydation des AGPI conduit à la formation de composés peroxydiques et aldéhydiques dont la malondialdéhyde (MDA) (THIEBAULD., et SPRUMONT., 1997).

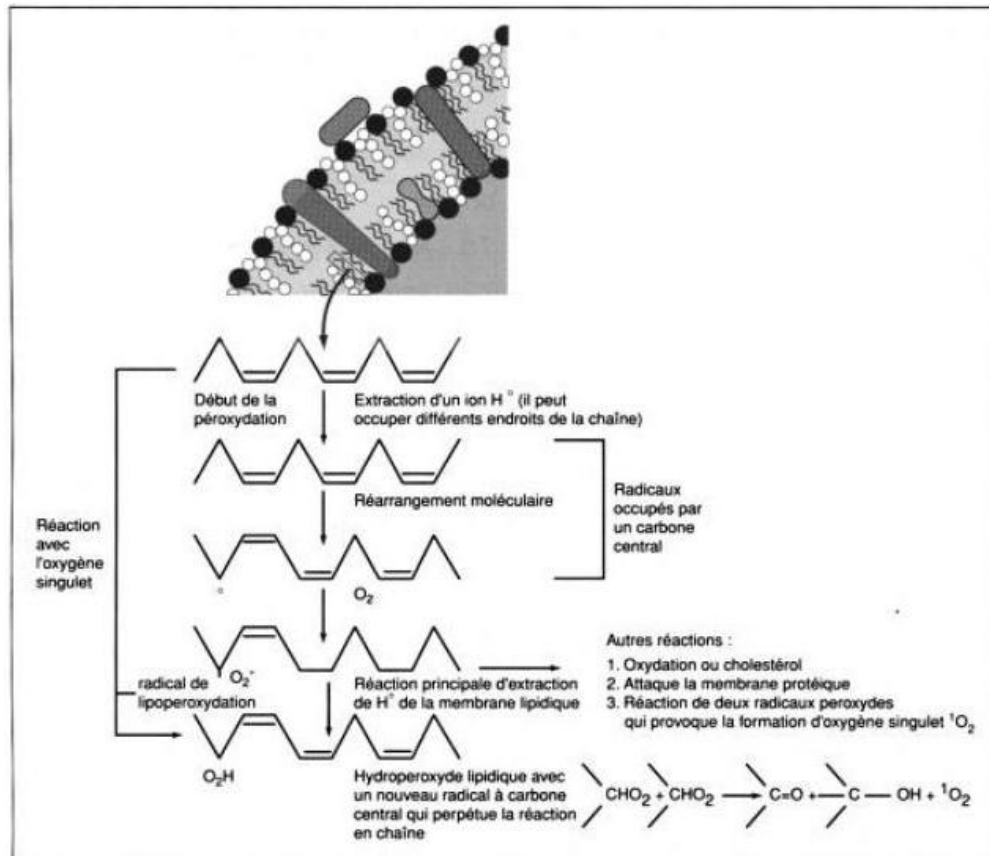


Figure 8: Peroxydation lipidique, réactions des radicaux libres, et les maladies humaines (THIEBAULD., et SPRUMONT., 1997).

4.2. Les protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent une fonction thiol (SH). Comme les protéines de transport qui deviennent inactivées suite à leur oxydation (figure 9). Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, transporteurs, récepteurs...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (KEBIECHE., 2009).

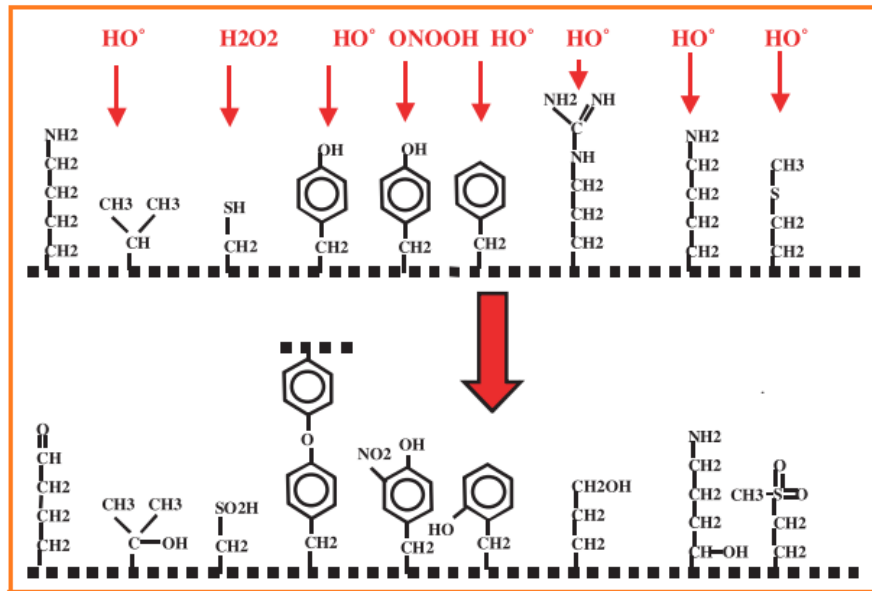


Figure 9: Attaque radicalaire aux protéines (FAVIER., 2003).

4.3. Les acides nucléiques

Les dommages oxydatifs concernent non seulement les bases nucléotidiques mais aussi les groupements phosphodiester ainsi que les oses. Tous les acides nucléiques sont concernés (ARN, ADN nucléaire et mitochondrial) (figure 10). ADN mitochondrial est plus vulnérable que l'ADN nucléaire puisque la mitochondrie est le principal organelle cellulaire producteur de radicaux oxygénés. La guanine est l'une des bases les plus oxydables: les produits de transformation sont des formes hydroxylées (8-OH-G), ou partiellement ouvertes (AFECT., 2011).

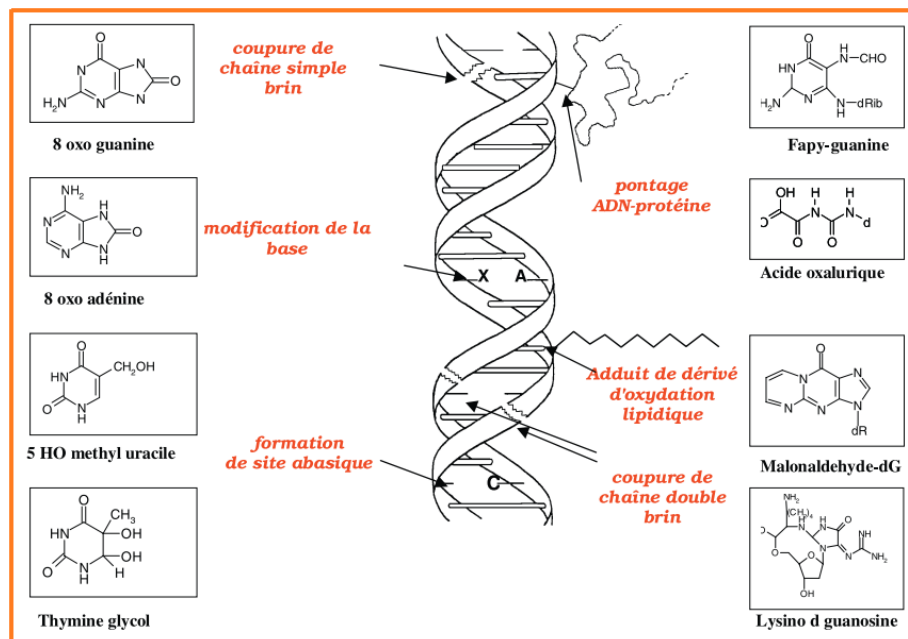


Figure 10: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (FAVIER., 2003).

III. Le système de défense des anti-xydants

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent: 1)- à éliminer les espèces réactives et les catalyseurs de leur formation, 2)- à induire la synthèse des antioxydants et 3)- à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées. Les principales types d'enzymes antioxydantes avec autres non enzymatiques sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène, comme l'illustre la figure 11 (PELLETIER *et al.*, 2004).

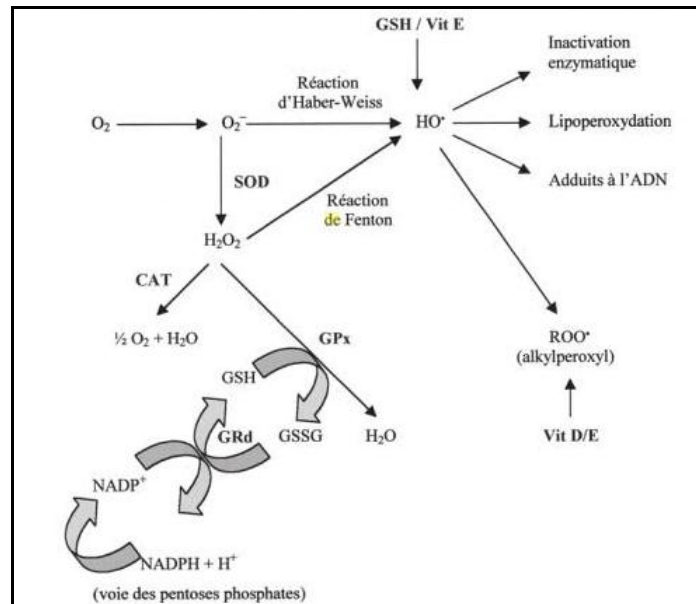


Figure 11: Les systèmes impliqués dans la défense oxydative (PELLETIER *et al.*, 2004).

1. le système enzymatique

-les superoxydes dismutases (SOD) cellulaires sont des enzymes cytoplasmiques formées de deux sous-unités auxquelles sont attachés un atome de cuivre et un atome de zinc (SOD-CuZn) et des enzymes localisées dans les mitochondries comprenant quatre sous-unités attachées chacune à un atome de manganèse (CESARINI., 2004). Les superoxydes dismutases (SOD) transforment le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène (figure 12). La SOD utilisant le manganèse dans son cycle catalytique (Mn-SOD ou SOD2) est localisée dans la matrice mitochondriale. Les compartiments cytoplasmique et nucléaire contiennent la SOD à cuivre et zinc (Cu,Zn-SOD ou SOD1). Il existe aussi une Cu, Zn-SOD (SOD3) extracellulaire (THIEBAULD., et SPRUMONT., 2005).

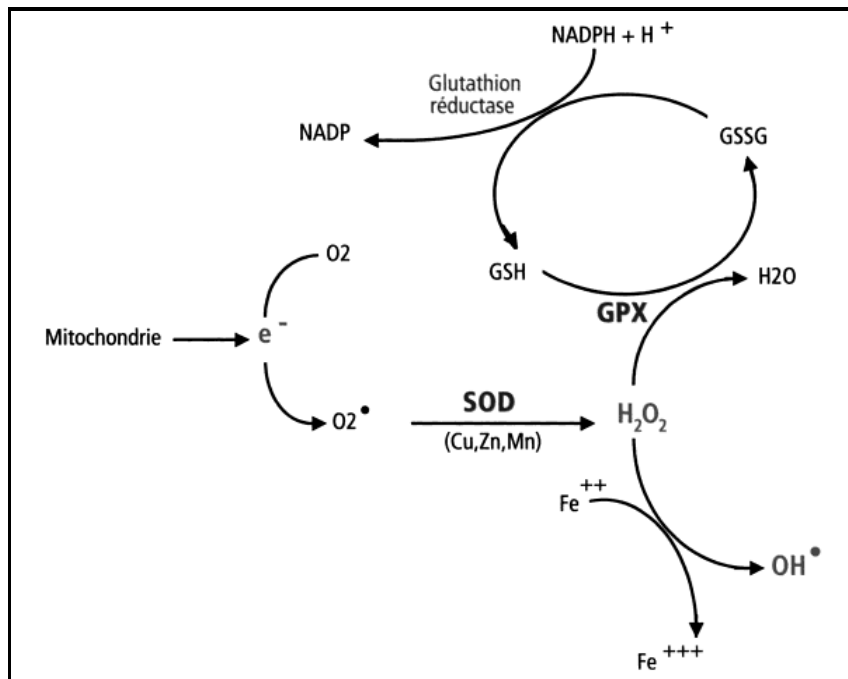


Figure 12: Action de SOD et GPx à l'attaque radicalaire (MEDART., 2009)

- la glutathion peroxydase est une des principales enzymes antioxydantes (figure 12). Alors qu'il est souvent considéré que l'hypoxie favorise une diminution du stress oxydatif de par la diminution du substrat de nombreuses réactions d'oxydation qu'est l'oxygène, l'activité de certaines enzymes antioxydantes comme la glutathion peroxydase a été décrite alternativement inhibée ou activée par l'hypoxie (SAMAIN., 2007).
- la catalase a le même rôle que la GSH-Px, mais son activité s'effondre très rapidement en conditions de stress oxydatif (CESARINI., 2004).
- Le complexe thioredoxine/thioredoxine réductase assure la réduction des groupements thiols protéiques. Ce complexe, présent sur le versant extracellulaire des cellules, participerait à l'élimination de l'anion superoxyde (CESARINI., 2004).

2. le système non enzymatique

La vitamine E est un antioxydant lipophile et un composant lipidique des membranes cellulaires. Elle existe sous deux formes: le d- α -tocophérol élimine les radicaux peroxydes qui se forment lors de la peroxydation des lipides. Il empêche la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique. Le radical tocophérol qui en résulte est peu réactif. Il est reconverti en α -tocophérol par l'acide ascorbique (vitamine C) qui est un puissant antioxydant hydrophile. Cependant, à forte concentration, cet antioxydant peut jouer le rôle d'un pro-oxydant. L' α -tocotriénol, une deuxième forme de la vitamine E, semble avoir un effet protecteur contre les radicaux peroxydes encore plus puissant que le d- α -tocophérol (RUSSO-MARIE., 1998).

IV. L'effet de stress oxydatif sur la reproduction et le développement embryonnaire

En cas de déséquilibre entre pro-et antioxydants, les lésions de peroxydation qui en résultent altèrent le pouvoir fécondant des spermatozoïdes, avec notamment une diminution de la mobilité des spermatozoïdes. Les ERO ont aussi un effet délétère sur l'ADN du spermatozoïde, ce qui peut avoir, en l'absence de correction, un impact négatif après la fécondation (PONCELET., et SIFER., 2011). Les modifications épigénétiques progressives du génome embryonnaire sont sans doute impliquées dans l'évolution de l'expression des gènes du métabolisme embryonnaire au cours de la période pré-implantatoire. Mais les produits du métabolisme peuvent également affecter les modifications épigénétiques en cours; par exemple, les stress oxydatifs sont susceptibles d'affecter l'acétylation des histones, et certains produits de l'activité mitochondriale sont directement impliqués dans les modifications épigénétiques du génome embryonnaire (SAINT-DIZIER., et CHASTANT-MAILLARD., 2014).



Partie II

Etude expérimentale





Chapitre I
Matériels et méthodes

I. Matériels

1. Matériel animal

1.1. Entretien des animaux

Notre étude a été réalisée sur quinze (15) lapins adulte de la région locale, douze lapines femelles, et trois lapins male pour la reproduction, et pesant entre 1200 et 2200g au début de l'expérimentation, ces animaux sont mis à l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued, à température (18.084 ± 0.627) et à humidité (64.59 ± 1.14), pendant la durée de l'expérimentation (2 mois), le 1^{er} mois; est la période de contamination par pesticide, sans couplage, la 2^{ème} mois; c'est une période de contamination avec l'addition des males aux femelles pour la gestation.

1.2. Elevage et mesure du poids

Les lapines sont logées dans des cages métalliques, chaque cage regroupe quatre lapines. Ces cages sont nettoyés une fois chaque semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. Le poids a été mesuré de façon régulière, la dose de pesticide donnée est ajuster selon le poids. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture (type d'aliment synthétique selon tableau 4).

Tableau 4: Composition de l'alimentation utilisée (SOUTHON *et al.*, 1984)

Matières premières	Quantité (g/kg)	Pourcentage (%)
Mais	326	32.6
Saccharose	326	32.6
Protéine	168	16.8
Cellulose	40	4
Minéraux ¹	20	2
Vitamine ¹	20	2
Huile	40	4
Protéine ²	148.4	14.84

1- les minéraux et les vitamines sont achetés de l'établissement MG2MIX

2- la composition en protéine de l'alimentation est réalisée au niveau de laboratoire de biotechnologie alimentaire INRA Touggourt.

1.3. Traitement des animaux

L'ensemble des lapins ont été divisé en trois groupes de cinq lapines chacun et gardés dans des même conditions. Un groupe de témoin ne traite pas par la métribuzine (GT); le deuxième groupe recevant un eau de boisson contaminé par 6,44 mg/kg ou 2% de métribuzine (G1), et

le troisième groupe recevant un eau de boisson contaminé par 3,22 mg/kg ou 1% de métribuzine (G2).

1.4. Sacrifice et prélèvement de sang et des organes

Après 60 jours de traitement les lapins de 3 lots sont mis à jeûne pendant 15 heures puis ont été sacrifiés (par décapitation), le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes polyéthylène. L'un contient l'anticoagulant EDTA et l'autre étant sec, ce dernier est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes pour le dosage des paramètres biochimiques (glycémie, l'urée, créatinine, TGO, TGP), le sang mis dans des tubes contenant l'EDTA est séparé en deux parties, une utilisé pour le dosage des paramètres hématologiques (GR, GB, HB, LYM, PLA), et l'autre pour la récupération de plasma afin de doser l'estradiol plasmatique.

Les animaux sacrifiés ont été pesés puis disséqués pour le prélèvement de certains organes: Les foies, les cœurs, les reins et les ovaires ont été pesés puis stockés au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant (protéines, glutathion S-Transférase, glutathion réduit et Malondialdéhyde).

Une partie de foie a été utilisé pour l'analyse de la métribuzine par l'HPLC. Une partie du rein a été fixé dans le formol pour réaliser des coupes histologiques.

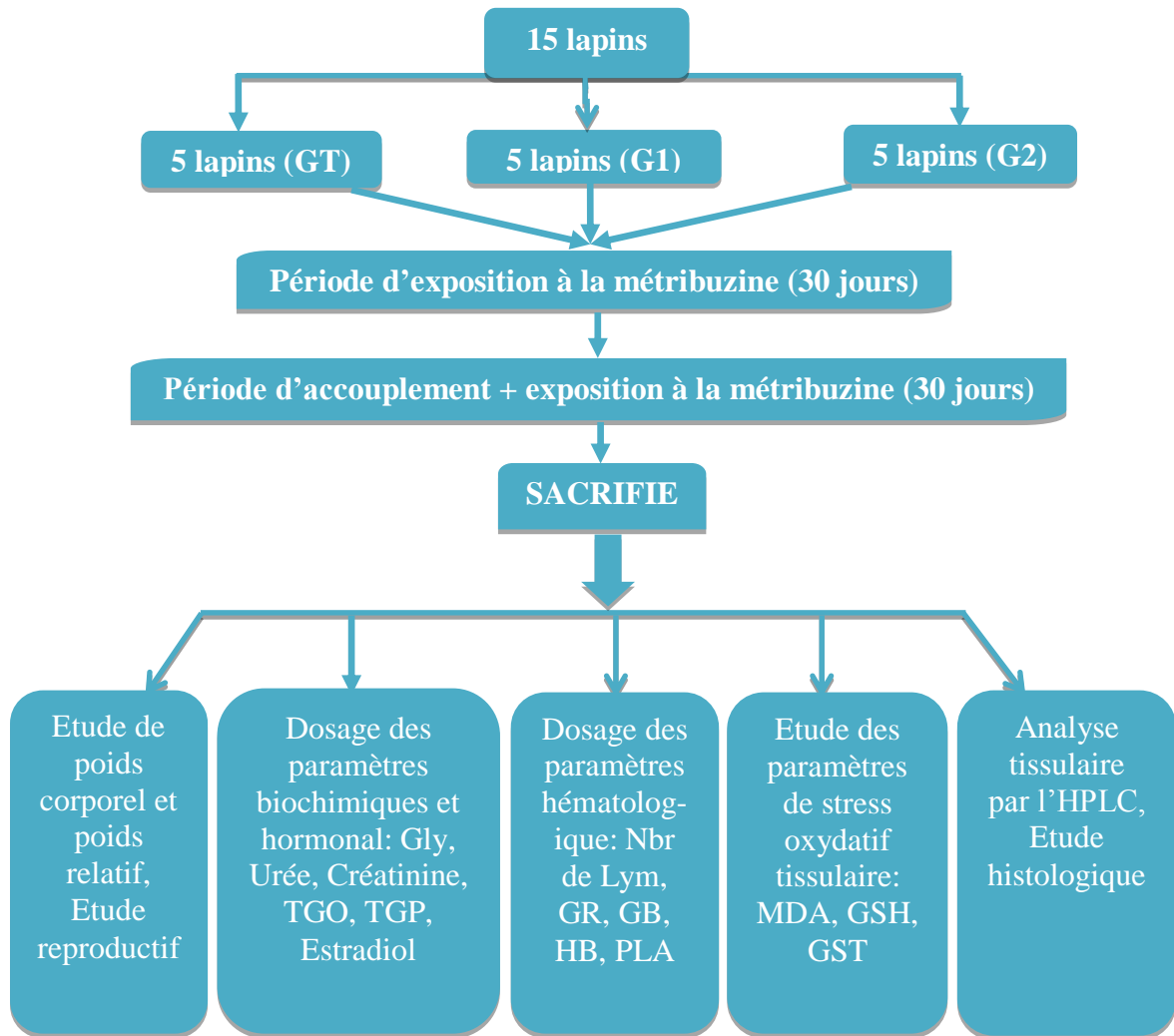


Figure 13: Schéma récapitulatif de protocole expérimental.

2. Produits et réactifs

Acide éthylène Diamine Tetra-acétique (EDTA), trishydroxyméthylaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (Tris), Ethanol, Ethanol absolu, Méthanol, Acide salicylique, Acide trichloroacétique (TCA), Acide thiobarbiturique (TBA), Butylhydroxytoluène (BHT), Chlorure d'hydrogène (HCl), Acide Dithio-Bis2-Nitrobenzoïque (DTNB), Monopotassium Phosphate (KH₂PO₄), 1 Chloro 2, 4 Di Nitrobenzène (CDNB), Glutathion réduit (GSH), Bleu de Comassie, Xylène, Ethanol 100%, Ethanol 95%, Ethanol 70%, Hématoxyline, Eosine, Formol d'aldéhyde 10%.

Le kit de réactif de l'urée, le kit de réactif de la créatinine, le kit de réactif de TGO, le kit de réactif de TGP sont achetés du SPINREACT.

3. Matériels de laboratoire

- Spectromètre d'absorption UV-visible
- Microtome
- Microscope optique
- Automate
- HPLC
- Immunoanalyseur
- centrifugeuse
- agitateur
- bain marie
- balance électrique
- balance analytique
- vortex

II. Méthodes

Les paramètres d'étude ont été dosés au niveau de laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar-El-Oued, et de laboratoire de recherche VTRS, CP 789, Faculté des sciences et de la technologie à l'université Echahid Hamma Lakhdar El-Oued et de laboratoire d'établissement hospitalier spécialisé BEN NACER BACHIR d'EL-OUED, laboratoire de biotechnologie alimentaire INRA Touggourt, de laboratoire BEN BORDI pour le diagnostic des maladies d'EL-OUED.

1. Méthode de dosage hématologique

L'analyse hématologique (FNS) est effectuée par l'autoanalyseur de marque mythic 18 Orphée.

2. Méthode de dosage de la glycémie

L'analyse de la glycémie est effectuée par un glucomètre de marque On-Call Plus.

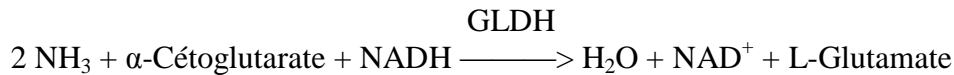
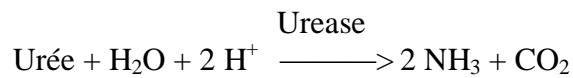
3. Méthode de dosage d'estradiol

L'analyse d'estradiol est effectuée par l'immunoanalyseur de marque ARCHITECT i4000SR Abbott Diagnostics.

4. Méthode de dosage d'urée sérique

4.1. Principe de la méthode

L'uréase catalyse l'hémolyse de l'urée, présente dans l'échantillon, en ammoniac (NH_3) et en anhydride carbonique (CO_2). L'ammoniac formé est incorporé à l' α -cétoglutarate par l'action du glutamate déshydrogénase (GLDH) avec oxydation parallèle de la NADH à la NAD^+ :



La diminution de la concentration de NAD⁺ dans la méthode est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon testé (KAPLAN *et al.*, 1984).

4.2. Réactifs

R1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
Tampon	α -Cétoglutarate	6 mmol/L
R 2	Uréase	3750 U/L
Enzymes	Glutamate déshydrogénase (GLDH)	6000 U/L
	NADH	0,32 mmol/L
UREA CAL	Patron primaire de détection d'urée 50 mg/dL	

4.3. Procédure

	Blanc	Étalon	Echantillon
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Étalon (μ L)	--	10	--
Echantillon	--	--	10

Mélanger et lire les absorbations aux 30 s (A_1) et aux 90 s (A_2). A 340nm, et T°: 37/15-25°C.

Calculer: $\Delta A = A_1 - A_2$.

$$[\text{Urée}] \text{ (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ Echantillon}}{(\text{A}) \text{ Étalon}} \times 50 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

5. Méthode de dosage de créatinine

5.1. Principe de la méthode

Le test de la créatinine est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium décrit par Jaffé. La créatinine réagit avec le picrate alcalin en formant un complexe de couleur rouge. L'intervalle de temps choisi pour les lectures permet d'éliminer une grande partie des interférences connue pour la méthode. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans l'échantillon testé (MURRAY *et al.*, 1984c).

5.2. Réactifs

R1 Réactif picrique	Acide picrique	17,5 mmol/L
R 2 Réactif alcalinisant	Hydroxyde de sodium	0,29 mol/L
CREATININE CAL	Patron premier de détection de la créatinine 2 mg/dL	

5.3. Procédure

	Blanc	Etalon	Echantillon
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	--	100	--
Echantillon (µl)	--	--	100

-Mélanger et activer le chronomètre.

-Lire l'absorbation (A_1) au bout de 30 secondes puis de 90 secondes (A_2) après avoir ajouté l'échantillon de test. A 492 nm (490-510), et T° : 37°/15-25°C.

-Calculer: $\Delta A = A_2 - A_1$.

Calculs:

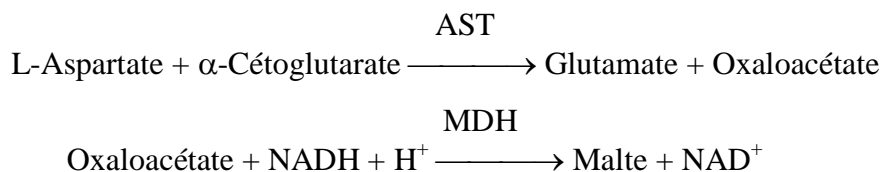
$$\frac{\Delta A_{\text{Echantillon}} - \Delta A_{\text{Blanc}}}{\text{Modèle } \Delta A - \Delta A_{\text{Blanc}}} \times 2 (\text{Conc. Modèle}) = \text{mg/dL de créatinine dans l'échantillon}$$

Facteur de conversion: mg/dL x 88,4 = µmol/L.

6. Mesure de l'activité d'aspartate aminotransférase GOT (ASAT)

6.1. Principe de la méthode

L'aspartate aminotransférase (ASAT) initialement appelée glutamate oxaloacétique (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé d'aspartate vers l'alpha céto-glutarate avec formation de glutamate et d'oxaloacétate. L'oxaloacétate produit est réduit en malte déshydrogénase (MDH) et NADH:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique en AST de l'échantillon testé (MURRAY *et al.*, 1984b).

6.2. Réactifs

R1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
Tampon	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/L
	Malte déshydrogénase (MDH)	600 U/L
	L-Aspartate	200 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrats	α -Cétoglutarate	12 mmol/L

6.3. Procédure

RT (mL)	1,0
Echantillon (μ l)	100

- Mélanger et incuber pendant 1 minute.

-Lire l'absorbation (A) initiale de l'échantillon, mettre en route le chronomètre et lire l'absorbation à chaque minute pendant 3 minutes. A 340 nm, et 25°C/30°C/37°C.

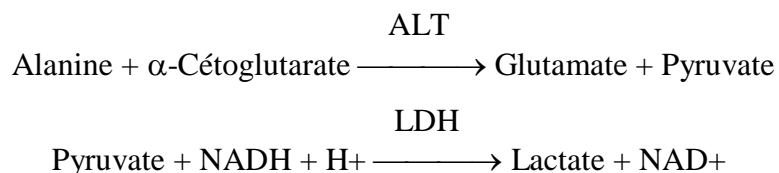
-Calculer la moyenne de l'augmentation d'absorbation par minute ($\Delta A/\text{min}$).

$$\text{TGO} = \Delta A/\text{min} \times 1750 \text{ U/L}$$

7. Mesure de l'activité d'alanine amino transférase GPT (ALAT)

7.1. Principe de la méthode

L'alanine amino transférase (ALAT) initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe animique d'alanine vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogéné (LDH) et NADH:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALT dans l'échantillon (MURRAY *et al.*, 1984a).

7.2. Réactifs

R1	TRIS pH 7,8	100 mmol/L
Tampon	L-Alanine	500 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
Substrats	Lactate déshydrogéné (LDH)	1200 U/L

	α -Cétoglutarate	15 mmol/L
--	-------------------------	-----------

7.3. Procédure

RT (mL)	1,0
Echantillon (μ l)	100

-Mélanger et incuber pendant 1 minute.

-Lire l'absorbation (A) initiale de l'échantillon, mettre en route le chronomètre et lire l'absorbation à chaque minute pendant 3 minutes. A 340 nm, et T°: 25°C/30°C/37°C.

-Calculer la moyenne de l'augmentation d'absorbation par minute ($\Delta A/\text{min}$).

$$\text{TGP} = \Delta A/\text{min} \times 1750 \text{ U/L}$$

8. Méthode de Dosage des protéines tissulaires

8.1. Principe

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford M.M., 1976 qui utilise le bleu de Comassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-\text{NH}_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines) (BRADFORD., 1976).

8.2. Préparation de la solution de travail

Mélangé 25 ml de méthanol (95%) et 50mg du bleu de Comassie, puis mettre la mélange sur l'agitateur pendant 2 heures et ajouté 50ml de H_3PO_4 et complète le volume jusqu'à 500ml avec d'eau distillé.

8.3. Mode opératoire

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml du bleu de Comassie.
- Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions.

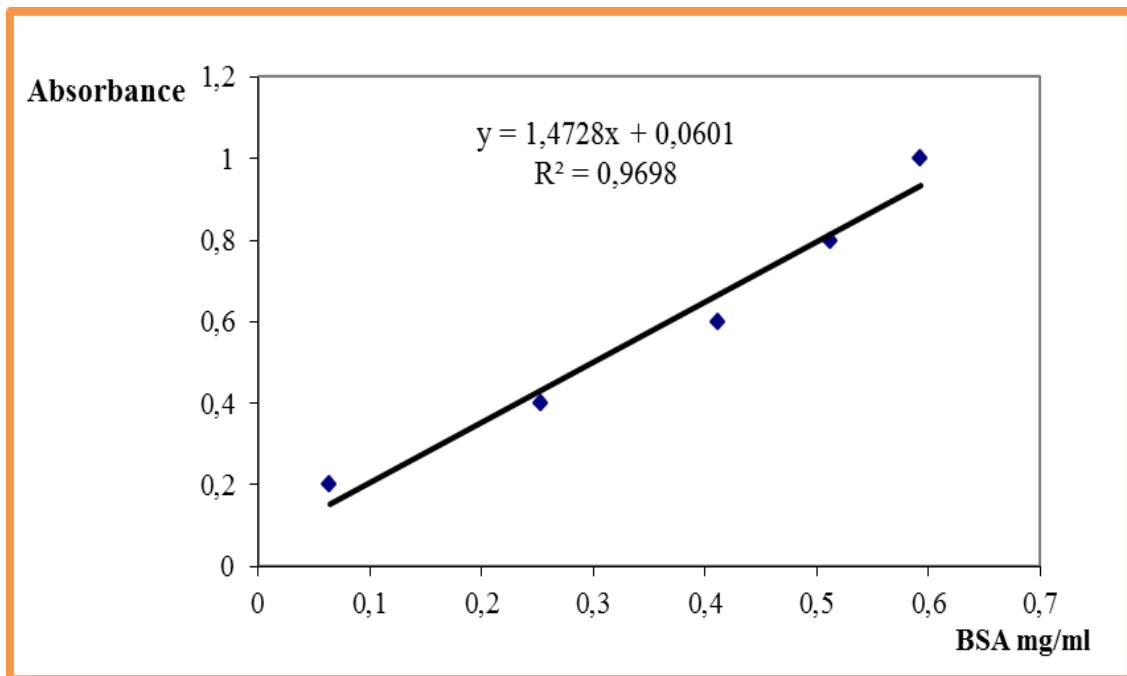


Figure 14: Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.

9. Méthode de dosage de glutathion réduit (GSH) tissulaire

9.1. Principe

Le dosage de la concentration de glutathion est spectrophotométrique. La mesure de la densité optique résulte de la formation de l'acide 2-nitro-5mercapturique à partir de la réduction de l'acide dithio-bis2-nitrobenzoïque ce qu'on appelle réactif de d'Ellman avec les groupements SH existents dans le GSH (WECKBEKER., et CORY., 1988).



9.2. Mode opératoire

- Peser 250 mg de tissus.
 - Broyer le tissu avec 10 ml d'EDTA à (0.02 mol) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.
 - Prendre 0.8 ml de solution homogène et 0.2 ml de l'acide salicylique (0.25%) solution 2.
 - Mélanger avec l'agitateur et laisser 15 minute dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 t/min pendant 5 minutes et le surnagent utiliser pour le dosage de glutathion comme suite.
- ✓ **Mélanger :**
- 0.5 ml de surnagent.

- 1 ml de solution tampon tris avec 0.02 EDTA solution 1.
- 0.025 ml de DTNB (0.01 mol) méthanol solution 3.

Laisser le mélange 5 min de température de chambre puis lire l'absorbance avec spectrophomètre d'absorption moléculaire à 412 nm contre le blanc (eau distillé)

Calcule :

$$(\text{GSH}) (\text{nM/mg de protéine}) = (\text{DO} \times 1 \times 1.525) / (13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg de protéine})$$

10. Mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs) tissulaire

10.1. Principe

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de Habig et al (1974); celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenus dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6.5. la variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm (HABIG *et al.*, 1974).

10.2. Mode opératoire

Réactifs	Blanc (µl)	Essai µl)
▪ Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
▪ CDNB (0.02M)	50	50
▪ GSH (0.1M)	100	100
▪ Homogénat	-	20

CDNB: 1 chloro 2, 4 di nitrobenzène

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST/min/mg protéine)} = (\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min}) / (9.6 \times \text{mg de protein})$$

11. Méthode de dosage de malondialdéhyde (MDA) tissulaire

11.1 Principe

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532nm (YAGI., 1976).

11.2 Réactifs : pour 100 ml de réactif

Acide trichloroacétique (TCA) 20% P/V; Acide thiobarbiturique (TBA) 0.375% P/V; Butylhydroxytoluène (BHT) 0.01% P/V; Chlorure d'hydrogène (HCL) 1 N.

375 mg de TBA, 20g de TCA, 0.01g de BHT, 25 ml de HCL 1 N et 50 ml d'eau distillée ont été introduit dans un bécher. La solution obtenue a été chauffée à 40°C dans un bain Marie jusqu'à dissolution complète du TBA, puis transférée dans une fiole de 100ml et le volume complété à l'eau distillé jusqu'au de jauge.

11.3 Mode opératoire

Pipeter dans les tubes à essai en verre et à vis, 100µl d'échantillon, 400 µl de réactif TBA et fermer hermétiquement. Chauffer le mélange au bain Marie à 100°C pendant 15 minutes. Puis refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et lire l'absorbance du surnageant à 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

11.4 Expression des résultats

La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ($\epsilon = 1.53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en µmol/l.

12. Analyse tissulaire par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les homogénats hépatiques ont été filtrés avant l'injection. Un système HPLC a été utilisé avec un détecteur à $\lambda = 238 \text{ nm}$, la colonne utilisée est de longueur 25cm et diamètre 4.6 mm, la phase stationnaire C_{18} et la phase mobile acide acétonitrile/eau (60; 40; v/v). La métribuzine est évaluée dans les conditions suivantes:

Débit 1 ml/min à 25°C; pression 8.5-8.6; avec temps d'acquisition 20 min.

L'identification de pic de la métribuzine s'est fait grâce le standard réalisée par le pesticide Vapcor (70%) en comparant les temps de rétention (JOHNSON., et PEPPERMAN., 1995; ELSAYED., et PRASHER., 2013).

13. Analyse histologique**13.1. Le prélèvement d'échantillon**

Le prélèvement histologique est une biopsie qui est un prélèvement d'un très petit morceau d'un organe (rein) pour effectuer des examens (peut faire à l'aide d'un couteau).

13.2. La préparation des blocs des tissus

Les morceaux obtenus des reins sont posés aux cassettes spécifiques, on met les cassettes toute de suite après le prélèvement dans le formol d'aldéhyde à 10% pendant 12 heures pour fixer les cellules des tissus, puis on met les cassettes au alcool (éthanol) 12h à bute d'enlever l'eau d'échantillon, ensuite on secoue un peu les cassettes, et on les transférés au xylène pendant 12h, qui aide le paraffine à fixer avec le tissu lors l'enrobage.



▲ Une cassette (Photo originale)

L'enrobage d'un échantillon est important pour préparer et protéger l'échantillon et donner la forme pratique au microtome, premièrement on met le morceau de tissu dans la moule et le recouvrir par la cassette, puis on verse le paraffine liquide (à température entre 56 et 60°C). Après refroidissement en -23°C, on va obtenir un bloc de paraffine, dur, avec à l'intérieur la pièce prélevée incluse, cette étape dure 40 min au minimum.

13.3. La coupe

À l'aide d'un microtome on fait les coupes, après le placement d'une lame spécifique au microtome on place une cassette qui porte un échantillon puis, on règle l'épaisseur de coupe en 10 µm pour l'obtention d'une coupe très fin. Ensuite on met l'échantillon dans un bain mariné à 50°C pour le paraffine devienne décontracté puis, à l'aide d'une lame on prend la section de l'eau et garder sur porte lame puis on place ce dernier dans un étuve à température 110-115°C durant 7 min pour faciliter l'adhérence des coupes sur la lame de verre (élimination des particules d'eau par évaporation).

13.4. La coloration

La méthode utilisée de la coloration est basée principalement sur l'utilisation d'hématoxyline d'Harris (qui colore le noyau à couleur move foncé presque noir) et l'éosine (qui colore le cytoplasme en rose ou orange), peut préparer l'éosine par le mélange de 500 ml d'eau avec 16g de poudre d'éosine. Cette méthode de coloration dure 25 min (avec des solutions concentrées) (Gill., 1974). Le protocole est:

Xylène (2min) → xylène (3min) → éthanol 100% (30sec) → éthanol 95% (30sec) → éthanol 70% (30sec) → eau (1min) → hématoxyline (3-5min) → eau (3min) → éosine (5-7min) →

eau (3 min) → éthanol 70% (30sec) → éthanol 95% (30sec) → éthanol 100% (30sec) → xylène (1min) → xylène (1min).

Le premier xylène utilisé est à bute d'enlever les restes de paraffines, l'xylène avant le dernier et le dernier sont pour l'enlèvement de l'alcool et d'empêcher l'apparaître d'un aspect flou qui résulte après l'utilisation de l'alcool après le sécheresse. Ainsi que l'éthanol utilisé à différent concentration est pour enlever l'eau des tissus. Mais avec des solutions moins concentré, on enlève l'eau et on augmente le séjour des lames à la solution à long temps.

13.5. Le montage

Après l'enlèvement des lames d'xylène on fait le montage; on humide un peu la lame par l'xylène puis on met un peu de quantité de colle spécifique (l'EUKITT) qui permet de coller bien la lame avec la lamelle et aussi de donner une observation très clair et transparent, puis on met la lamelle, et on presse un peu pour enlever le reste d'air, n'oublie pas de mettre la dénomination de chaque lame des patients.

13.6. Microscope + compte rendu

III. Méthode d'analyse statistique

L'évaluation statistique est effectuée par le test T de student. Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types (ES) pour 15 lapines répartie en trois groupes; G1, G2 et GT.

Alors, on utilise un logiciel **MINITAB** et **EXCEL** qui nous aident pour faire les tests.



Chapitre II

Résultats et discussion



I. Les résultats

1. Effet de la métribuzine sur les poids corporels et poids relatifs des organes, et la consommation

Tableau 5: Variation du poids corporel (g) et poids relatif (g/100g) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire), et de quantité d'alimentation (g) et de l'eau de boire (ml) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement.

Les paramètres		Les groupes		
		Groupe T	Groupe 1	Groupe 2
		Moy ± ES	Moy ± ES	Moy ± ES
Poids initial		1764 ± 128	1680 ± 102	1308,5 ± 28,5
Poids final		2117 ± 133	1988 ± 148	1439 ± 117
Gain de poids		5,888 ± 0,817	5,14 ± 1,63 ^{NS}	2,18 ± 1,90 ^{NS}
Poids relatif	Foie	2.360 ± 0.189	2.945 ± 0.151 ^{**}	2.832 ± 0.323 [*]
	Reins	0.208 ± 0.004	0.2613 ± 0.038 ^{NS}	0.298 ± 0.024 ^{**}
	Cœur	0.229 ± 0.006	0.314 ± 0.008 ^{***}	0.272 ± 0.008 ^{***}
	Ovaire	0.009 ± 0.002	0.015 ± 0.003 ^{**}	0.006 ± 0.001 ^{**}
L'alimentation		390.30 ± 3.96	379.47 ± 3.51 [*]	346.15 ± 8.22 ^{***}
L'eau		392.17 ± 3.65	394.50 ± 2.07 ^{NS}	339.15 ± 6.57 ^{***}

Les résultats obtenus de tableau montrent que l'alimentation donnée est diminuée de façon significative ($P < 0.05$) chez le lot G1 et diminuée de façon très hautement significative ($P < 0.001$) chez le lot G2 par rapport au groupe témoin. Ainsi, montrent que l'eau donnée est diminuée de façon très hautement significative ($P < 0.001$) chez le G2, et aucune variation observé chez le G1 par rapport au groupe témoin.

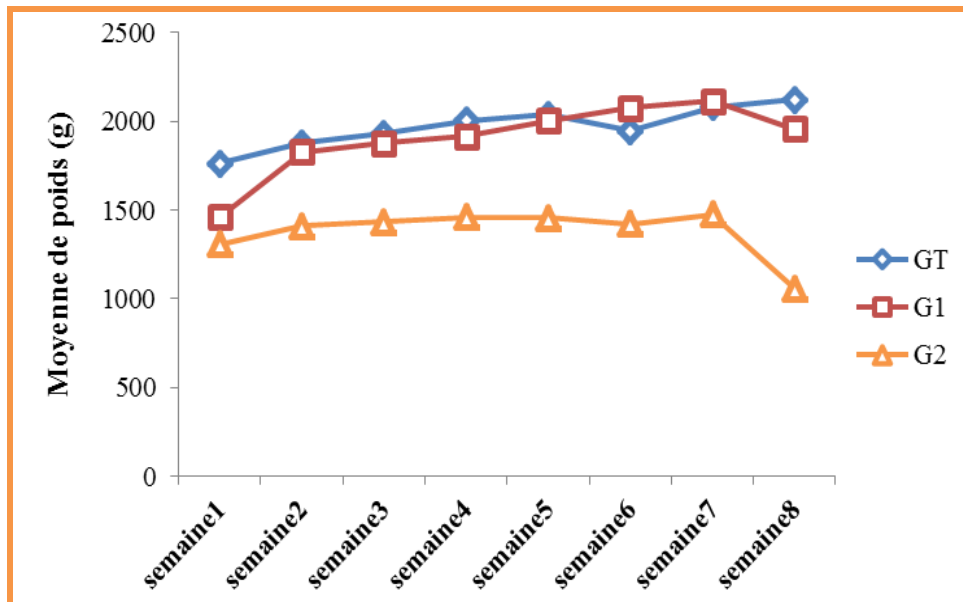


Figure 15: Evolution du poids par semaine chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine.

Les résultats obtenus de la figure 15 présentent les variations des poids des groupes de lapins hebdomadaire, et présentent une diminution progressive des poids des groupes G1 et G2 par rapport au groupe témoin.

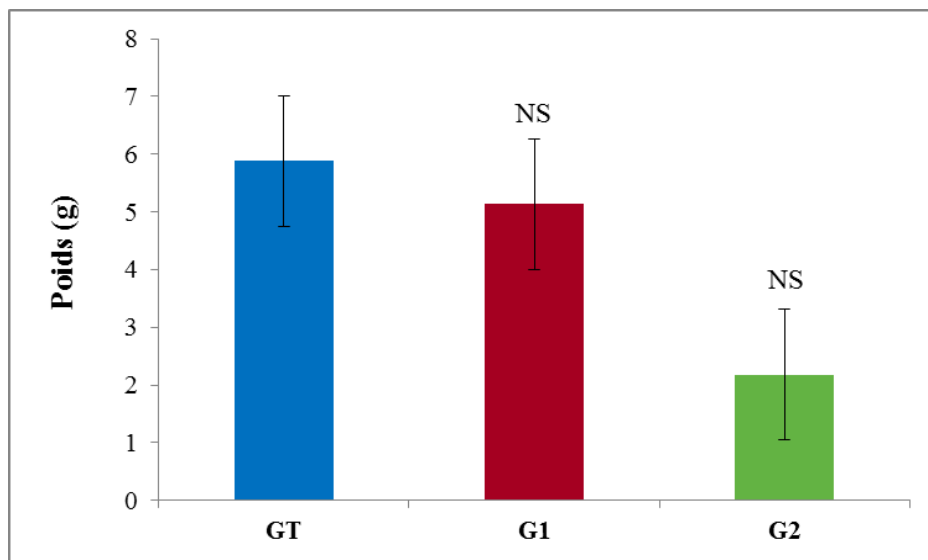


Figure 16: Evolution de gain du poids chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine.
En comparaison avec témoin, NS: $P > 0.05$

Les résultats obtenus présentés dans la figure 16 montrent qu'il n'y a aucune différence significative ($P > 0.05$) de gain du poids chez les deux groupes G1 et G2 par rapport au groupe témoin.

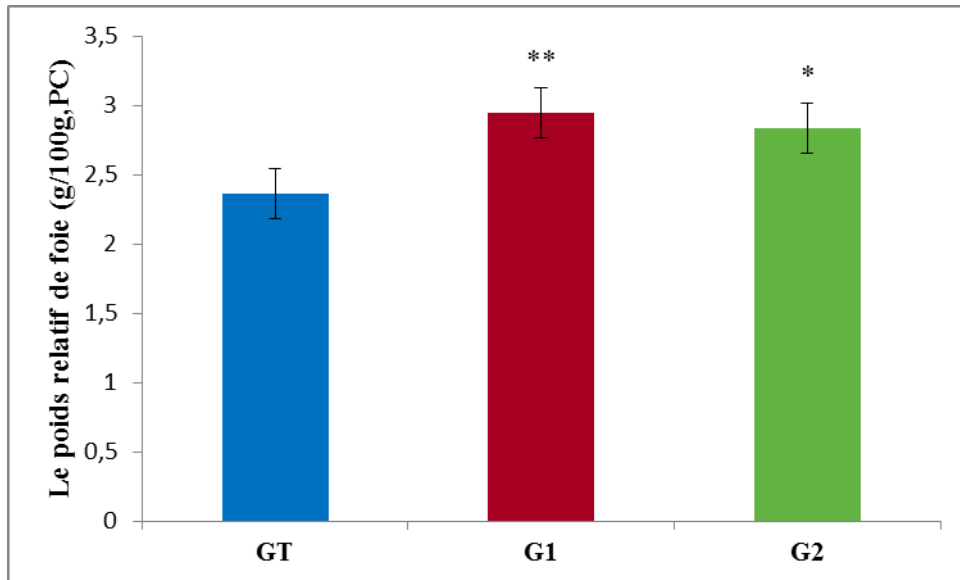


Figure 17: Evolution du poids relatif de foie chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 17 montrent que le poids relatif de foie est augmentée de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le G1 contaminé par (6,44 mg/kg) de métribuzine et augmentée de façon significative ($P < 0.05$) chez le G2 contaminé par (3,22 mg/kg) de métribuzine par rapport au lot témoin.

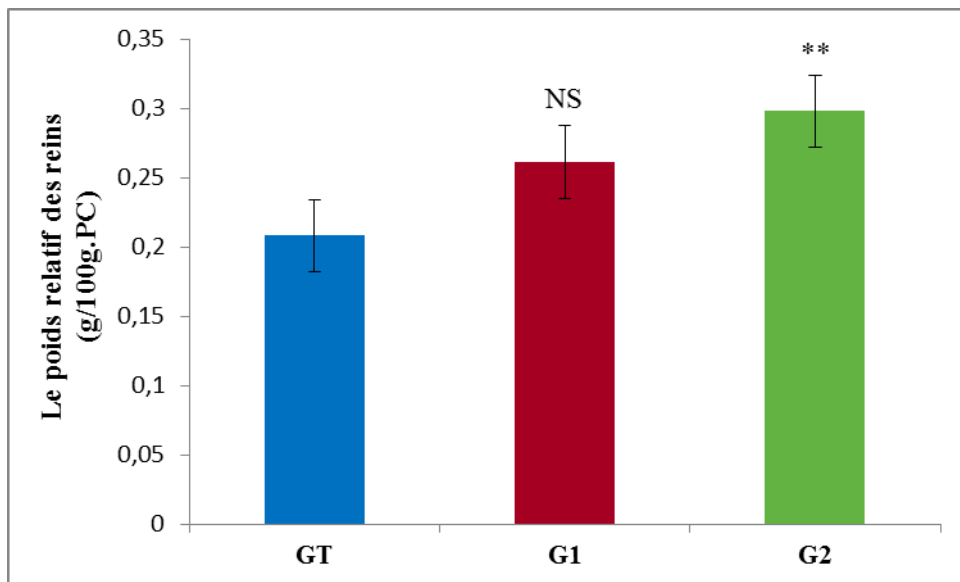


Figure 18: Evolution du poids relatif des reins chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 18 montrent que le poids relatif des reins est augmentée de façon hautement significative ($P < 0.01$) et qu'il n'y a aucune variation significative ($P > 0.05$) chez les lots Traités (G1 et G2) respectivement par rapport au lot témoin.

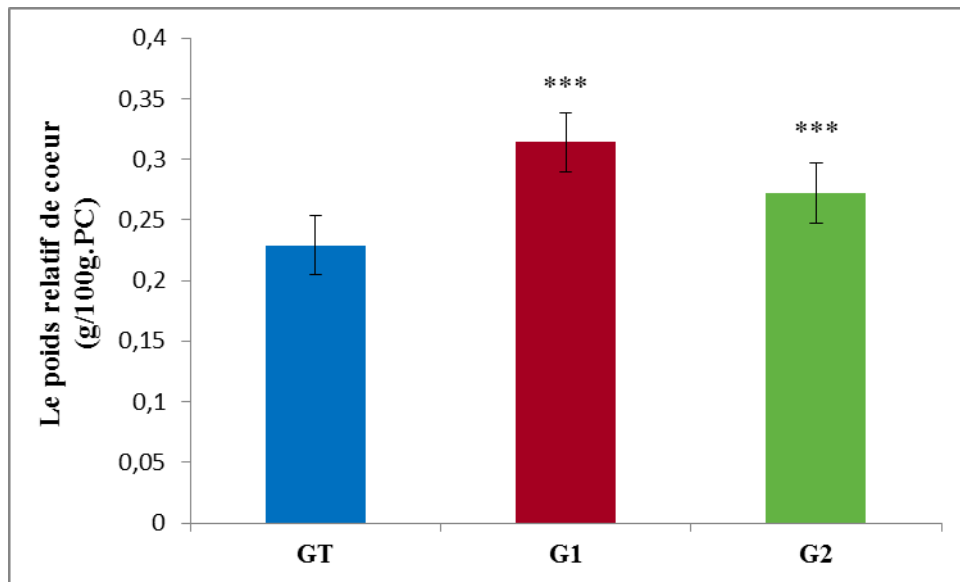


Figure 19: Evolution du poids relatif de cœur chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, ***: $P < 0.001$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 19 montrent que le poids relatif de cœur est augmentée de façon très hautement significative ($P < 0.001$) chez les lots Traités par rapport au lot témoin.

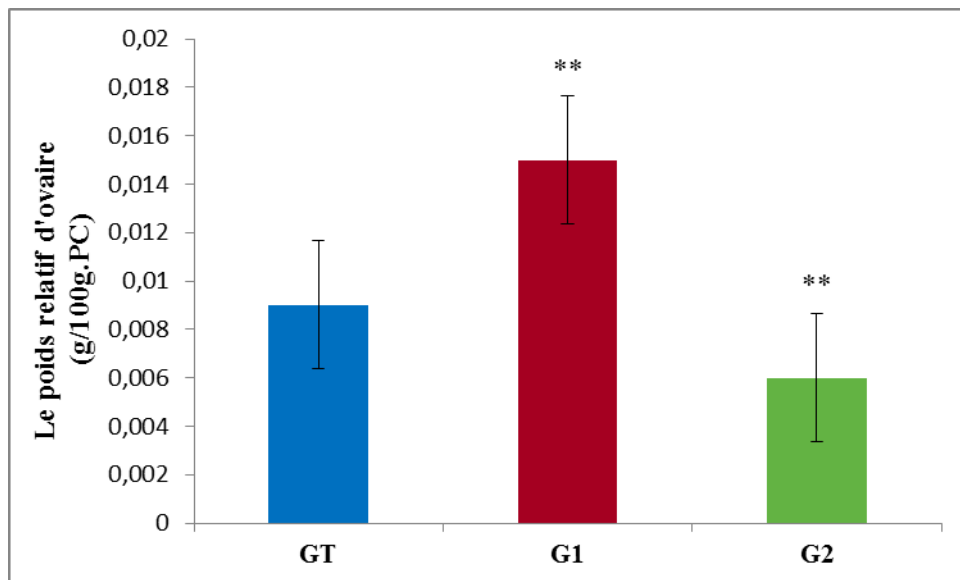


Figure 20: Evolution du poids relatif d'ovaire chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 20 montrent que le poids relatif d'ovaire est augmentée de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le G1 et diminuée de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le G2 par rapport au groupe témoin.

2. Effet de la métribuzine sur des paramètres de reproduction

Tableau 6: Variation des paramètres de reproduction chez les lapins témoins et traités par la métribuzine.

Les groupes	GT	G1	G2
Taux de fertilité (%)	75	75	25
Nbr de fœtus	5.00 ± 1.15	5.00 ± 1.00	0
Taux de mortalité (%)	0	25	25

Les résultats obtenus de tableau 6 montrent qu'il y a une diminution du taux de fertilité chez le groupe 2 par rapport au groupe témoin, et une diminution du nombre de fœtus au groupe 1, tandis qu'il n'y a aucune fœtus chez le groupe 2 par rapport au groupe témoin. On note aussi que le taux de mortalité est augmenté (25%) chez les deux groupes traités par la métribuzine par rapport au groupe témoin.

3. Effet de la métribuzine sur des paramètres biochimiques et hormonaux

Tableau 7: Concentration des paramètres biochimiques et hormonale chez les lapins témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement.

Les paramètres	Les groupes		
	Groupe T	Groupe 1	Groupe 2
	Moy ± ES	Moy ± ES	Moy ± ES
Glycémie (g/l)	1.090 ± 0.023	1,460 ± 0,088 ^{**}	1,056 ± 0,068 ^{NS}
Urée (g/l)	0,393 ± 0,035	0,430 ± 0,032 ^{NS}	0,336 ± 0,006 ^{NS}
Créatinine (g/l)	8,645 ± 0,950	8,333 ± 0,882 ^{NS}	8,910 ± 0,445 ^{NS}
TGO (UI/l)	24,67 ± 2,95	41,67 ± 8,66 [*]	56,0 ± 14,1 [*]
TGP (UI/l)	36,67 ± 1,88	64,33 ± 8,90 ^{**}	98,0 ± 25,0 ^{**}
Estradiol (pmol/L)	123,59 ± 5,28	114,13 ± 7,95 ^{NS}	74,34 ± 3,58 ^{***}

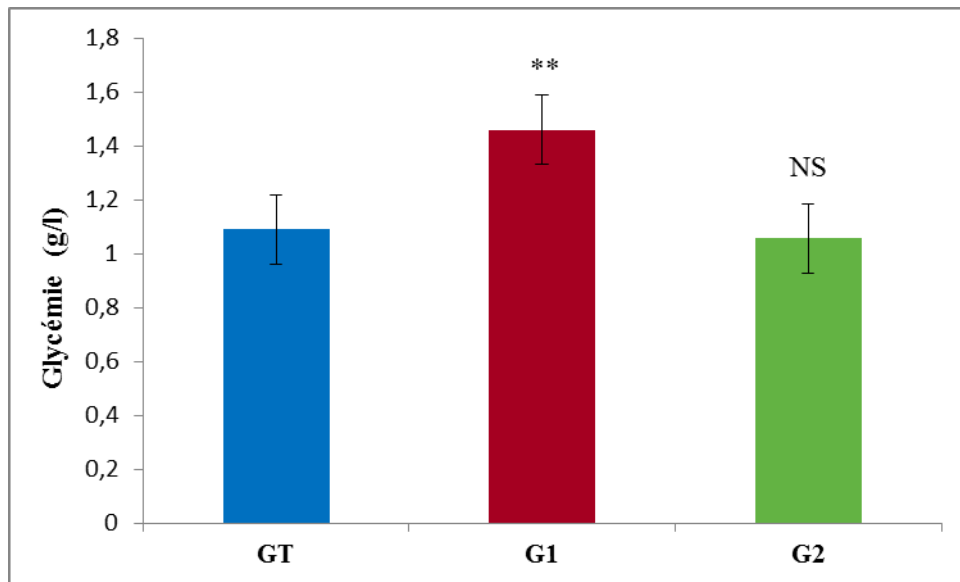


Figure 21: Variation de la concentration sérique du glucose chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 21 montrent que la glycémie est augmentée de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le groupe contaminé par 6,44 mg/kg de métribuzine et qu'il n'y a aucune variation significative ($P > 0.05$) chez le groupe contaminé par 3,22 mg/kg de métribuzine par rapport au lot témoin.

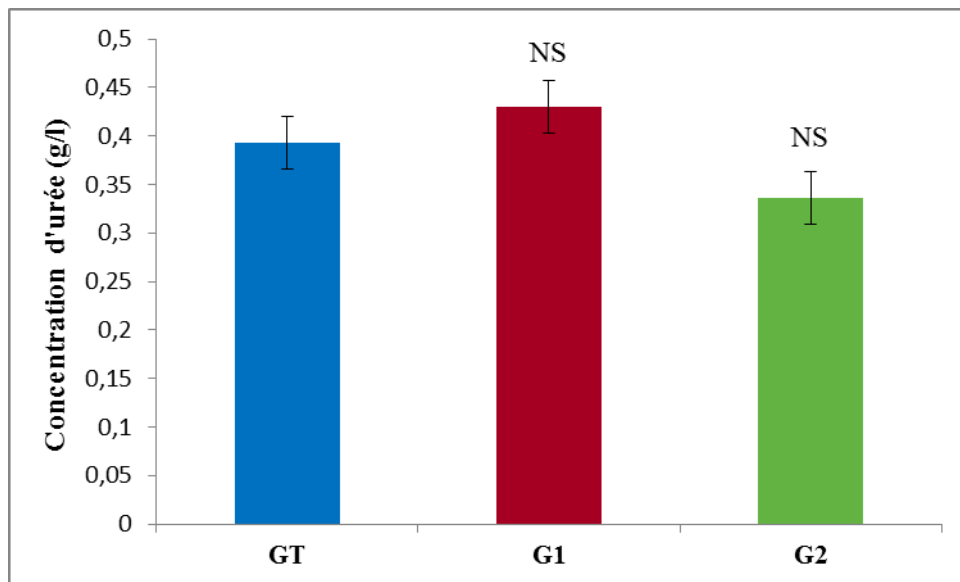


Figure 22: Variation de la concentration d'urée chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 22 montrent qu'il n'y a aucune différence significative ($P > 0.05$) de la concentration sérique d'urée chez les lots traités (G1 et G2) par rapport au lot témoin.

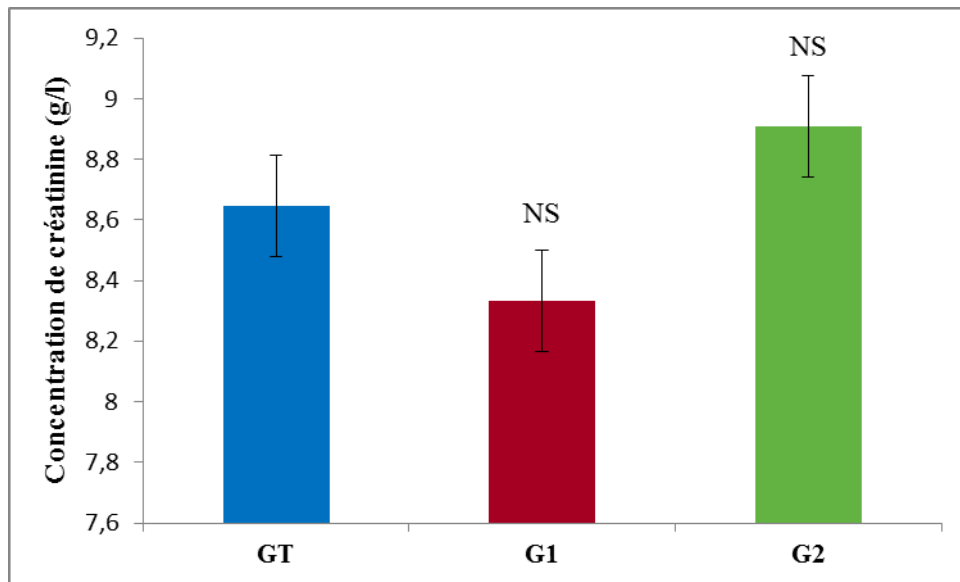


Figure 23: Variation de la concentration sérique de créatinine chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 23 montrent qu'il n'y a aucune variation significative ($P > 0.05$) de la concentration sérique de créatinine chez les lots traités (G1 et G2) par rapport au lot témoin.

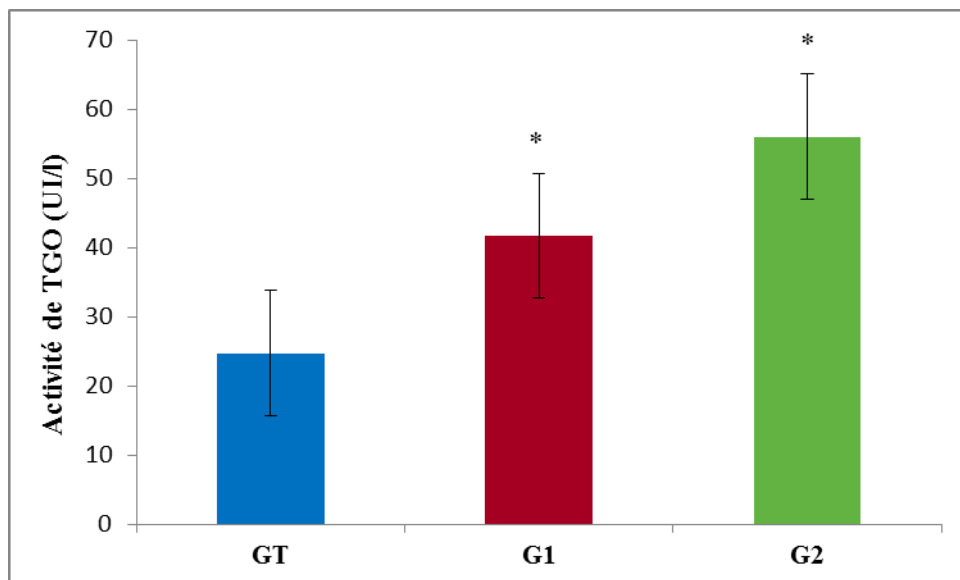


Figure 24: Variation de l'activité de TGO chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 24 montrent que l'activité de TGO est augmentée de façon significative ($P < 0.05$) chez les lots traités (G1 et G2) par rapport au lot témoin.

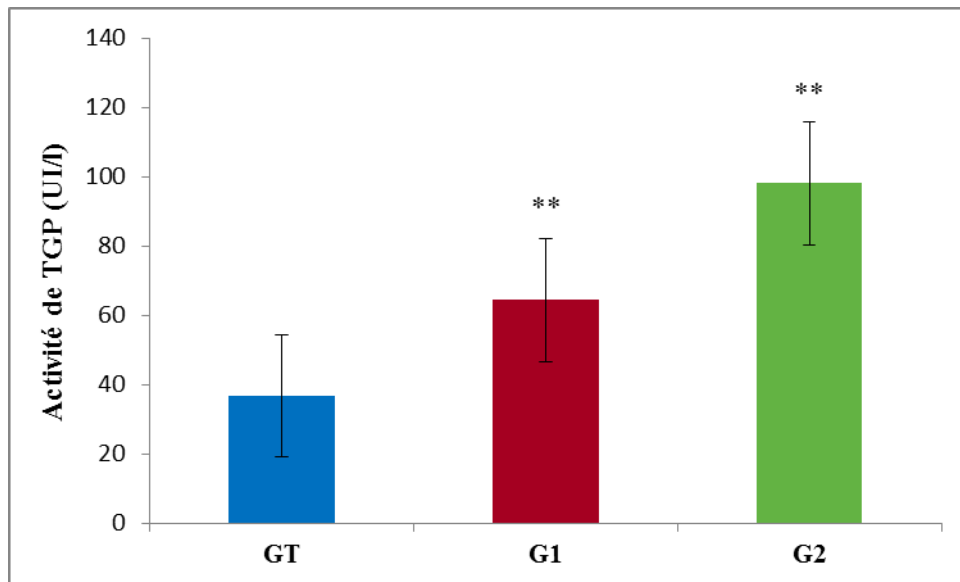


Figure 25: Variation de l'activité de TGP chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 25 montrent que l'activité de TGP est augmenté de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez les deux groupes traités (G1 et G2) par rapport au groupe témoin.

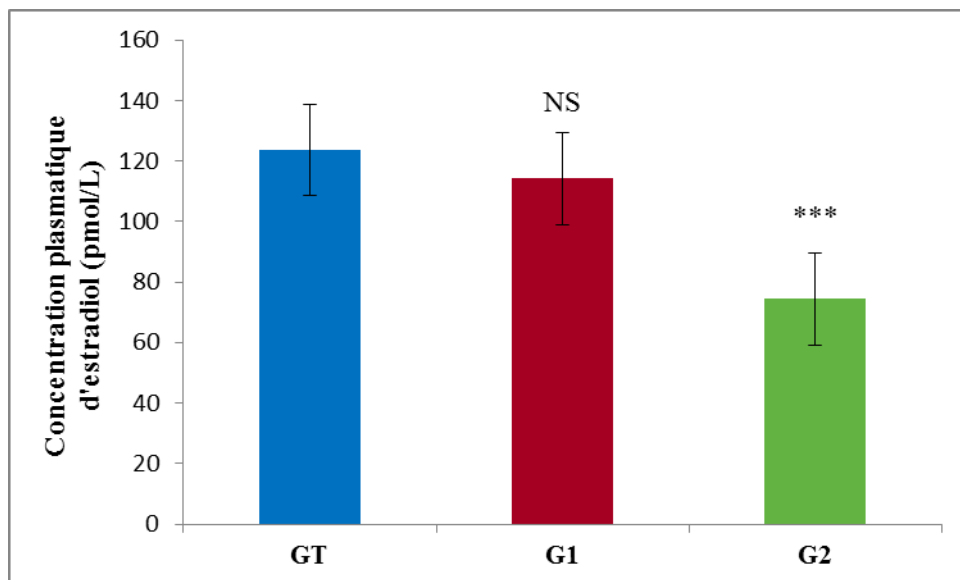


Figure 26: Variation de la concentration plasmatique d'estradiol chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, ***: $P < 0.001$; NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 26 montrent que la concentration plasmatique d'estradiol est diminuée de façon très hautement significative ($P < 0.05$) chez le groupe contaminé par 3,22 mg/kg de métribuzine et qu'il n'y a aucune différence significative ($P > 0.05$) chez le groupe contaminé par 6,44 mg/kg de la métribuzine par rapport le groupe témoin.

4. Effet de la métribuzine sur des paramètres de stress oxydatif tissulaires

Tableau 8: La concentration de Malondialdéhyde (MDA) ($\mu\text{mol/g}$ tissus) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement.

Les organes	Groupe T	Groupe 1	Groupe 2
	Moy \pm ES	Moy \pm ES	Moy \pm ES
Foie	0,06527 \pm 0,00528	0,1081 \pm 0,0122 **	0,1359 \pm 0,0240 *
Rein	0,08927 \pm 0,00983	0,1329 \pm 0,0261 *	0,1248 \pm 0,0102 **
Cœur	0,09021 \pm 0,00770	0,09849 \pm 0,00830 *	0,1089 \pm 0,0188 NS
Ovaire	0,2535 \pm 0,0386	0,596 \pm 0,161 NS	1,5242 \pm 0,0923 ***

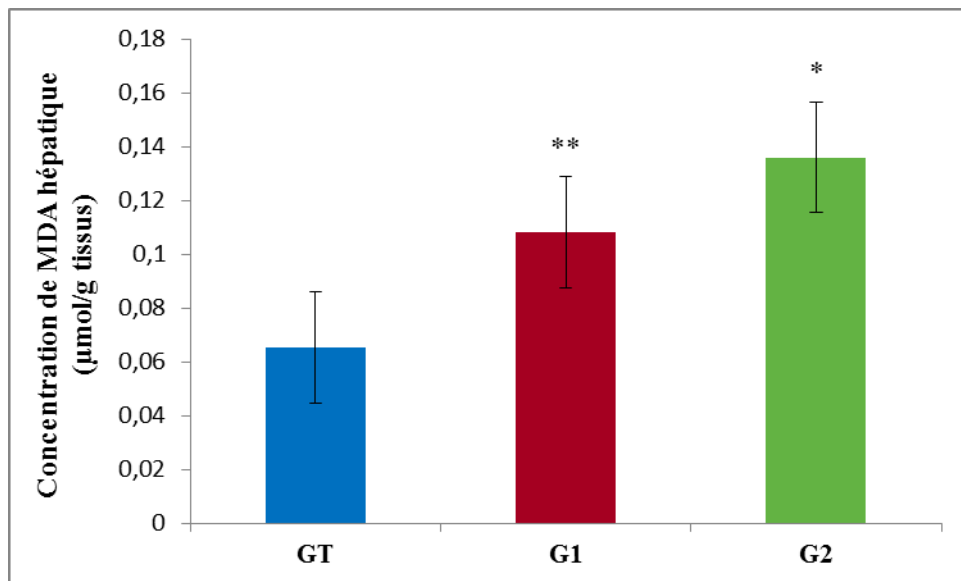


Figure 27: Variation de la concentration de MDA hépatique chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 27 montrent que la concentration de MDA hépatique est augmentée de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le lot 1 et augmentée de façon significative ($P < 0.05$) chez le lot 2 par rapport au lot témoin.

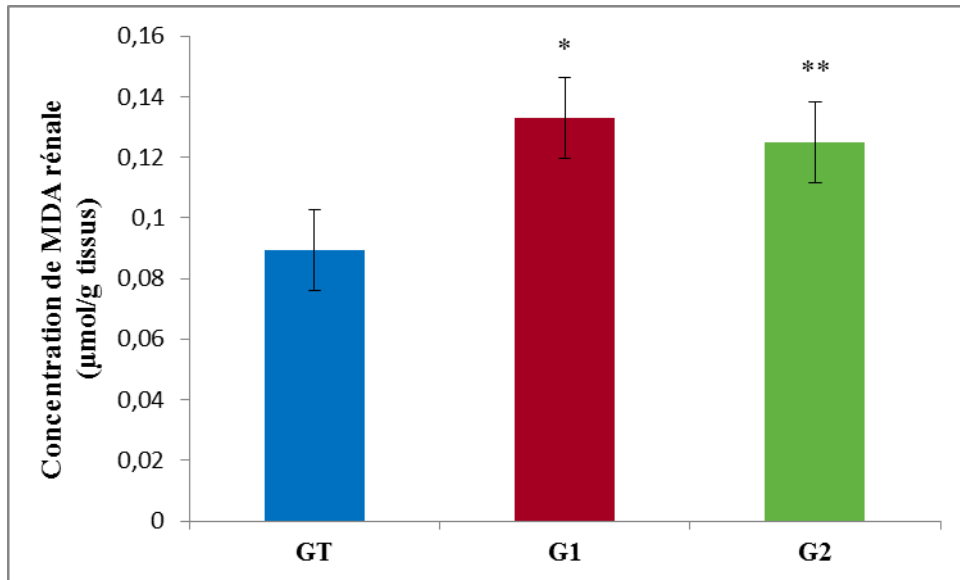


Figure 28: Variation de la concentration de MDA rénale chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 28 montrent que la concentration de MDA rénale est augmentée de façon significative ($P < 0.05$) et de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le G1 et G2 respectivement par rapport au groupe témoin.

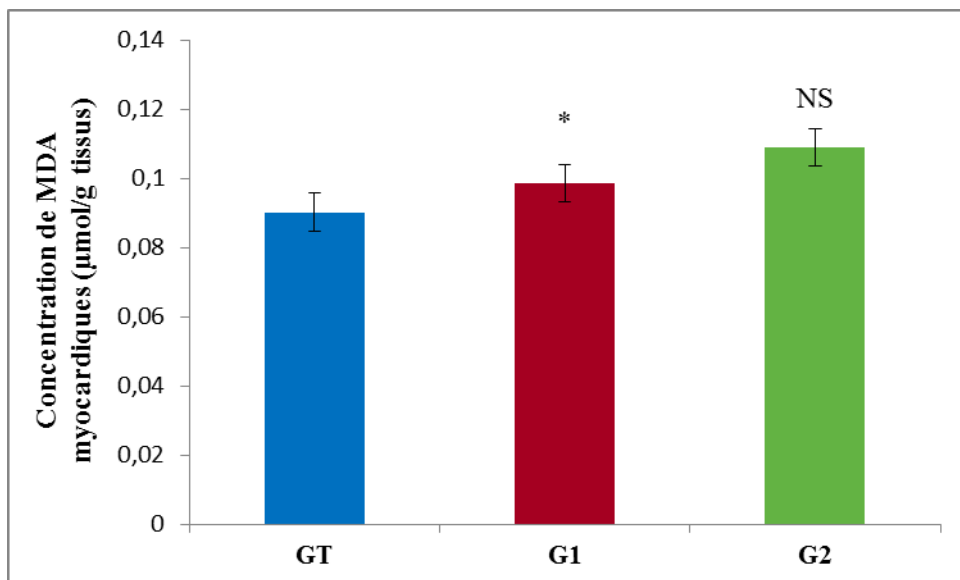


Figure 29: Variation de la concentration de MDA myocardiques chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, *: $P < 0.05$; NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 29 montrent que la concentration de MDA myocardiques est augmenté de façon significative ($P < 0.05$) chez le groupe contaminé par 6,44 mg/kg de métribuzine et qu'il n'y a pas une différence significative ($P > 0.05$) chez le groupe contaminé par 3,22 mg/kg de métribuzine par rapport au groupe témoin.

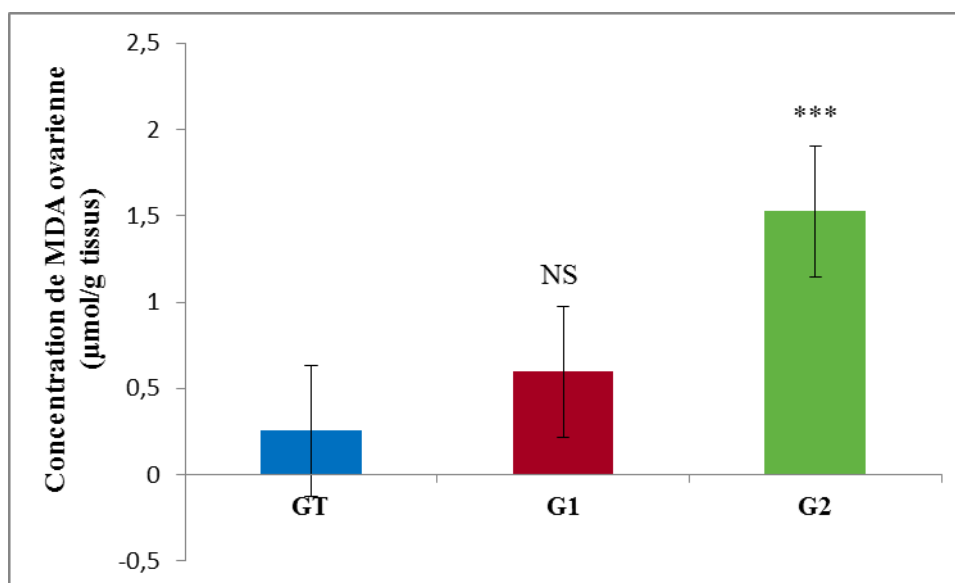


Figure 30: Variation de la concentration de MDA ovarienne chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, ***: $P < 0.001$; NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 30 montrent que la concentration de MDA ovarienne est augmenté de façon très hautement significative ($P < 0.001$) chez le lot 2 et qu'il n'y a pas une différence significative ($P > 0.05$) chez le lot 1 par rapport au lot témoin.

Tableau 9: Concentration de Glutathion réduit (GSH) (nmol/mg protéine) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement.

Les organes	Groupe T	Groupe 1	Groupe 2
	Moy \pm ES	Moy \pm ES	Moy \pm ES
Foie	20.01 \pm 2,7	24.27 \pm 3,84 *	28.50 \pm 5,38. *
Rein	15.36 \pm 0.96	25.25 \pm 3.47 *	27.06 \pm 2.34 ***
Cœur	23.33 \pm 1.74	17.32 \pm 2.45 *	18.82 \pm 1.89 *
Ovaire	39.48 \pm 7.53	125.8 \pm 29.1 *	82.1 \pm 17.3 **

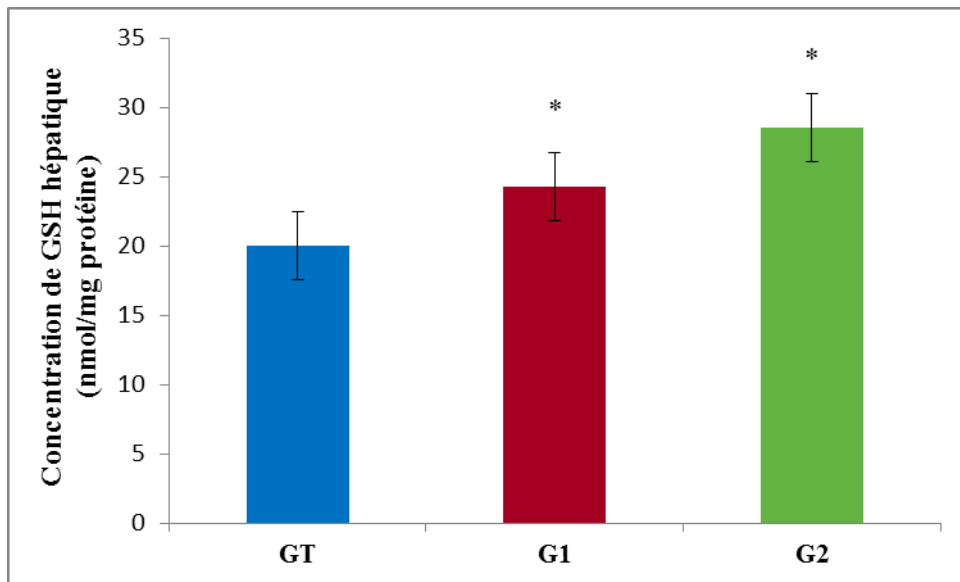


Figure 31: Variation de la concentration de GSH hépatique chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 31 montrent que la concentration de GSH hépatique est augmenté de façon significative ($P < 0.05$) chez les lots traités par rapport au lot témoin.

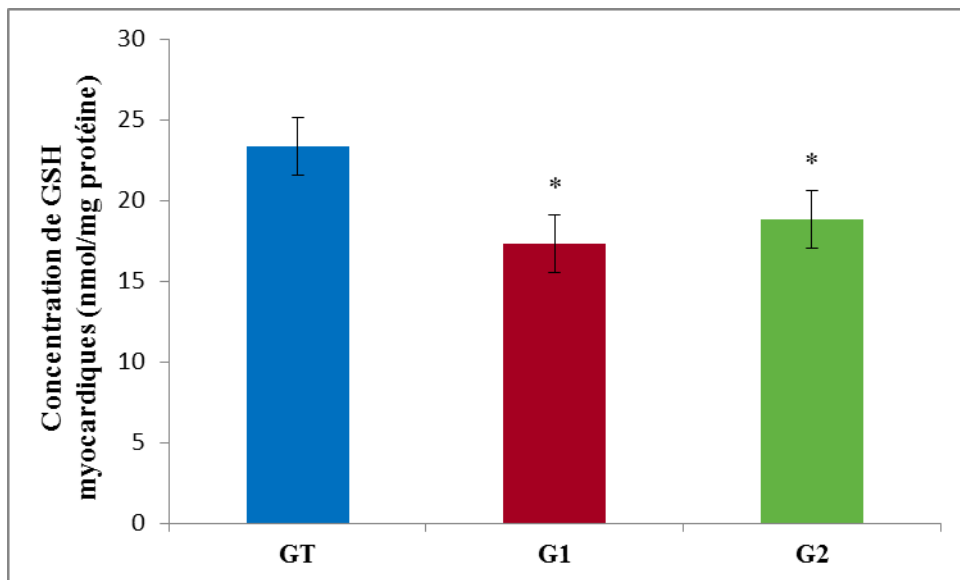


Figure 32: Variation de la concentration de GSH myocardiques chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 32 montrent que la concentration de GSH myocardiques est diminuée de façon significative ($P < 0.05$) chez les groupes 1 et 2 par rapport au groupe témoin.

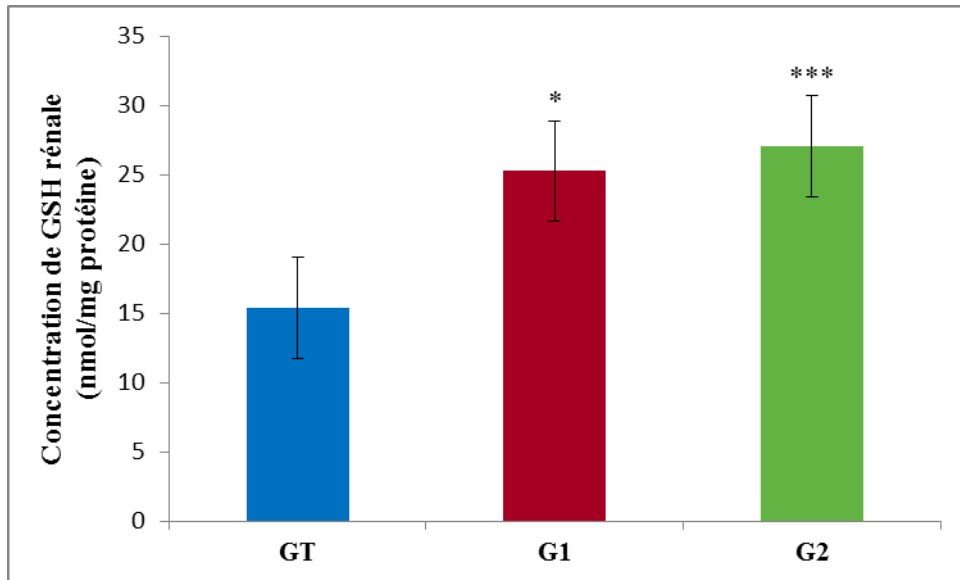


Figure 33: Variation de la concentration de GSH rénale chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, ***: $P < 0.001$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 33 montrent que la concentration de GSH rénale est augmentée de façon significative ($P < 0.05$) chez le lot contaminé par 6,44 mg/kg de métribuzine, et augmentée de façon très hautement significative ($P < 0.001$) chez le lot contaminé par 3,22 mg/kg de métribuzine par rapport au groupe témoin.

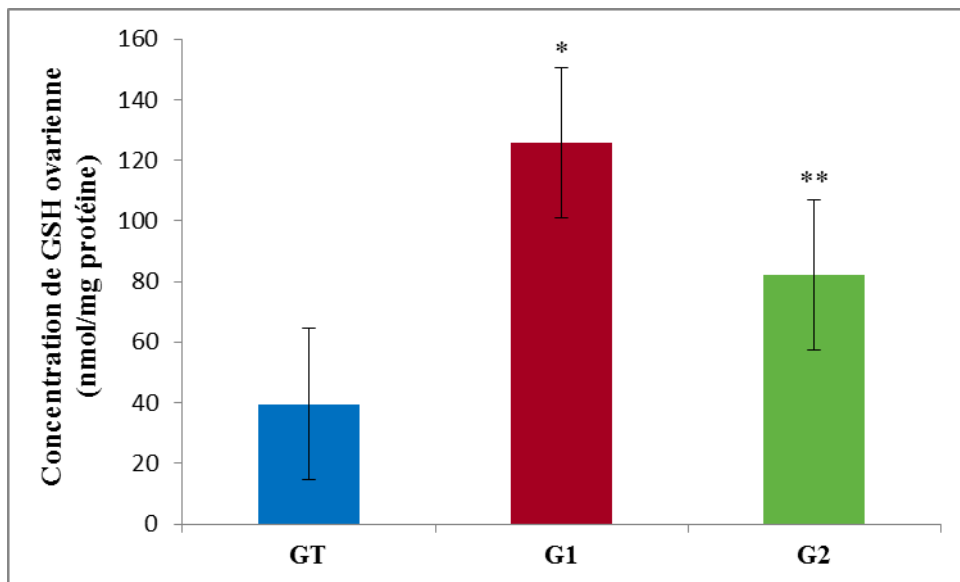


Figure 34: Variation de la concentration de GSH ovarienne chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 34 montrent que la concentration de GSH ovarienne est augmentée de façon significative chez les lots traités par rapport au groupe témoin.

Tableau 10: Activité de Glutathion S-Transférase (GST) (nmol/min/mg protéine) dans les organes (Foie, rein, cœur et ovaire) chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement.

Les organes	Groupe T	Groupe 1	Groupe 2
	Moy ± ES	Moy ± ES	Moy ± ES
Foie	1223 ± 97.3	2168 ± 205 ^{***}	1298 ± 123 [*]
Rein	367.4 ± 81.9	699 ± 125 [*]	459.4 ± 11.5 ^{***}
Cœur	108.8 ± 28.4	124.5 ± 31.4 ^{NS}	46.6 ± 10.1 [*]
Ovaire	708 ± 157	665.4 ± 42 ^{NS}	1558 ± 320 ^{**}

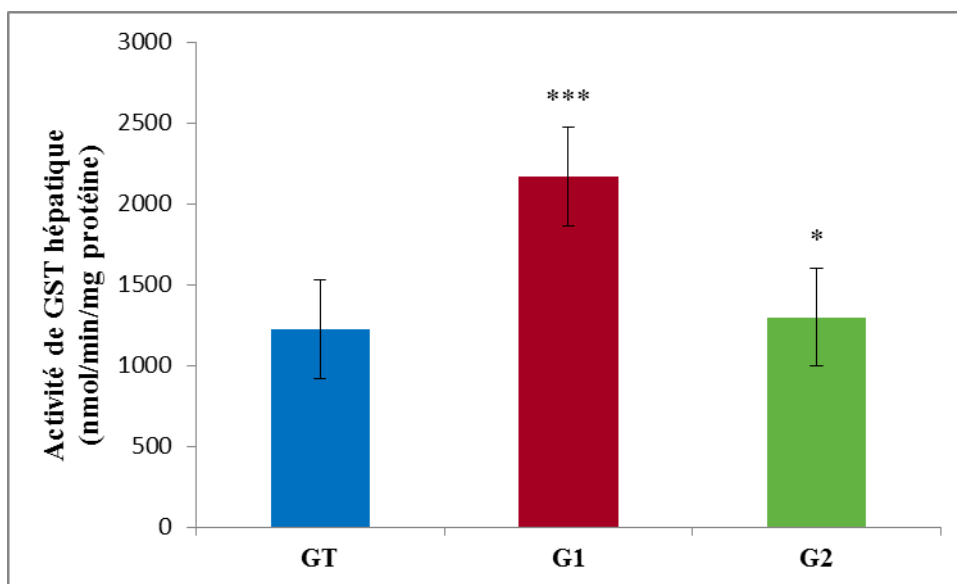


Figure 35: Variation de l'activité de GST hépatique chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, ***: P<0.001; *: P<0.05.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 35 montrent que l'activité de GST hépatique est augmentée de façon très hautement significative (P<0.001) chez le groupe contaminé par 6,44 mg/kg de métribuzine et augmentée de façon significative (P<0.05) chez le groupe contaminé par 3,22 mg/kg de métribuzine par rapport au lot témoin.

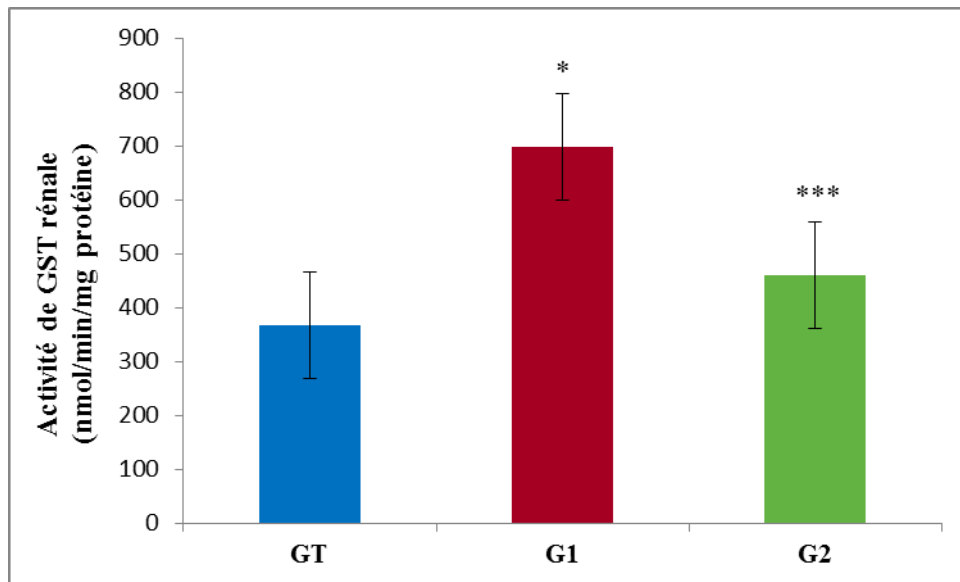


Figure 36: Variation de l'activité de GST rénale chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, ***: $P < 0.001$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 36 montrent que l'activité de GST rénale est augmentée de façon significative ($P < 0.05$) chez le lot 1 et augmentée de façon très hautement significative ($P < 0.001$) chez le lot 2 par rapport au lot témoin.

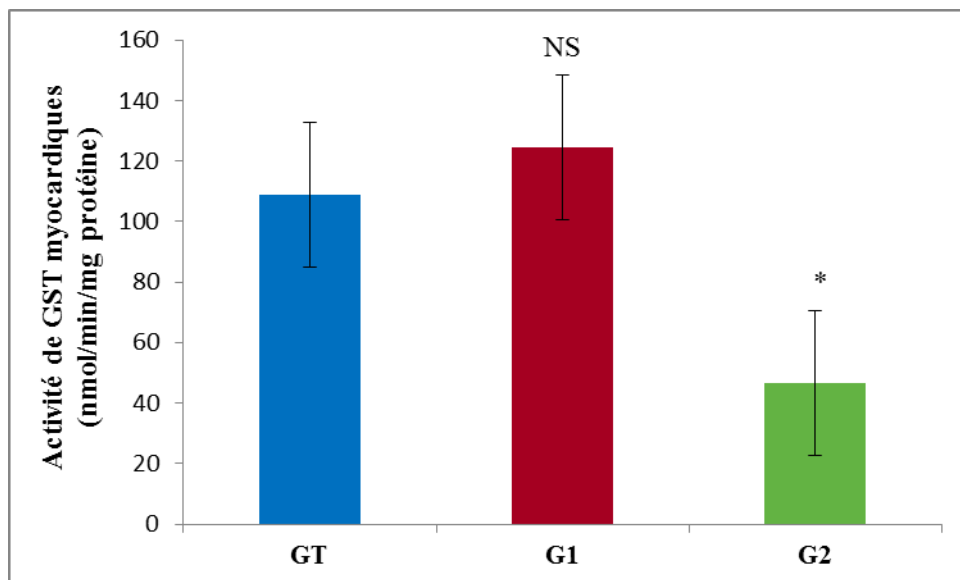


Figure 37: Variation de l'activité de GST myocardiques chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, *: $P < 0.05$; NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 37 montrent que l'activité de GST myocardiques est diminuée de façon significative ($P < 0.05$) chez le groupe 2 et qu'il n'y a aucune différence significative ($P > 0.05$) chez le groupe 1 par rapport au groupe témoin.

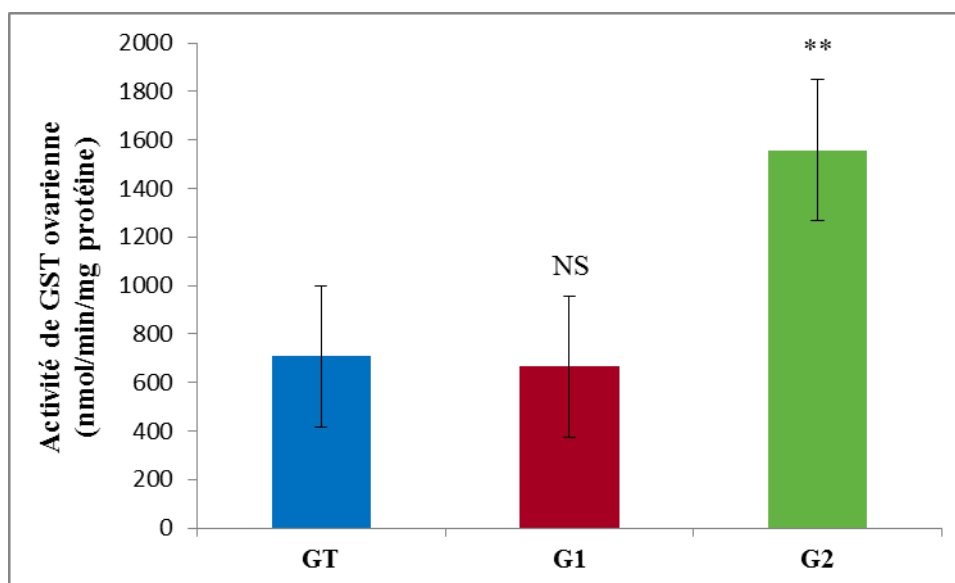


Figure 38: Variation de l'activité de GST ovarienne chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: P<0.01; NS: P>0.05.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 38 montrent que l'activité de GST ovarienne est augmentée de façon hautement significative (P<0.01) chez le lot contaminé par 3,22 mg/kg de métribuzine et qu'il n'y a aucune différence significative (P>0.05) chez le lot contaminé par 6,44 mg/kg de métribuzine par rapport au lot témoin.

5. Effet de la métribuzine sur des paramètres hématologiques

Tableau 11: Variation des paramètres hématologiques chez les lapines témoins et traités par la métribuzine après 2 mois de traitement.

Les paramètres	Les groupes		
	Groupe T	Groupe 1	Groupe 2
	Moy ± ES	Moy ± ES	Moy ± ES
Nbr de lymphocyte (µl)	7467 ± 485	8933 ± 238 **	9600 ± 231 **
GB (µl)	10767 ± 259	18767 ± 2682 *	18450 ± 1184 **
GR (µl)	5,4.10 ⁶ ± 1,1.10 ⁵	5,3.10 ⁶ ± 1,6.10 ⁵ NS	5,06.10 ⁶ ± 4,9.10 ⁵ NS
HB (g/dl)	11,533 ± 0,211	11,233 ± 0,306 *	11,000 ± 0,924 NS
PLA (µl)	313333 ± 32509	383333 ± 27735 **	531500 ± 115181 *

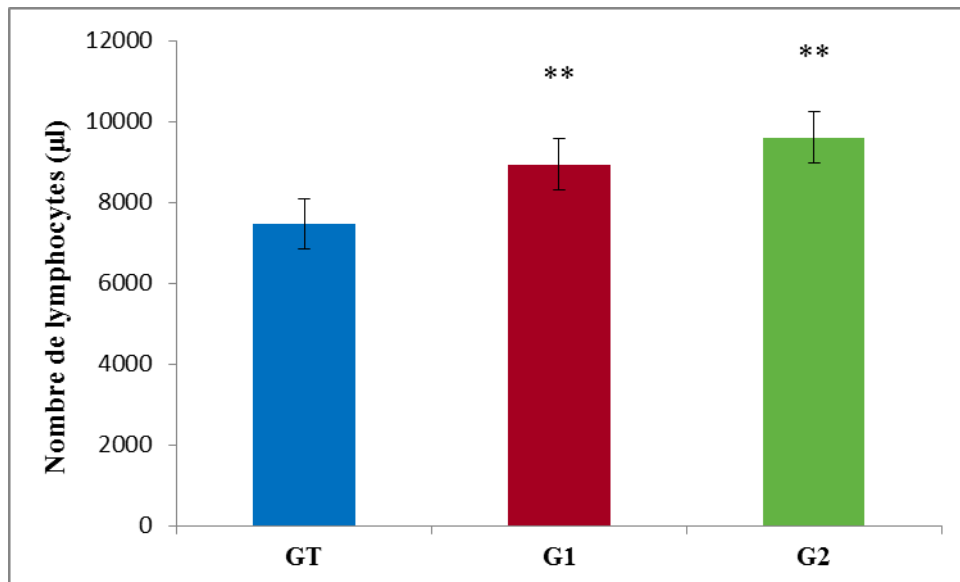


Figure 39: Variation de nombre de lymphocytes chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 39 montrent que le nombre de lymphocytes est augmenté de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez les lots traités par rapport au lot témoin.

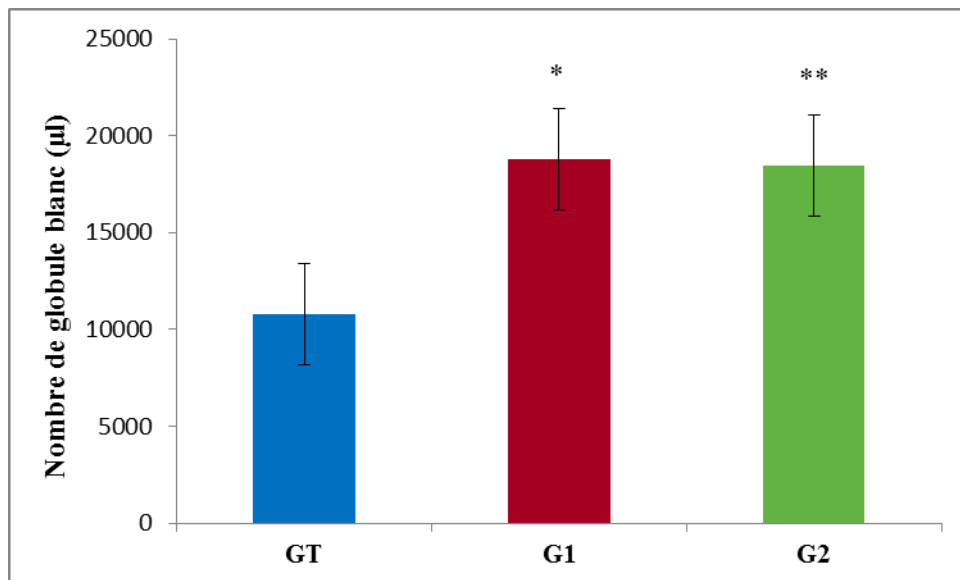


Figure 40: Variation de nombre des globules blancs chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 40 montrent que le nombre des globules blanc est augmenté de façon significative ($P < 0.05$) chez le lot contaminé par 6,44 mg/kg de métribuzine, et augmenté de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le lot contaminé par 3,22 mg/kg de métribuzine par rapport au groupe témoin.

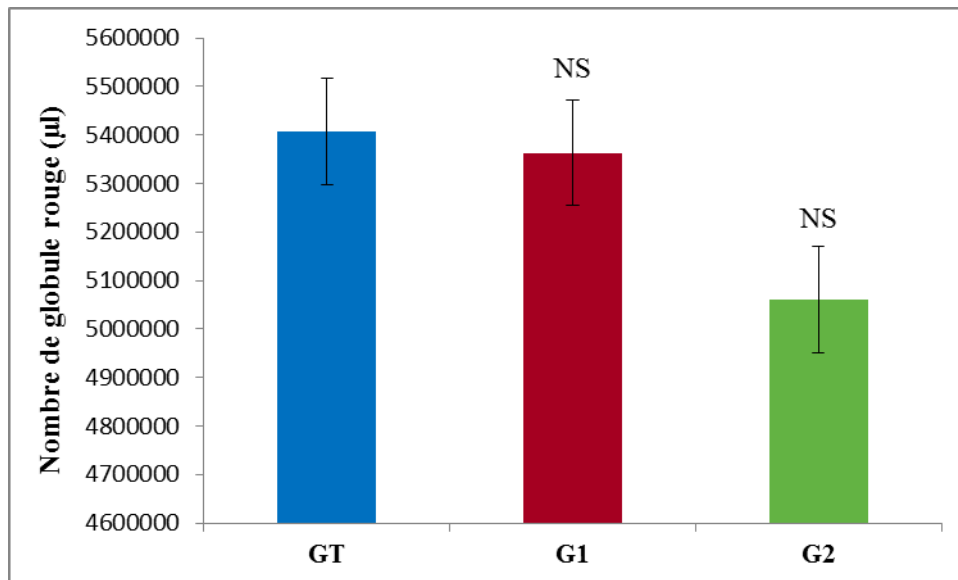


Figure 41: Variation de nombre des globules rouges chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 41 montrent qu'il n'y a aucune différence significative ($P > 0.05$) au nombre des globules rouges chez les lots traités (1 et 2) par rapport au lot témoin.

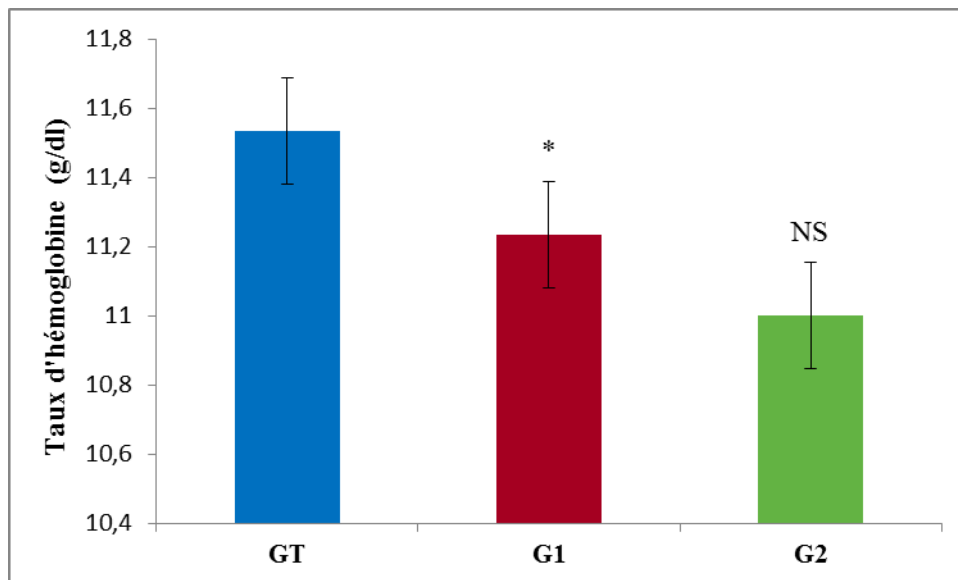


Figure 42: Variation de taux d'hémoglobine chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, *: $P < 0.05$; NS: $P > 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 42 montrent que le taux d'hémoglobine est diminué de façon significative ($P < 0.05$) chez lot 1 et qu'il n'y a aucune différence significative ($P > 0.05$) chez lot 2 par rapport au lot témoin.

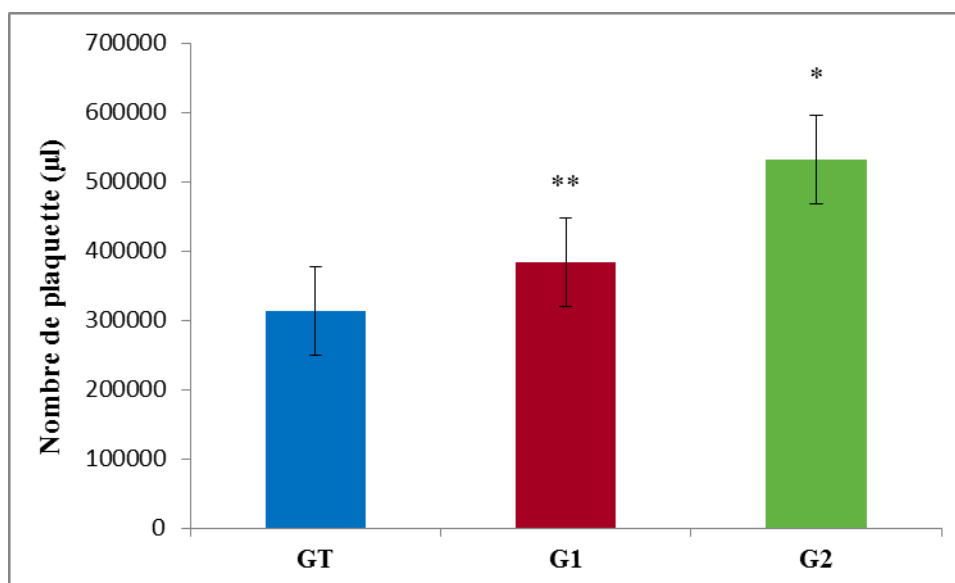


Figure 43: Variation de nombre de plaquette chez le lot témoin et les lots traités par la métribuzine. En comparaison avec témoin, **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 43 montrent que le nombre de plaquette est augmenté de façon hautement significative ($P < 0.01$) chez le groupe contaminé par 6,44 mg/kg de la métribuzine, et une augmentation significative ($P < 0.05$) chez le groupe contaminé par 3,22 mg/kg de la métribuzine par rapport au lot témoin.

6. La détection de la métribuzine au niveau les cellules hépatiques des lapins et des fœtus chez les lots traités

Tableau 12: Variation des temps de rétention (min) et de surface de pic (mV) de la métribuzine détecté dans les hépatocytes des lots traités par la métribuzine

		Temps de rétention	Surface de pic
	Métribuzine	5.422	22268375
Groupe 1	Lapine 1	5.492	39573
	Lapine 2	5.481	26225
	Lapine 3	5.467	5772
	Fœtus de lapine 3	5.437	441944
Groupe 2	Lapine 1	5.438	1167808
	Lapine 2	5.480	66879
	Lapine 3	5.497	33142

L'analyse de l'homogénat hépatique par HPLC montre clairement l'existence des traces de la métribuzine dans tous les lapins traités par 6,44 mg/kg et 3,22 mg/kg pendant 2 mois. Aussi on a observé qu'il existe des traces de la métribuzine dans le foie des fœtus de lapine 3 de groupe traité par 6,44 mg/kg de la métribuzine.

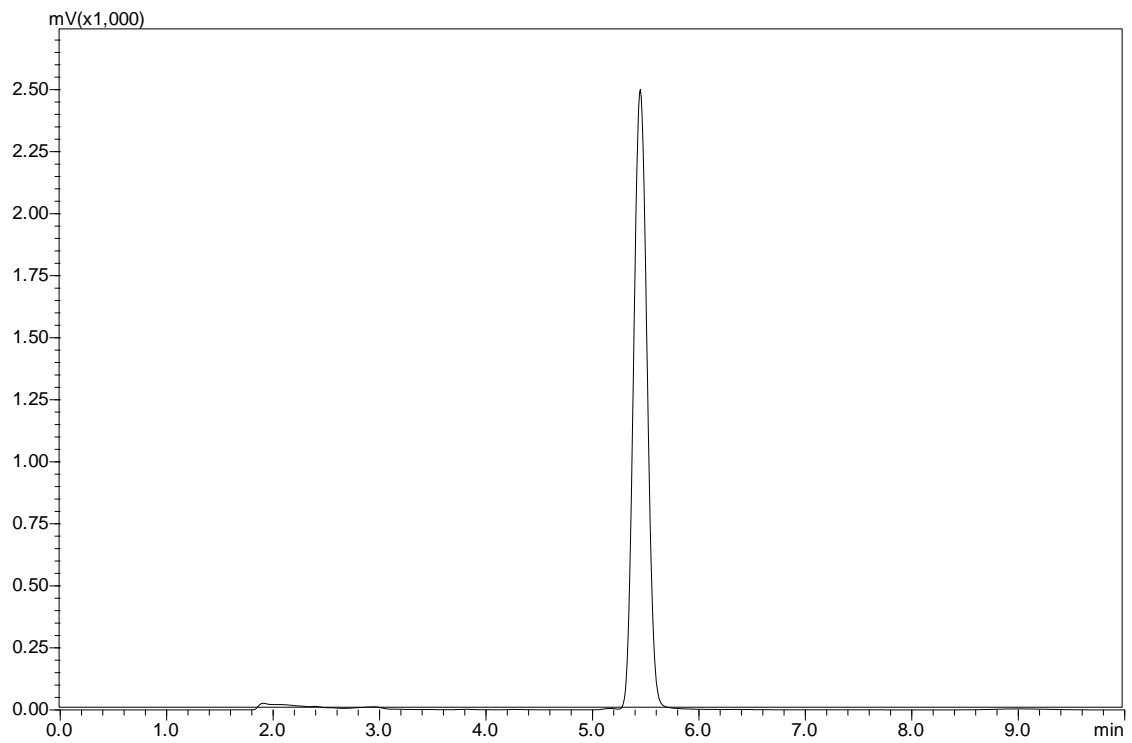


Figure 44: Chromatogramme de la métribuzine.

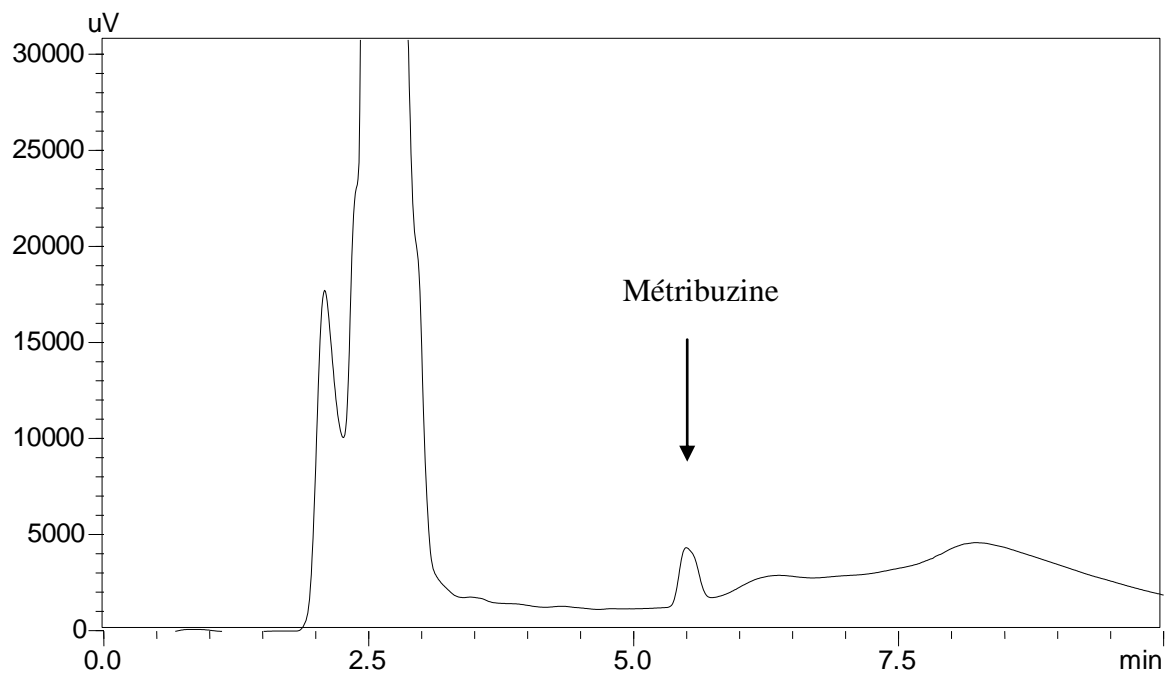


Figure 45: Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 1 (groupe 1).

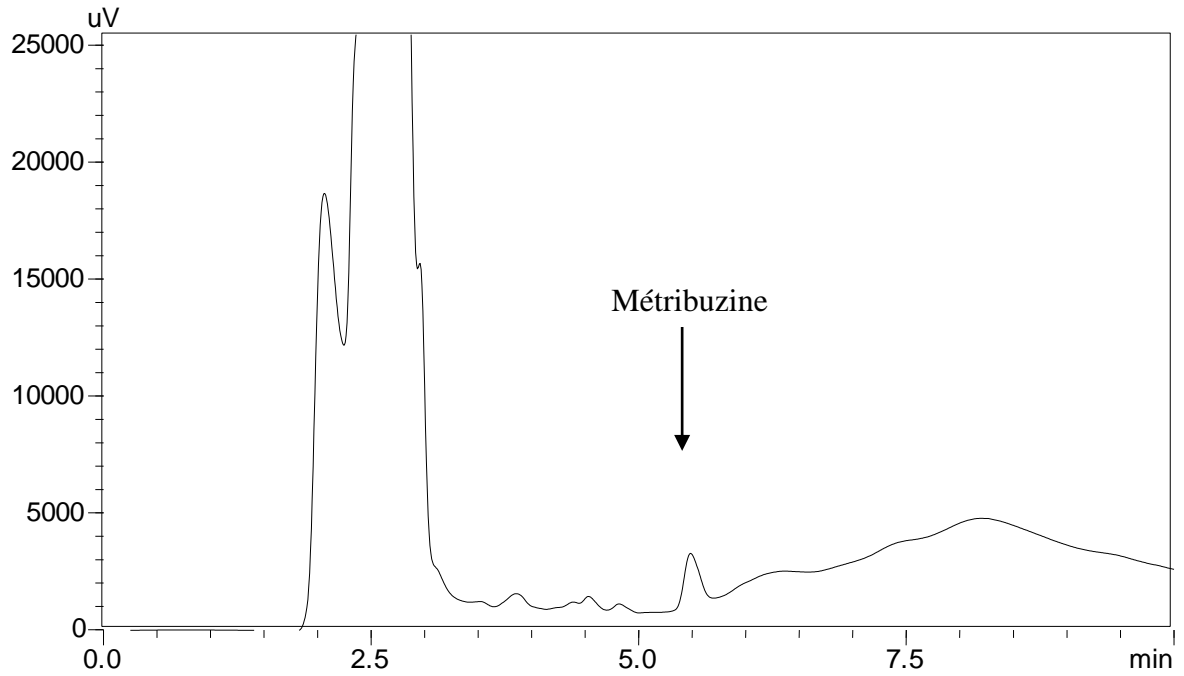


Figure 46: Chromatogramme de la méthimazine dans le foie de lapin 2 (groupe 1).

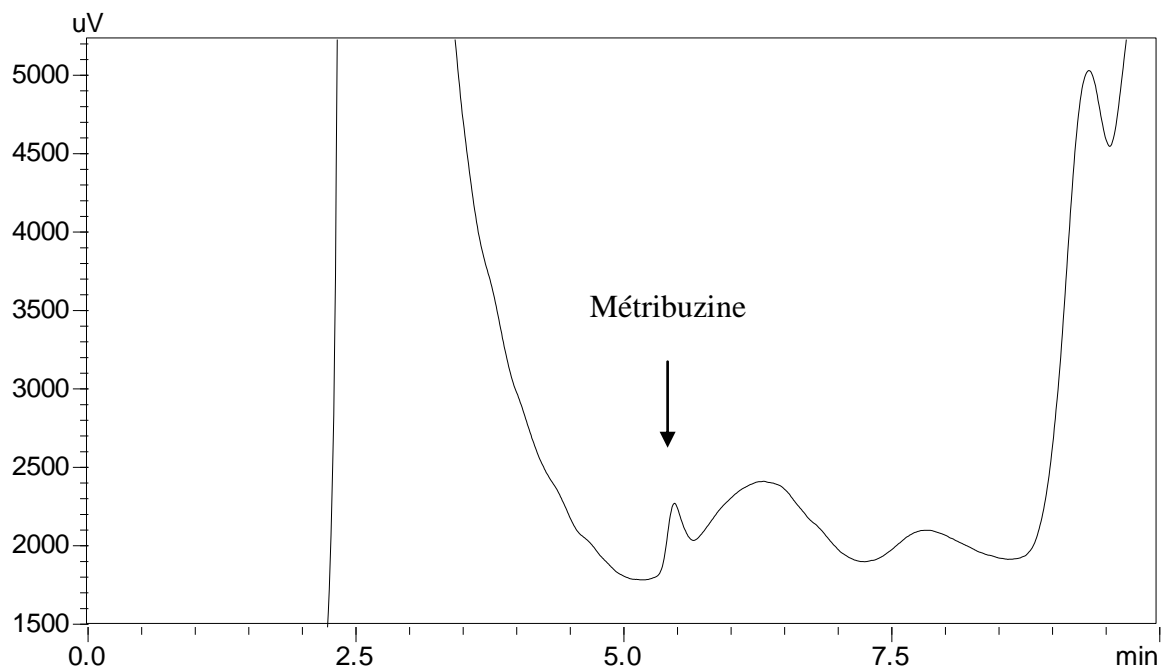


Figure 47: Chromatogramme de la méthimazine dans le foie de lapin 3 (groupe 1).

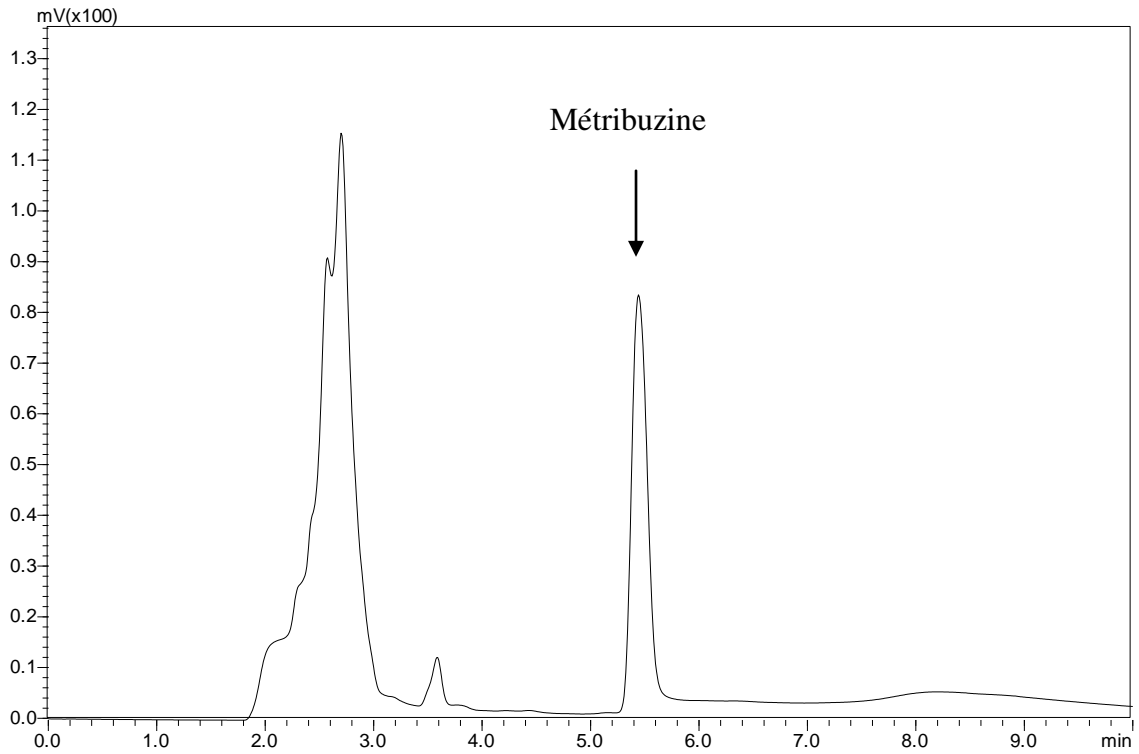


Figure 48: Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 1 (groupe 2).

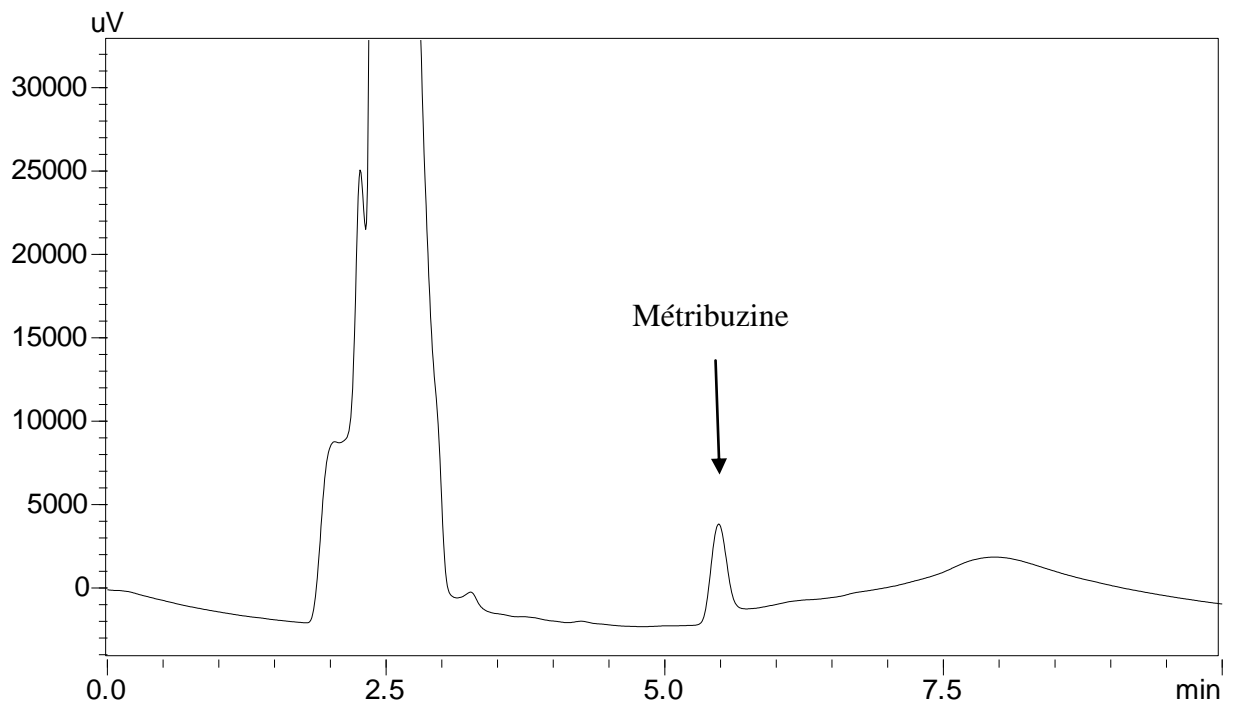


Figure 49: Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 2 (groupe 2).

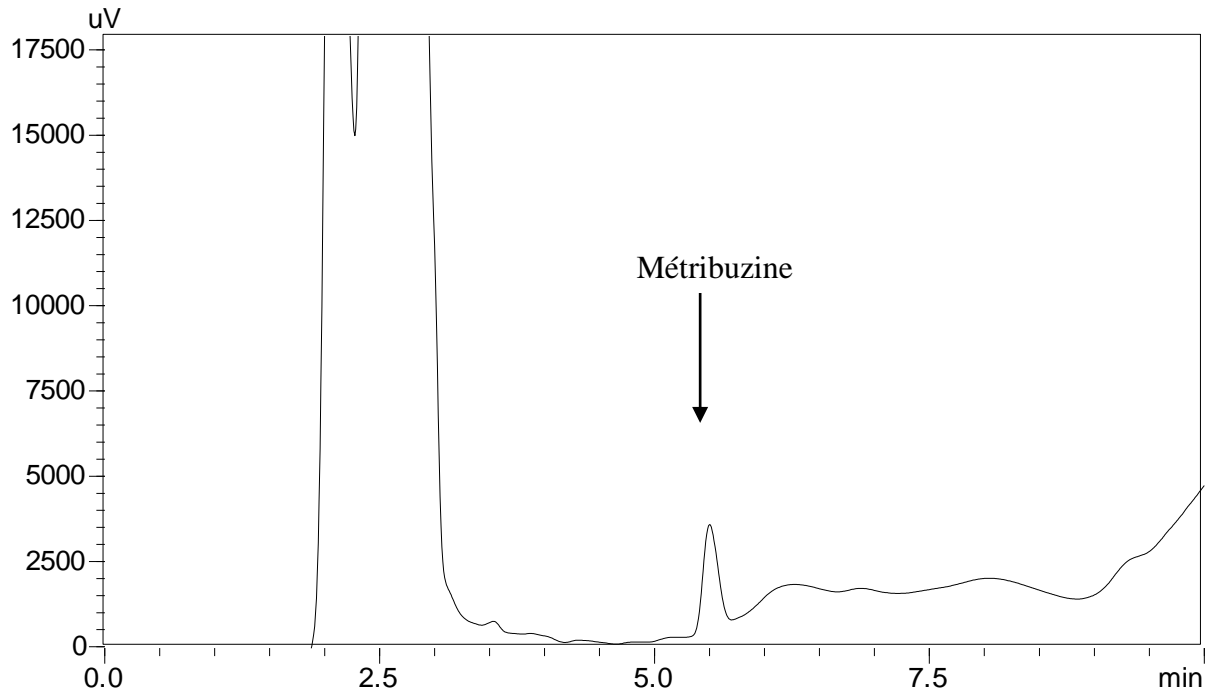


Figure 50: Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de lapin 3 (groupe 2).

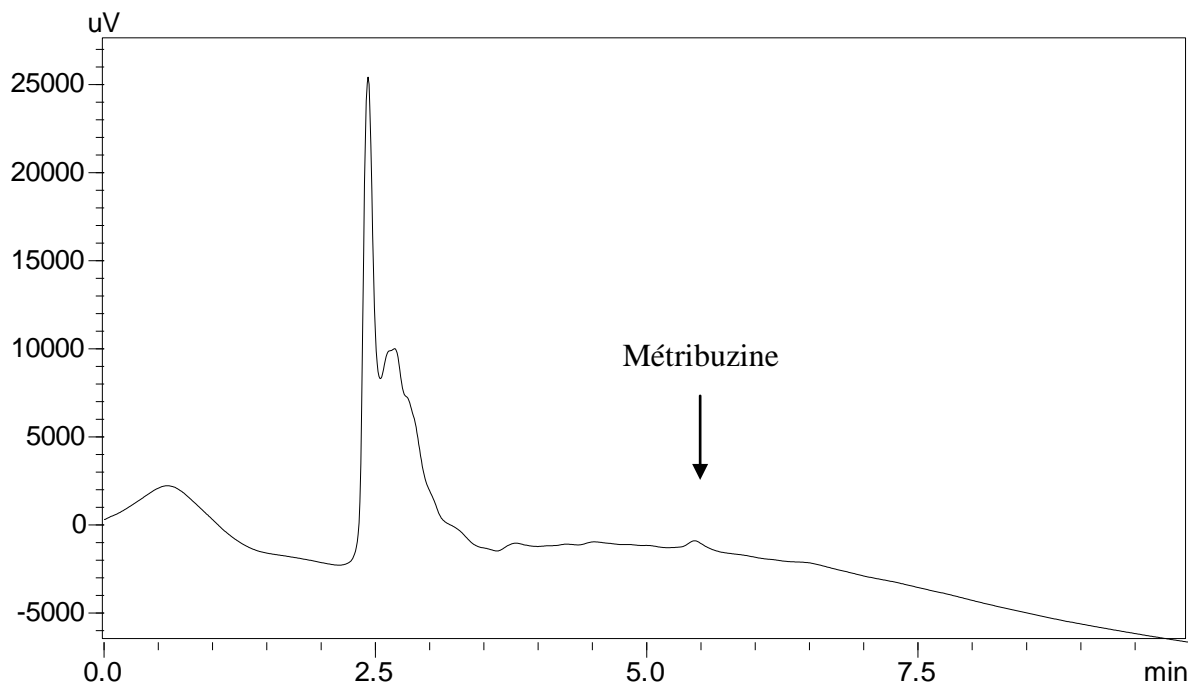


Figure 51: Chromatogramme de la métribuzine dans le foie de fœtus de lapine 3 (groupe1).

7. Etude histologique

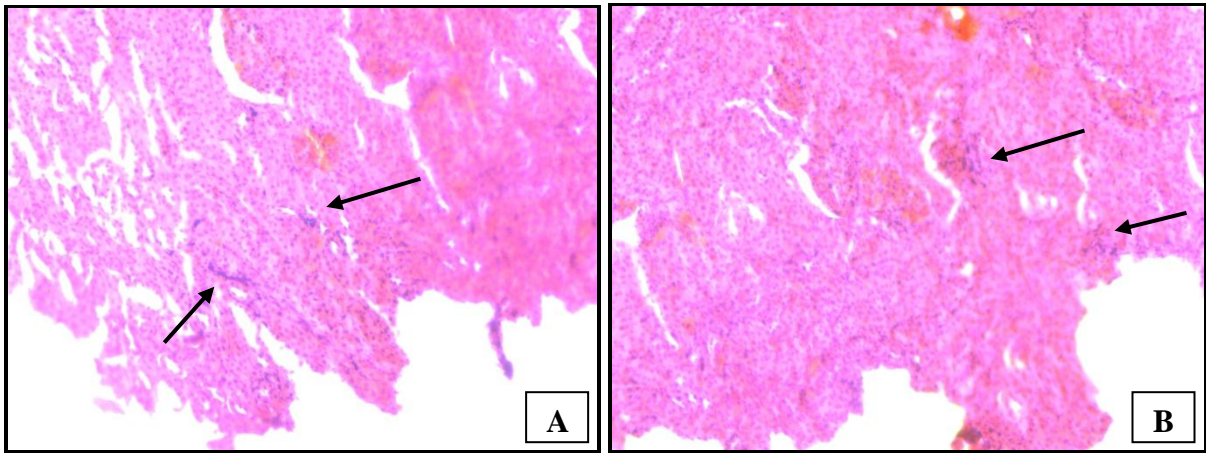


Figure 52: Coupe histologique du rein de lapine traité par 6,44 mg/kg de la métribuzine.
Coloration d'hématoxyline d'Harris éosine X 10.

A: → la figure présente une légère inflammation (les recueils lymphoïdes) ou des petits foyers d'inflammation (site 1). B: → la figure présente une légère inflammation (les recueils lymphoïdes) ou des petits foyers d'inflammation (site 2).

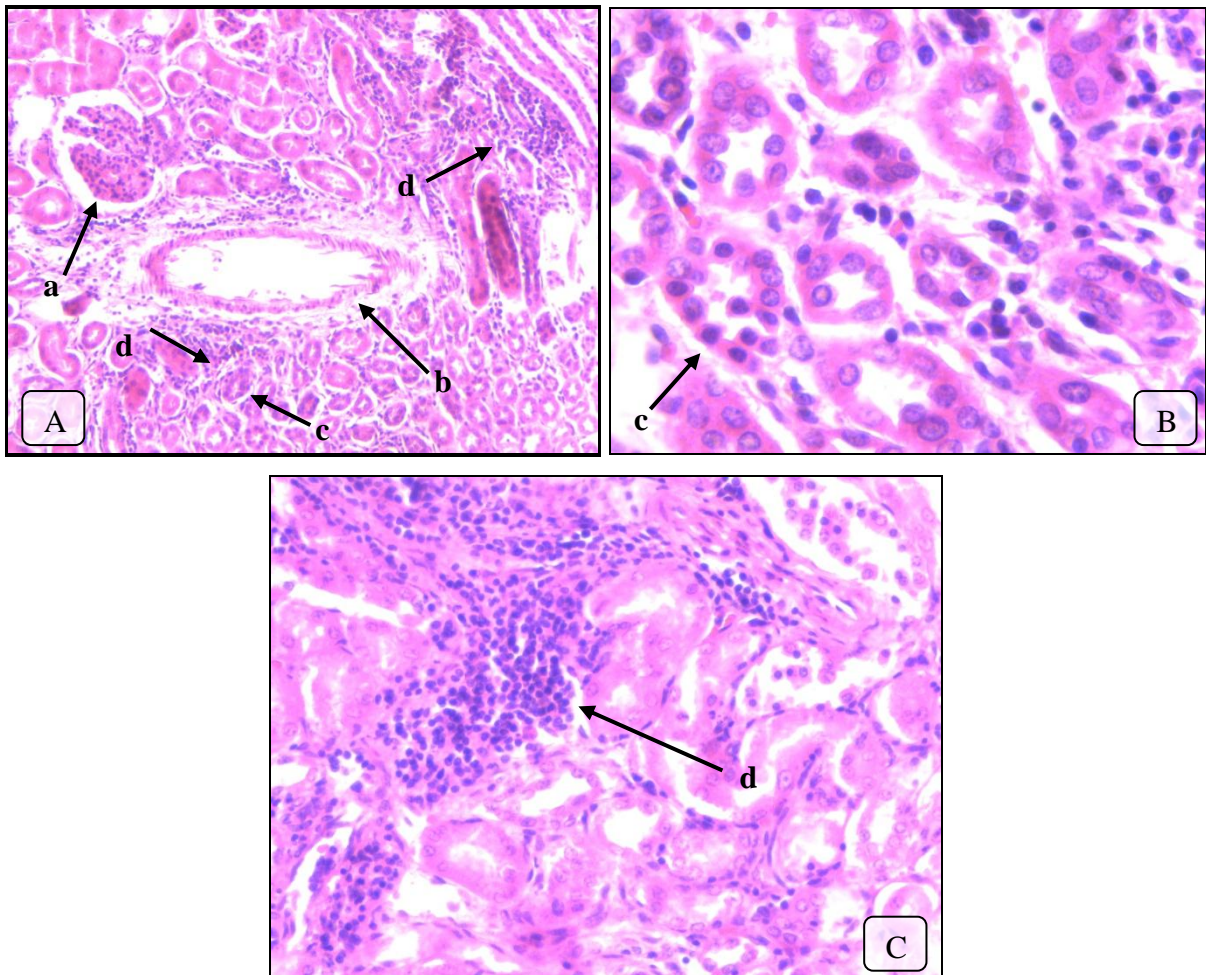


Figure 53: Coupe histologique du rein de lapine traité par 3,22 mg/kg de la métribuzine.
Coloration d'hématoxyline d'Harris éosine, A; C X 20 et B X 40.

- a: → glomérule présente un taux élevé d'inflammation,
- b: → inflammation dans la paroi des vaisseaux sanguin,
- c: → inflammation des paroi tubulaire,
- d: → haute inflammation interstitiel et entre les tubules.

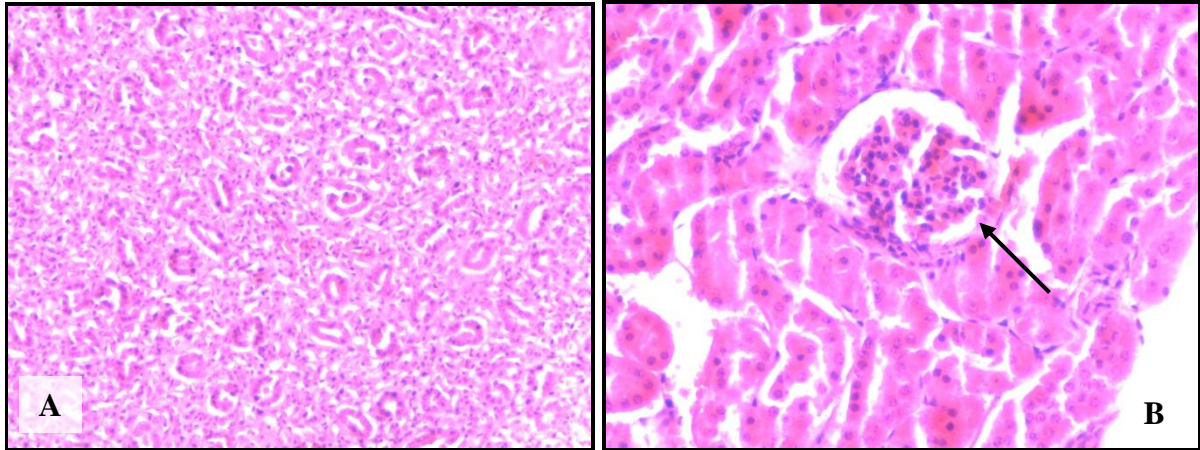


Figure 54: Coupe histologique du rein de lapine de GT. Coloration d'hématoxyline d'Harris éosine, A X 10 et B X 20

- A: tissu rénale à l'état normal,
- B: → glomérule à l'état normal.

II. Discussion

Les pesticides sont des produits chimiques utilisés comme moyen de lutte antiparasitaire (insecticides, herbicides, fongicides...) (LEYRAL., et VIERLING., 2007). Les herbicides sont des phytotoxiques chimiques utilisés pour contrôler les diverses mauvaises herbes. Ils ont des degrés variables de spécificité (GUPTA., 2014). La métribuzine est l'herbicide le plus fréquemment appliqué dans les cultures de pommes de terre dans divers pays (RATHORE., et NOLLET., 2012).

L'objectif de notre étude c'est l'évaluation de la cytotoxicité de la métribuzine et son effet sur la reproduction chez les lapines.

Les résultats obtenus d'après notre étude de l'effet du traitement par la métribuzine sur le poids corporels des lapines montrent qu'il y a une diminution progressive, due probablement à la réduction de la consommation alimentaire au cours de l'expérimentation, nos résultats est en accord avec l'étude de MRI., 1981, qui a utilisé des lapines traités par la métribuzine pendant 6-18 jours. Les auteurs ont déclaré que la métribuzine réduit la consommation d'eau et des aliments, avec la perdre du poids corporels des femelles lapins au cours de la période de traitement (MORGAN., 2001).

Les résultats de notre étude présentent ainsi une augmentation de la glycémie chez les groupes traités par la métribuzine. Plusieurs études qui ont montré, quand un organisme est exposé à des substances toxiques, réactions émotionnelles dans le système limbique actif l'hypothalamus pour produire la corticolibérine (CRH). Ce dernier stimule l'hypophyse pour libérer l'ACTH (hormone adrénocorticotrope) qui est un activateur de glandes surrénales pour la production et la sécrétion de cortisol dans le sang (POURRAMZANZIDESARAEI *et al.*, 2013). Le cortisol a de nombreuses actions dont certaines conduisent à l'élévation de la glycémie (JACOTOT., et CAMPILLO., 2003). Ce qui expliquer le plus probable les résultats de glycémie.

Concernant les paramètres hématologiques les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation de chacune de nombre des globules blancs, des lymphocytes et des plaquettes chez les groupes traités par rapport au groupe témoin. Notre résultats est en accord avec l'étude de Medjdoub A., *et al.*, 2011 qui est montré que la métribuzine conduit à l'activation et la stimulation de la prolifération des lymphocytes et la production de cytokines dans les cellules spléniques humaines et de rat (MEDJDOUB *et al.*, 2011). Les pesticides sont des xénobiotiques considérés comme des substances chimiques étrangère pour l'organisme, le système immunitaire est un cible des xénobiotiques (REVILLARD., 2001). Lorsqu'un corps étranger franchit les barrières naturelles de l'organisme. L'organisme fabrique des cellules spécialisées dans la défense immunitaire, les leucocytes ou globule blanc (RAGOT., 2011), ils

contribuent à l'inflammation, indispensable, au succès de la réponse immunitaire, et sécrètent des protéines de signalisation qui activent et recrutent d'autres cellules pour contrer l'envahisseur (JANEWAY *et al.*, 2009). Les plaquettes sont considérées comme des cellules inflammatoires, le potentiel inflammatoire des plaquettes se manifeste dans de nombreuses situations cliniques, l'augmentation de l'activité et de nombre des plaquettes est résulté de façon transitoire en réponse à la lésion tissulaire (ANONYME., 1998) probablement induit par la métribuzine. Parce que les neutrophiles phagocytaires, les cellules effectrices de la réponse inflammatoire aiguë, libèrent de grandes quantités de superoxyde extracellulaire et le superoxyde dismutase; une enzyme qui nettoie superoxyde, possède anti-activité inflammatoire, anion superoxyde et d'autres métabolites de l'oxygène pourrait être d'importants médiateurs du processus inflammatoire (SUDHIR *et al.*, 2007). Les globules rouges ont également été appelés les érythrocytes, possède le rôle de transporter l'oxygène des surfaces respiratoires vers les tissus (GILLES., et ANCTIL., 2006).

Notre étude présente une absence d'une variation des globules rouges chez les groupes traités par rapport au groupe témoins. L'érythropoïèse ou leurs productions est fait dans la moelle osseuse (MOLINIER., 2008). L'érythropoïèse est principalement régulée par une hormone appelée érythropoïétine (ou EPO) qui est élaborée majoritairement par les reins (90%) et en moindre quantité par le foie (10%) (MANUELLE., 2008). On a aussi d'après les résultats d'urée et de créatinine présentée dans cette étude indiquent le bon fonctionnement des cellules rénales qui permet de produire l'EPO de façon régulière et systématique ce qui explique l'origine probable de l'absence d'une variation de GR, et que la métribuzine n'exprime aucun effet sur la ligne érythrocytaire.

D'autre part, on a signalé une diminution de la concentration d'hémoglobine sous l'effet de la métribuzine par rapport au lot témoin. L'hémoglobine est une protéine ayant la propriété de fixer, transporter et délivrer l'oxygène. Une diminution du taux d'hémoglobine oriente le diagnostic vers une anémie (DESCROIX *et al.*, 2014). L'augmentation du taux de glucose dans le sang entraîne une glycation anormale des protéines. Etant donné que le passage du glucose dans les globules rouges est indépendant de l'insulinémie, la glycation de l'hémoglobine est en relation directe avec la glycémie, et cela pendant la durée de vie du globule rouge (KUBAB *et al.*, 2015). Ces résultats sont en désaccord avec l'étude de VELISEK J., *et al.*, 2008, qui a été exposé le Sencor (70% de substance active de métribuzine), il montre qu'il y a une augmentation importante de l'hémoglobine érythrocytaire par rapport au groupe de contrôle (VELISEK *et al.*, 2008).

Par ailleurs, nos résultats montrent aussi qu'il y a une augmentation de l'activité des transaminases (TGO, TGP) chez les lots traités par rapport au lot témoin. Ces résultats sont en

accord avec l'étude de MERZOUK *et al.*, 2013, qui a été montré une augmentation de l'activité des transaminases plasmatiques (TGO et TGP) chez des rats exposées à des faibles dose de la métribuzine (MERZOUK *et al.*, 2013). On peut expliquer ces résultats probablement par l'effet cytotoxique de la métribuzine sur les cellules hépatiques et myocardique. Les transaminases sont des enzymes essentielles de la cytolysse (KARAA., et LABAYLE., 2008), ils sont actives dans le foie, le cœur et les muscles. Elles passent dans le sérum en cas de cytolysse hépatique ou musculaire, une augmentation importante s'observe dans les cytolyses des hépatites toxiques (DESCROIX *et al.*, 2014).

Concernant les marqueurs de la fonction rénale, notre étude montre qu'il n'y a aucun variation de la concentration sérique d'urée et de la créatinine chez les deux groupes exposées à la métribuzine. Ces résultats est en désaccord avec l'étude d'El-Damaty et al., 2012, qui présentent une augmentation significative de l'urée et la créatinine dans le sérum de rats, sous traitement au haute dose en diméthoate, carbofuran et carbendazime (EL-DAMATY *et al.*, 2012). La créatinine est un métabolite de la créatine, qui dans le muscle squelettique est phosphorylée en créatine-phosphate, un composé riche en énergie libre (BOSSUYT., et BOEYNAEMS., 2001). La détermination de l'urée est contribué à l'exploration de la fonction rénale. L'urée est la principale forme d'élimination des déchets azotés du catabolisme protéique chez l'homme, formée dans le foie à partir de l'ammoniac (produit par la désamination des acides aminés) (KUBAB *et al.*, 2015). La diminution de la consommation alimentaire observée chez les groupes testés donne une diminution de l'apport exogène des protéines qui se reflète sur la biodisponibilité des acides aminés essentiels ce qui permet une diminution du taux de dégradation des acides aminé et qui est l'origine probable de l'absence d'une variation de ce paramètre.

Les résultats de l'effet de la métribuzine sur les paramètres de stress oxydatif présentent une augmentation de la concentration de MDA tissulaire dans tous les organes étudiés. Ces résultats sont en accord avec l'étude de CHIALI *et al.*, 2013 qui montre une augmentation de la concentration de MDA tissulaire chez des rats exposées à des faibles dose de la métribuzine (CHIALI *et al.*, 2013).

La métribuzine est capable d'induire un stress oxydatif intracellulaire (MEDJDOUB *et al.*, 2011). Le stress oxydant au niveau cellulaire traduit par une augmentation de la malondialdéhyde (MDA), produit de la peroxydation lipidiques des membranes (PELLETIER *et al.*, 2004), qui se fait au niveau des structures membranaires au sein des cellules (riches en phospholipides contenant des acides gras insaturés) qui sont susceptibles d'être altérées par les formes radicalaires. En présence de radicaux libres et d'oxygène, les acides gras insaturés subissent une dégradation oxydative (LAUWERYS *et al.*, 2007). Les radicaux libres qui

conduit à la peroxydation lipidique sont viennent de l'inflammation. Les médiateurs inflammatoires primaires produits par les macrophages sont de trois types; des produits de coupure des phospholipides membranaires après activation d'une phospholipase A2, des dérivés de l'oxygène, les radicaux libres et l'oxyde nitrique, des protéines stockées à l'intérieur des granules. Les dérivés de l'oxygène sont produits lors de l'activation des macrophages (ANONYME., 1998). Ainsi, les macrophages et les neutrophiles peuvent produire des quantités très élevées d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), ce qui produit par l'intermédiaire des NADPH oxydases membranaires (ECHINARD., et LATARJET., 2012). Cette activation conduit à la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et du radical hydroxyl ($OH^{\circ-}$). Ces différents produits sont très instables, ils peuvent conduire à des produits encore plus toxiques en synergie avec une autre enzyme, la myéloperoxydase (ANONYME., 1998).

Les résultats de l'effet de la métribuzine sur les paramètres de stress oxydatif montrent aussi une augmentation de la concentration de glutathion réduit (GSH) et l'activité de glutathion-S-transférase (GST) au niveau du foie, reins, ovaires.

Le glutathion réduit (GSH) est le principal agent antioxydant non enzymatique intracellulaire (JACOB., 2007). L'enzyme qui catalyse la conjugaison du glutathion (GSH) à une grande variété de composés électrophiles endogènes et exogènes est le glutathion S-transférase, qui possède la capacité de désintoxication où semble leur rôle dans la protection cellulaire du stress oxydatif (SCHWAB., 2011). La conjugaison des métabolites de la métribuzine avec le GSH suivi par la conversion de dérivés d'acide mercapturique semble jouer un rôle majeur dans la détoxification et d'excrétion (MORGAN., 2001). Le GSH présente l'état majoritaire de glutathion dans les cellules, une augmentation de la forme oxydée (GSSG) de glutathion réduit (GSH) indique la présence d'un état de stress oxydatif (PELLETIER *et al.*, 2004). La transformation de glutathion oxydé en glutathion réduit est fait par la glutathion réductase (GR) afin d'activer la GPX (POORTMANS., et BOISSEAU., 2003). D'où l'augmentation de GSH des organes étudiés, et aussi et par conséquent l'activité de GST.

Les résultats de l'analyse hépatique par l'HPLC montrent qu'il y a une trace de la métribuzine dans les foies des lapines traités, et montre que les cellules hépatiques sont des cibles de la métribuzine qui est l'agent pathogène responsable de la toxicité et de la lyse hépatique confirmée par l'élévation des transaminases sériques. Nos résultats est en accord avec l'étude de BAYCHEM (1972), qui montre que le foie est l'importante organe cibler par la métribuzine (MORGAN., 2001). La présence de pic de la métribuzine dans le foie des fœtus montre que ce pesticide franchir la barrière hémato-placentaire et rejoint la circulation

sanguin de fœtus, ce qui est métabolisé dans le foie, donc c'est l'origine de plusieurs pathologies ou complications fœto-maternelle induit par la métribuzine.

Les résultats de l'analyse histologiques réalisée sur les reins indiquent la présence d'une petite inflammation locale chez les groupes traités confirmés par les résultats des paramètres de stress. Au cours des phénomènes inflammatoire, il existe une libération de médiateurs dérivés de l'oxygène et de radicaux libres toxiques par les cellules phagocytaires (GOROCHOV., et PAPO., 2000). Le petit foyer d'inflammation n'induit aucune perturbation de la fonction rénale montré par les résultats de paramètres de la fonction rénale (urée et créatinine).

Dans notre étude, on a observé la mort de ¼ de lapine de chaque groupe contaminé par (6,44 mg/kg, 3,22 mg/kg des groupes 1 et 2 respectivement) de métribuzine, les deux cas de mort sont gestantes, ce qui probablement revient au cas d'avortement induit par une cytotoxicité ovarienne affirmé par la peroxydation lipidique au niveau de l'ovaire, ou peut-être à cause de la mort des fœtus dans l'utérus.

Nos résultats présentent une diminution importante de concentration d'œstradiol chez le groupe 2 traité par 1%, tandis qu'il n'y a aucune variation significative chez le groupe 1 traité par 2% de métribuzine. On peut expliquer ces résultats comme suite: Des herbicides (Métribuzine, Atrazine,...) ont été identifiés comme des perturbateurs endocriniens. Ils affectent la reproduction par différents mécanismes d'action; ces agents exogènes s'interfèrent à la reproduction et le processus de développement. Ces herbicides, comme d'autres produits chimiques, peuvent perturber tous les stades de la fonction hormonale du système reproducteur (GUPTA., 2012).

La glande hypophyse, qui sécrète plusieurs hormones telles que les FSH et LH, est une cible des pesticides. Ces derniers, en interférant avec la glande hypophyse et les processus de synthèse des hormones hypophysaires, auront un effet délétère sur les concentrations de ces mêmes hormones dans la circulation sanguine. L'activité des organes dépendant des hormones tropiques tels que l'ovaire et le testicule (sensibles à la FSH et à la LH), sera évidemment perturbée si les concentrations en hormones deviennent trop faibles ou trop élevées. De plus, les xénobiotiques peuvent aussi interférer directement au niveau des organes cibles, les rendant ainsi insensibles aux hormones ou incapables d'activer une réponse normale. Ces effets au niveau des organes cibles hormono-dépendants peuvent se manifester par des anomalies de la synthèse de plusieurs hormones telles que les stéroïdes sexuels (testostérone ou œstrogènes) par l'ovaire ou le testicule (PELLETIER *et al.*, 2004).

Cette effet néfaste des pesticides comme des perturbateurs endocrinien affectent le système hormonale de la reproduction ce qui expliquer probablement l'absence d'une

gestation chez un groupe des lapins exposée à la métribuzine ce qui montre que la métribuzine affecte la fertilité des lapines.

On peut expliquer les valeurs d'œstrogène chez les groupes traités par la gestation qui se caractérisent par une faible sécrétion d'œstrogènes, progressivement croissante en fin de gestation. Ces œstrogènes sont d'origine fœto-placentaire, l'élévation du niveau des œstrogènes au cours de la deuxième moitié de la gestation accompagne le début de la croissance mammaire. Leur niveau ne cesse de s'élever jusqu'à la parturition puis décroît brutalement dès la mise-bas (MARTINET., et HOUDEBINE., 1993).

Conclusion et perspectives

La métribuzine est un herbicide de la famille des triazines, employé en prélevée et en post-levée pour lutter contre les mauvaises herbes qui parasitent diverses cultures agricoles. C'est l'herbicide le plus utilisé dans la culture de pomme de terre dans la région d'El-Oued. Le but de cette étude est l'évaluation de l'effet toxique de la métribuzine sur les principaux organes physiologiques et la reproduction chez les lapines.

L'évaluation des effets toxiques de la métribuzine montre une grave toxicité au niveau hépatique confirmé par le diagnostic biochimique ce qui est peut-être l'origine de l'apparition des pathologies hépatiques dans notre région comme l'hépatite. De plus cette étude montre aussi que la métribuzine provoque une inflammation au niveau rénale confirmé par l'analyse histologique ce qui peut conduire à l'insuffisance rénale lorsque la toxicité est chronique.

Par ailleurs l'évaluation de l'équilibre oxydant/antioxydant montre que la métribuzine est le responsable de l'état de stress oxydant et la peroxydation lipidique au niveau hépatique, rénale et cardiaque ce qui est l'origine peut être de plusieurs pathologies associées de ces organes y compris le cancer, le plus abondant dans notre région. D'autre part les résultats obtenus montrent clairement l'effet néfaste de la métribuzine sur la reproduction soit par son effet toxique sur l'ovaire des lapines, par la mort des lapines gestantes ou par l'infertilité de certains lapines, aussi la métribuzine a un effet sur le développement fœtal par la toxicité fœtale qui peut conduire à la mal formation ou la mort fœtale.

Les effets néfastes présentés dans cette étude sont concernés la métribuzine aux faibles doses même inférieures aux doses toxicologiques infimes comme le LOAEL et le NOAEL, ce qui indique le danger de ces produits sur l'organisme. Cela nécessite une plus grande attention lors d'utilisation des produits contaminés par la métribuzine.

Ces résultats laissent une grande idée sur l'effet indésirable de la métribuzine qui permet d'affirmer leur toxicité même aux faibles doses, n'est pas seulement suite à une exposition professionnelle, mais aussi pour la population générale par leur utilisation des produits agricoles traités par ces pesticides, ce qui pose un véritable problème de santé publique. Nos résultats sont pour nous remarquables car ils ouvrent dans le futur des perspectives expérimentales qui devraient nous permettre d'étudier l'effet néfaste de métribuzine sur autres systèmes physiologiques (nerveux, endocriniens...etc) et d'avancer vers une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires intervenant dans les effets négatifs observés.

Références Bibliographiques

- 1- Abbott Diagnostics., 2011- Abbott News 2011 Az3219. Ed. Abbott Diagnostics, France. 48p.
- 2- AFECT., 2011- Médicaments actifs sur le système nerveux central (Traité de chimie thérapeutique). Ed. Lavoisier, Paris. 902p.
- 3- ALAVANJA M. C. R., HOPPIN J. A., KAMEL F. 2004- Health effects of chronic pesticide and childhood cancer and Neurotoxicity. *Annu Rev Public Health*. Vol. (25): 155-197.
- 4- ALPAS H., BERKOWICZ S. M., ERMAKOVA I., 2011- Environmental Security and Ecoterrorism. Ed. Springer Science & Business Media, Russia. 187p.
- 5- AMIARD J.-C., 2011- Les risques chimiques environnementaux. Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Ed. Lavoisier, Paris. 782p.
- 6- ANONYME, 1998- L'inflammation. Ed. John Libbey Eurotext, Paris. 565p.
- 7- ANSAY M., et THILL G., 1990- Pesticides et médicaments en santé animale: rencontre interdisciplinaire Nord-Sud de technologies, 16-17-18 février 1989, Bruxelles/Liège (Belgique). Ed. Presses universitaires de Namur, Belgique. 500p.
- 8- ARCHIBALD AULD B., WILLIAM MEDD R., 1987- Weeds: An Illustrated Botanical Guide to the Weeds of Australia. Ed. Elsevier, Hungary. 255p.
- 9- ASCHERIO A., CHEN H., WEISSKOPF M. G., O'REILLY E., McCULLOUGH M. L., CALLE E. E., SCHWARZSCHILD M. A., THUN M. J., 2006- Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol*. Vol. (60): 197-203.
- 10- BALDI I., CORDIER S., COUMOUL X., ELBAZ A., GAMET-PAYRASTRE L., LEBAILLY P., MULTIGNER L., RAHMANI R., SPINOSI J., VAN MAELE-FABRY G., 2013- Pesticides: Effets sur la santé. Ed. Inserm, Paris. 6p.
- 11- BALDI I., LEBAILLY P., 2007- Cancers and pesticides. *Rev Prat*. Vol. (57): 40-44.

- 12- BARRIOT P., DANIEL V., 1999- Intoxications aiguës en réanimation. Ed: 2. Wolters Kluwer, France. 615p.
- 13- BEAUDEUX J.-L., DURAND G., 2011- Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives. Ed: 2. Lavoisier, Paris. 607p.
- 14- BELKHEIRI N., 2010- Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse doctorat Chimie-Biologie-Santé. Toulouse. Université de Toulouse. 244p.
- 15- BOLAND J., KOOMEN I., LIDTH DE JEUDE J. V., OUDEJANS J., 2004- AD29F Les pesticides: composition, utilisation et risques. Ed. AgromisaFoundation, Wageningen. 86p.
- 16- BONNEFONT-ROUSSELOT D., JAUDON M. C., ISSAD B., CACOUB P., CONGY F., JARDEL C., DELATTRE J. et JACOBS C., 1997- Antioxidant status of elderly chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. Vol. (12): 1399-1405.
- 17- BONVALLOT N., DOR F., 2002- Valeurs Toxicologiques de référence: méthodes d'élaboration. Ed. Institut de Veille Sanitaire, Paris. 86p.
- 18- BOSSUYT X., BOEYNAEMS J.-M., 2001- Repères en diagnostic de laboratoire. Ed. Garant, Belgique. 463p.
- 19- BOUNIAS M., 1999- Traité de toxicologie générale: du niveau Moléculaire à l'échelle Planétaire. Ed. Springer Science & Business Media, France. 804p.
- 20- BRADFORD M. M., 1976- A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Academic Press*. Vol. 72 (57): 248-254.
- 21- CALVET R., BARRIUSO E., BEDOS C., BENOIT P., CHARNAY M.-P. et COQUET Y., 2005- Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Ed. France Agricole Editions, France. 637p.
- 22- CESARINI J.-P., 2004- Le sélénium: actualités. Ed. John Libbey Eurotext, Paris. 145p.
- 23- CHIALI F. Z., 2013- Effets métaboliques d'un régime à base de purée de pomme de terre contaminée par les pesticides chez le rat wistar. Thèse doctorat Physiologie et Biochimie de la Nutrition. Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 205p.

- 24- CHIALI F.Z., MERZOUK H., MERZOUK S.A., MEDJDOUB A., NARCE M., 2013- Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Vol. (106): 38–44.
- 25- COUNCIL OF EUROPE, 1992- Documents. Ed. Council of Europe, Germany. 208p.
- 26- CPP., 2002- Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Ed. Comité de la Prévention et de la Précaution, Paris. 47p.
- 27- DEGUINE J.-P., FERRON P., RUSSELL D., 2008- Protection des cultures: de l'agrochimie à l'agroécologie. Ed. Editions Quae, Paris. 187p.
- 28- DELEAGE E., 2013- Agricultures à l'épreuve de la modernisation. Ed. Editions Quae, Paris. 95p.
- 29- DESCROIX V., FORTIN T., FRICAIN J.-C., 2014- Analyses biologiques d'intérêt en odontologie: Prescrire et interpréter pour les pathologies générales et lésions de la muqueuses buccale. Ed. Editions CdP, Paris. 104p.
- 30- DIKSHITH T. S. S., 1990- Toxicological Study of Pesticides in Animals. Ed. CRC Press, Florida. 264p.
- 31- ECHINARD C., LATARJET J., 2012- Les brûlures. Ed. Elsevier Masson, Paris. 472p.
- 32- EFSA SCIENTIFIC REPORT, 2006- Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance metribuzin. *EFSA Scientific Report*. Vol. (88): 1-74.
- 33- EI-DAMATY EI-S. M. A., FARRAG A.-R. H., ROWAYSHED G. et FAHMY H. M., 2012- Biochemical and Histopathological Effects of Systemic Pesticides on Some Functional. *Journal of Applied Sciences Research*. Vol. (11): 5459-5469.
- 34- ELSAYED E. M., PRASHER S. O., 2013- Effect of the Presence of Nonionic Surfactant Brij35 on the Mobility of Metribuzin in Soil. *Appl. Sci*. vol. (3): 469-489.
- 35- FAO., 1994- Codex Alimentarius: Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires. Volume 2. Ed. Food & Agriculture Org, Rome. 778p.

- 36- FAO., 2001- Codex alimentarius: Dispositions générales. Volume 1A. Ed. Food & Agriculture Org, Rome. 397p.
- 37- FAVIER A., 2003- Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Ed. Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble, Grenoble. 8p.
- 38- FORTIER J., MESSIER C., et COLL L., 2005- La Problématique de l'utilisation des herbicides en foresterie: le cas du Québec. La revue en sciences de l'environnement. Vol. (6): 1-19.
- 39- FREEDMAN B., 1995- Environmental Ecology: The Ecological Effects of Pollution, Disturbance, and Other Stresses. Ed. Academic Press, America. 606p.
- 40- GHENABZIA I., TOUHAMI L., 2014- Evaluation de risque mutagène et cancérogène de pesticide Dicofol utilisés par les agriculteurs dans la région d'El-Oued. ISNEMA. Vol. (1): 43-47.
- 41- Gill, GW; Frost, JK; Miller, KA: Acta. Cytol. 18(4): 300-311. 1974. Cité par fiche technique d'Haematoxylin Solutions (Gill's, Harris' and Mayer's) de CRESCENT Diagnostics, Cat No. MS 403.
- 42- GILLES R., ANCTIL M., 2006- Physiologie animale. Ed. De Boeck Supérieur, Bruxelles. 675p.
- 43- GOROCHOV G., PAPO T., 2000- Immunologie. Ed. Wolters Kluwer France, Paris. 487p.
- 44- GUPTA R. C., 2012- Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles. Ed: 2. Academic Press, British. 1454p.
- 45- GUPTA R. C., 2014- Biomarkers in Toxicology. Ed. Academic Press, India. 1152p.
- 46- HABIG W. H., PABST M. J., JACOBI W. B., 1974- The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J.Biol. Chem. Vol. (249): 7130-7139.
- 47- HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.O., CHARLIER C., CHAPELLE J.P., 2007- Le stress oxydant. Rev Med Liege. Vol. (62): 628-638.

- 48- ICHAI C., QUINTARD H., ORBAN J.-C., 2011- Désordres métaboliques et réanimation: De la physiopathologie au traitement. Ed. Springer Science & Business Media, France. 520p.
- 49- INRA, 2008- Les fruits et légumes dans l'alimentation: enjeux et déterminants de la consommation. Ed. Editions Quae, Paris. 127p.
- 50- INRA–CEMAGREF, 2005- Pesticides, agriculture et environnement: réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. Ed. Quae, France. 136p.
- 51- INSERM, 2013- Pesticides: effets sur la santé. Ed. Les éditions Inserm, Paris. 1001p.
- 52- JACOB L., 2007- L'insuffisance rénale aiguë. Ed. Springer Science & Business Media, France. 344p.
- 53- JACOTOT B., CAMPILLO B., 2003- Nutrition humaine. Ed. Elsevier Masson, Paris. 311p.
- 54- JADOT G., 1994- Antioxydants et vieillissement. Ed. John Libbey Eurotext, Paris. 300p.
- 55- JANEWAY C.A., MURPHY K., TRAVERS, WALPORT M. P., 2009- Immunobiologie. Ed: 3. De Boeck Supérieur, Bruxelles. 889p.
- 56- JESSE UNEKE C., 2007- Integrated Pest Management for Developing Countries: A Systemic Overview. Ed. Nova Publishers, New York. 203p.
- 57- JOHNSON R. M., PEPPERMAN A. B., 1995- Analysis of metribuzin and associated metabolites in soil and water samples by solid phase extraction and reversed phase thin layer chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. Vol. 18(4): 739-753.
- 58- JOSHI S.C., MATHUR R., GAJRAJ A., SHARMA T., 2003- Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. (14): 91-98.
- 59- JUNGBLUTH G., 2008- Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine. Thèse doctorat Vétérinaire. Lyon. Université Claude Bernard-Lyon 1. 143p.

- 60- KAPLAN A. Urea. KAPLAN A et al. 1984- Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1257-1260 and 437 and 418. Cité par fiche technique d'urée de SPINREACT, BSIS32-F.
- 61- KARAA A., LABAYLE D., 2008- Pathologies digestives et soins infirmiers. Ed: 5. Wolters Kluwer France, Paris. 223p.
- 62- KEBIECHE M., 2009- Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L: effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse doctorat Biochimie. Constantine. Université Mentouri Constantine. 143p.
- 63- KUBAB N., HAKAWATI I., ALAJATI-KUBAB S., 2015- Guide des examens biologiques. Ed: 6. Initiatives Sante, Malakoff. 792p.
- 64- LAUWERYS R. R., LAUWERYS R., 2007- Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Ed: 5. Elsevier Masson, Stuttgart. 1252p.
- 65- LEBAILLY P., NIEZ E., BALDI I., 2007- Données épidémiologiques sur le lien entre cancers et pesticides. *Oncologie*. Vol. (9): 361-369.
- 66- LEVARIO-CARILLO M., AMATO D., OSTROSKY-WEFMAN P., GONZALES-HORTA C., CORONA Y., SANIN L.H., 2004- Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere*. Vol. (55): 1421-1427.
- 67- LEYRAL G., VIERLING E., 2007- Microbiologie et toxicologie des aliments: Hygiène et sécurité alimentaires. Ed: 4. Wolters Kluwer, France. 287p.
- 68- MANUELLE C., 2008- Les 5 fonctions vitales du corps humain: anatomo-physiopathologie. Ed. Wolters Kluwer France, Paris. 327p.
- 69- MARTINET J., HOUDEBINE L.-M., 1993- Biologie de la lactation. Ed. Editions Quae, Paris. 587p.
- 70- MASSART A., 2011- Supplémentation en oméga 3 et antioxydant et stress oxydant au cours d'un entraînement de judo. Thèse doctorat Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives. Orléans. Université D'Orléans. 191p.

- 71- McFARLAND J. E., BURNSIDE O. C., LeBARON H. M., 2011- The Triazine Herbicides. Ed. Elsevier, Hungary. 600p.
- 72- McMAHON T. F., 1993- Metribuzin: Review of Toxicology Data Submitted under FIFRA section 6(a) (2) by the Registrant. Ed. United States Environmental Protection Agency, Washington. 30p.
- 73- MEDART J., 2009- Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative. Ed: 2. De Boeck Supérieur, Bruxelles. 314p.
- 74- MEDJDOUB A., 2013- Evaluation des effets métaboliques d'un gavage par les pesticides (Mancozèbe, Métribuzine) chez le rat Wistar. Thèse doctorat Physiologie et Biochimie de la Nutrition. Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. 195p.
- 75- MEDJDOUB A., MERZOUK S.A., MERZOUK H., CHIALI F.Z., NARCE M., 2011- Effects of Mancozeb and Metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. (101): 27-33.
- 76- MERHI M., 2008- Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses: caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse doctorat Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Toulouse. Université De Toulouse. 249p.
- 77- MERZOUK H., CHIALI F.Z., MERZOUK S.A., MEDJDOUB A., NARCE M., 2013- Chronic low level Metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol. (106): 38-44.
- 78- MOLINIER A., 2008- Pathologie médicale et pratique infirmière: Hématologie, oncologie, neurologie, ORL, stomatologie, chirurgie maxillo-faciale, ophtalmologie, dermatologie, maladies infectieuses. Ed. Wolters Kluwer France, Paris. 601p.
- 79- MONACO T. J., WELLER S. C., ASHTON F. M., 2002- Weed Science: Principles and Practices. Ed: 4. John Wiley & Sons, Canada. 688p.
- 80- MORGAN J., 2001- Evidence On The Developmental And Reproductive Toxicity Of Metribuzin. Ed. DRAFT, California. 65p.

- 81- MURRAY R. Alanine aminotransferase. KAPLAN A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984a; 1088-1090. Cité par fiche technique de GPT (ALT) de SPINREACT, BEIS11-F.
- 82- MURRAY R. Aspartate aminotransférase. KAPLAN A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984b; 1112-1116. Cité par fiche technique de GOT (AST) de SPINREACT, BEIS46-F.
- 83- MURRAY R.L. Creatinine. KAPLAN A et al., 1984c. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1261-1266 and 418. Cité par fiche technique de créatinine de SPINREACT, BSIS13-F.
- 84- OECD., 1999- Indicateurs environnementaux pour l'agriculture Concepts et cadre d'analyse Volume 1: Concepts et cadre d'analyse. Ed. OECD Publishing, France. 52p.
- 85- OECD -2008 „La performance environnementale de l'agriculture dans les pays de l'OCDE depuis 1990. Ed. OECD Publishing, England. 657p.
- 86- OECD., 2013- Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4: Effets sur la santé. Ed. OECD Publishing, Suède. 16p.
- 87- PELLETIER E., CAMPBELL P. G. C., DENIZEAU F., 2004- Écotoxicologie Moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement. Ed. PUQ, Canada. 502p.
- 88- PIMENTEL D., 2002- Encyclopedia of Pest Management. Ed. CRC Press, France. 931p.
- 89- PINCEMAIL J., MEURISSE M., LIMET R., DEFRAIGNE J.O., 1999- L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Cœur, Poumons. Vol. (4): 1-7.
- 90- PMRA., 2013- Proposed Maximum Residue Limit PMRL2013-37 Metribuzin. Ed. The Health Canada Pest Management Regulatory Agency, Ottawa. 4p.
- 91- POHANISH R. P., 2012- Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens. Volume 1. Ed: 6. Elsevier, USA. 3040p.
- 92- PONCELET C., SIFER C., 2011- Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain. Ed. Springer Science & Business Media, Paris. 716p.

- 93- POORTMANS J. R., BOISSEAU N., 2003- Biochimie des activités physiques. Ed: 2. De Boeck Supérieur, Bruxelles. 480p.
- 94- POURRAMZANZIDESARAEI M., MOHAMMADLIKHANI M., SAHELI M., FAROKHROUZ M., ZAMANI A. and ABBASIAN F., 2013- Determination of the Acute Toxicity of Pretilachlor on Liver and Gill Issues as well as Glucose and Cortisol Levels in Fingerling Grass Carps (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. (8): 721-726.
- 95- RAGOT M., 2011- Produire du lait biologique: conversion et témoignages. Ed. Educagri Editions, Paris. 351p.
- 96- RATHORE H. S., NOLLET L. M. L., 2012- Pesticides: Evaluation of Environmental Pollution. Ed. CRC Press, Florida. 659p.
- 97- RESS J.-F., ZAL F., THOME J.-P., 2004- Enfer et paradis: la toxicité de l'oxygène chez les organismes abyssaux. *Océanis*. Vol. (30): 277-291.
- 98- RETY J., 2013- Évaluation des risques liés aux résidus de pesticides dans l'eau de distribution. Ed. Anses, Toulouse. 215p.
- 99- REVILLARD J.-P., 2001- Immunologie. Ed: 4. De Boeck Supérieur, Bruxelles. 600p.
- 100- RUSSO-MARIE F., 1998- L'inflammation. Ed. John Libbey Eurotext, Paris. 565p.
- 101- SAINT-DIZIER M., CHASTANT-MAILLARD S., 2014- La reproduction animale et humaine. Ed. Editions Quae, France. 800p.
- 102- SANCHEZ-PENA L.C., REYES B.E., LOPEZ-CARRILLO L., RECIO R., MORAN-MARTINEZ J., CEBRIAN M.E., QUINTANILLA-VEGA B., 2004- Organophosphorus pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agriculture workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. (196): 108-113.
- 103- SAMAIN J.-F., 2007- Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ed. Editions Quae, Canada. 331p.
- 104- SCHEYER A., 2004- Développement d'une méthode d'analyse par CPG/MS/MS de 27 pesticides identifiés dans les phases gazeuse, particulaire et liquide de l'atmosphère. Application à l'étude des variations spatio-temporelles des concentrations dans l'air et dans

les eaux de pluie. Thèse doctorat Chimie. Strasbourg. L'Université Louis Pasteur De Strasbourg. 273p.

105- SCHWAB M., 2011- Encyclopedia of Cancer .Ed: 3. Springer Science & Business Media, New York. 3934p.

106- SIBIEUDE C., SIBIEUDE T., THIVANT J., 1993- Les rouages économiques de l'environnement : 64 dossiers-clés, 58 cas concrets, 68 schémas, 397 définitions. Ed. Editions de l'Atelier, Paris. 346p.

107- STELLMAN J. M., 2000a- Encyclopédie de sécurité et de santé au travail. Volume 1. Ed. International Labour Organization, France. 4838p.

108- STELLMAN J. M., 2000b- Encyclopédie de sécurité et de santé au travail. Volume 3. Ed. International Labour Organization, France. 4838p.

109- SOUTHON S., GEE J., JOHNSON I. T., 1984- Hexose transport and mucosal morphology in the small intestine of the zinc-deficient rat. Brit J Nutr. Vol. 52(5): 371.

110- SUDHIR V. S., RADHAKRISHNA B., MOHAN R., and VIVIAN A. F., 2007- Oxidants in Chronic Kidney Disease. Am Soc Nephrol. Vol. (18): 16-28.

111- THIEBAULD C. M., SPRUMONT P., 1997- L'enfant et le sport: Introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant. Ed. De Boeck Supérieur, Belgique. 464p.

112- THIEBAULD C. M., SPRUMONT P., 2005- Le sport après 50 ans. Ed: 1. De Boeck Supérieur, Bruxelles. 432p.

113- UNIES. NATIONS, COMITE D., 2003- Recommandations Relatives au Transport des Marchandises Dangereuses: Règlement Type. Volume 1. Ed: 13. United Nations Publications, Nations Unies. 820p.

114- VELISEK J., SVOBODOVA Z., PIACKOVA V., NOVOTNY L., BLAHOVA J., SUDOVA E., MALY V., 2008- Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinarni Medicina. Vol. (6): 324-332.

115- VINCENT C., PANNETON B., FLEURAT-LESSARD F., 2000- La lutte physique en phytoprotection. Ed. Editions Quae, Paris. 347p.

116- YAGI K., 1976- Simple Fluorometric Assay for lipoperoxyde in blood plasma. Biochemical. Medecine. (15): 212-216.

117- WECKBEKER G., CORY J. G., 1988- Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathoine-depleted mous leukemia L1210 cells in vitro. Cancer letters. Vol. (40): 257-264.

Annexes

Annexe 1: Appareils de laboratoire



Automate de type mythic 18 Orphée (photo originale).



Microscope optique de type OPTIKA (photo originale).



Microtome de type Leica RM2125 RTS (photo originale).



Spectromètre d'absorption UV-visible de type SHIMADZU (photo originale).



HPLC de type SHIMADZU (photo originale).



Immunoanalyseur CIMA (immunologique microparticulaire par chimiluminescence)
ARCHITECT i4000SR de type Abbott Diagnostics (Abbott Diagnostics., 2011)

Annexe 2: Elevage des lapins



Figure: L'élevage des lapines (photo originale)



Figure: Des lapins à l'état d'accouplement (photo originale)



Figure: Lapine gestante morte (photo originale)

Annexe 3: Sacrifice



Figure: La dissection de lapine gestante (groupe 1) (photo originale)



Figure: Vue des fœtus (à Nbr 6) dans l'utérus de lapine (groupe 1) (photo originale)



Figure: La dissection de lapine non gestante (groupe 2) (photo originale)



Figure: utérus vide des fœtus (groupe 2) (photo originale)



Figure: La dissection de lapine gestante (groupe témoin) (photo originale)



Figure: des fœtus dans l'utérus de lapine (groupe témoin) (photo originale)



▲▼ Figure : L'utérus de lapine gestante à 5 fœtus (groupe témoin) (photo originale)





Figure: Lapine gestante à 4 fœtus (groupe 1) (photo originale)



Figure: lapine gestante à 7 fœtus (groupe témoin) (photo originale)



Figure: Utérus de lapine à 7 fœtus (groupe témoin) (photo originale)



Figure: Utérus de lapine à 3 fœtus (groupe témoin) (photo originale)



Figure: Fœtus dans le sac amniotique (photo originale)



Figure: Un fœtus (photo originale)

Résumé

L'alimentation est une source importante d'exposition des consommateurs aux pesticides qui sont associés à l'apparition des diverses pathologies. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'exposition de façon sub-chronique de la métribuzine (couramment utilisés pour le traitement phytosanitaire) sur la toxicité et la reproduction chez les lapines. Notre expérimentation a été réalisée chez quinze lapins pesant entre 1,2-2,2 kg ont été divisés en trois groupes de 5 animaux chacun; le premier groupe n'a exposé à aucun pesticide, le deuxième groupe a contaminé à la métribuzine par une dose quotidienne de 6,44 mg/kg et le troisième groupe a contaminé à la métribuzine par une dose quotidienne de 3,22 mg/kg pendant deux mois avec l'eau de boisson. A partir de l'analyse de nos résultats, on observe une diminution considérable de poids corporel des lapines contaminés à la métribuzine et une augmentation du poids absolu et relatif des organes prélevés (foie, cœur, ovaire et rein). Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimiques caractérisés surtout, par une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, l'activité sérique de TGO et TGP chez les lapines contaminés à la métribuzine dose 1 et 2 par apport aux animaux témoins. Alors que, la concentration de l'estradiol, a été diminués et pas de variation pour l'urée et créatinine. Les résultats obtenus révèlent également une toxicité hématologique chez les lots contaminés à la métribuzine dose 1 et dose 2, avec une élévation de nombre des globules blancs, le nombre de lymphocyte et les plaquettes avec une diminution du taux de la concentration d'hémoglobine pendant la contamination à la métribuzine. En outre, la contamination par la métribuzine a augmenté le stress oxydatif qui traduit par une augmentation de la teneur hépatique, rénale myocardique et ovarienne de malondialdéhyde (MDA), de l'activité du glutathion-S-transférase (GST) et de taux du glutathion réduit (GSH). Aussi, les résultats ont montré clairement des altérations de structures des tissus étudiés en comparaison avec les témoins, avec une inflammation rénale. La métribuzine affecte la reproduction des lapines par l'infertilité et la toxicité fœtale et par fois la mort des lapines gestantes. En conclusion, la présente étude a montré que l'exposition à la métribuzine aux faibles concentrations a des effets toxiques sur plusieurs organes et aussi affecte la reproduction et le développement fœtale. Par conséquent, les pesticides pourraient être considérés comme source de développement de plusieurs pathologies émergées dans notre région dont le cancer, l'hépatite et l'infertilité féminine.

Les mots clé: métribuzine, cytotoxicité, reproduction, stress oxydatif, *Oryctolagus cuniculus*.

المخلص:

المصدر الأساسي لخطر تعرض الإنسان أو المجتمع للمبيدات الزراعية هو الغذاء، وعادة ما يكون هذا الخطر منشأ لعدة أمراض مختلفة. الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير التعرض شبه المزمن للميتريبيوزين (يستخدم على نطاق واسع في زراعة البطاطا في منطقة الوادي) على السمية والتكاثر عند الأرانب. أجريت التجربة على عينة مكونة من خمسة عشر أرنب أوزانها تتراوح بين 1.2 و 2.2 كغ، قسمت إلى ثلاث مجموعات تحتوي كل منها على خمسة أرنب؛ المجموعة الأولى شاهدة، والمجموعة الثانية تُعرض لجرعة يومية من الميتريبيوزين مقدارها 6,44 ميليغرام/كغ أما المجموعة الثالثة فتُعرض لجرعة من الميتريبيوزين مقدارها 3,22 ميليغرام/كغ لمدة شهرين ضمن مياه الشرب. تحليل النتائج يبين ان الميتريبيوزين تسبب في انخفاض معتبر لأوزان الأرانب كما ساهم في زيادة الأوزان المطلقة والنسبية للأعضاء المدروسة (الكبد، القلب، الكلى، المبايض). كما أظهرت النتائج المتحصل عليها تغيرات ملحوظة في المعايير البيولوجية والتي تتمثل في ارتفاع مستوى السكر في الدم، بالإضافة إلى ارتفاع نشاط انزيمات ناقلات الامين في مصل الأرانب المتعرضة لجرع مختلفة من الميتريبيوزين مقارنة مع المجموعة الشاهدة. من جهة أخرى لاحظنا انخفاض في تركيز الاستراديول في ما لم نلاحظ أي تغير بالنسبة لتركيز اليوريا والكرياتينين. كما تظهر هذه النتائج أيضا سمية الدم عند المجموعات المعالجة بالميتريبيوزين، مع وجود ارتفاع في عدد كريات الدم البيضاء والخلايا اللمفاوية والصفائح الدموية يقابلها انخفاض في تركيز الهيموغلوبين في الدم. بالإضافة إلى ذلك، ان التعرض للميتريبيوزين يرفع من الإجهاد التأكسدي الذي يؤدي بدوره إلى ارتفاع محتوى الكبد، عضلة القلب، الكلى، والمبايض من بيروكسيد الدهون والجلوتاثيون المختزل، والى ارتفاع نشاط انزيم ناقل جلوتاثيون. أيضا، أظهرت النتائج بوضوح وجود اختلالات في هياكل الأنسجة المدروسة، مع وجود التهاب وتحلل للأغشية الكلوية. انعدام الخصوبة وتسمم الأجنة وفي بعض الأحيان موت الأرانب الحوامل هي إحدى نتائج تأثير الميتريبيوزين على نظام التكاثر عند هذه الحيوانات. وكخلاصة عامة، التعرض للميتريبيوزين بتركيز منخفضة له آثار سامة على عدة أنظمة عضوية كما يؤثر على التكاثر ونمو الجنين. وبالتالي، يمكن اعتبار المبيدات كمصدر بارز لظهور العديد من الأمراض في مناطق استعمالها، بما في ذلك مرض السرطان، التهاب الكبد والعقم عند النساء.

الكلمات المفتاحية: ميتريبيوزين، سمية خلوية، التكاثر، الإجهاد التأكسدي، أرنب أوروبي.