



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



جامعة باجي مختار – عنابة

Badji Mokhtar-Annaba  
University

Université Badji Mokhtar-  
Annaba

FACULTÉ DES SCIENCES  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie  
Option : Toxicologie Fondamentale & Appliquée

THÈME

**CONTRIBUTION A L'EVALUATION DE LA  
TOXICITÉ AIGUE ET SUBCHRONIQUE D'UN  
PRODUIT PHYTOSANITAIRE (PROCLAIM<sup>®</sup>)  
CHEZ LE RAT WISTAR**

Par : M. ZAOUANI Mohamed

**DIRECTEUR DE RECHERCHE: Pr. BERREBBAH. H. Professeur**

**U. Annaba**

Devant le jury

**PRESIDENT: Pr. DJEBAR M. R. Professeur**

**U. Annaba**

**EXAMINATEURS :**

**Dr. TADJINE. A. M.C.**

**U. El Tarf**

**Dr. BENSOLTANE. S. M.C.**

**U. Annaba**

**Année: 2010**



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



جامعة باجي مختار – عنابة

Badji Mokhtar-Annaba  
University

Université Badji Mokhtar-  
Annaba

FACULTÉ DES SCIENCES  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie  
Option : Toxicologie Fondamentale & Appliquée

THÈME

**CONTRIBUTION A L'EVALUATION DE LA  
TOXICITÉ AIGUE ET SUBCHRONIQUE D'UN  
PRODUIT PHYTOSANITAIRE (PROCLAIM<sup>®</sup>)  
CHEZ LE RAT WISTAR**

Par : M. ZAOUANI Mohamed

**DIRECTEUR DE RECHERCHE: Pr. BERREBBAH. H. Professeur**

**U. Annaba**

Devant le jury

**PRESIDENT: Pr. DJEBAR M. R. Professeur**

**U. Annaba**

**EXAMINATEURS :**

**Dr. TADJINE. A. M.C.**

**U. El Tarf**

**Dr. BENSOLTANE. S. M.C.**

**U. Annaba**

**Année: 2010**

## ***Remerciements***

Mes premiers remerciements sont adressés à Monsieur le Professeur DJEBBAR, Mohamed Réda de l'université de Annaba, pour la qualité de son accueil et pour avoir répondu avec soin à mes nombreuses demandes d'informations itératives, d'avoir permis à ces travaux d'aboutir et de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

*Mes plus sincères remerciements :*

A Madame le Professeur, BERREBBAH Houria, de l'Université de Annaba, ma directrice de thèse, de m'avoir reçu au sein de son équipe, de la confiance qu'elle m'a accordée et de son soutien scientifique et moral tout au long du travail ; elle a su orienter mes recherches aux bons moments, tout en encourageant mes initiatives.

A Madame TADJINE. Aicha, Maitre de Conférence de l'Université d'El Tarf, Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury, Qu'elle soit assurée de mes sincères remerciements.

A Madame DJEKOUNE Samira, Maitre de Conférence INES Annaba, Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury, Qu'elle voit ici le témoignage de ma reconnaissance.

*Un grand Merci :*

A Monsieur FERKIOUI, Directeur du C.R.D (SAIDAL) pour son soutien inconditionnel et la confiance qu'il a placée en moi, je lui adresse mes vifs remerciements et ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur BAZ de l'Ecole Normal Supérieur de Kouba et Madame BEN-MAHDI Mériem, Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour leur aide sur le plan scientifique et humain.

A Madame BOUCHENAK de l'Université de Boumerdès pour son aide précieuse lors de la réalisation des études histologiques.

A tous les chercheurs du Laboratoire de Pharmacotoxicologie de l'USTHB en particulier le Dr MEKIOUI et à l'ensemble du personnel du laboratoire de Pharmacotoxicologie du CRD SAIDAL.

A tous mes collègues et amis pour leur aide et la chaleur des moments sympathiques que nous avons passé ensemble.

A tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici ma haute considération.

**A ceux qui sont partis trop tôt, A ceux qui me manquent**

A ma famille et à ma belle famille. Qu'ils trouvent ici la sincère expression de mon affection. Vous êtes ma force et ma motivation.

# Sommaire

## Résumés

## Liste des Tableaux

## Liste des Figures

## Liste des Symboles

## Chapitre I : Introduction

1- Généralités.....	1
2- Définition et utilisation des produits phytosanitaires.....	2
3- Classification des produits phytosanitaires.....	4
4- Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement .....	6
5- Effets toxiques des pesticides sur l'homme et l'animal .....	7
5.1 Effets aigus.....	8
5.2 Effets chroniques cancérigènes et non cancérigènes .....	8
5.2.1 Effets cancérigènes.....	11
✚ <i>Cancers des organes génitaux</i> .....	11
✚ Cancer du sein.....	11
✚ Cancer du poumon.....	12
✚ Leucémies et autres cancers.....	12
✚ Cancer de la thyroïde.....	12
5.2.2 Effets non cancérigènes.....	13
✚ Effets sur le système endocrinien et la reproduction.....	13
✚ Effets neurologiques et neurocomportementaux.....	13
✚ Effets sur l'immunité.....	14
5.2.3- Autres effets.....	14
6. Caractéristiques du Proclaim® .....	15
7. Caractéristiques chimiques de l'Emamectine benzoate (Proclaim®).....	15
8. Mode d'action de l'Emamectine benzoate (Proclaim®).....	16
9. Pharmacocinétique de l'Emamectine benzoate (Proclaim®).....	17

10. Toxicologie de l'emamectine benzoate .....	17
10.1 Toxicité aiguë.....	17
10.2 Toxicité chronique.....	18
11 Comportement dans l'environnement.....	18
12 Biomarqueurs d'exposition.....	18
13 Objectifs de l'étude.....	19
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>20</b>
1. Matériel biologique .....	20
2 <b>Méthodes</b> .....	21
2.1 Etude de la toxicité aiguë.....	21
2.2. Etude de la toxicité subchronique.....	21
2.2.1 Etude de l'évolution pondérale.....	23
2.2.2 Examens hématologiques et biochimiques.....	23
▪ Prélèvements .....	23
▪ Exploration des paramètres biochimiques sériques.....	24
– Dosage de la phosphatase alcaline.....	24
– Dosage de la Transaminase Glutamo Oxaloacétique (GOT) .....	24
– Dosage de la GPT.....	25
– Dosage de la Glycémie .....	25
– Dosage de l'urée.....	26
– Dosage de la Créatinine.....	27
– Dosage du Cholestérol Total.....	27
– Dosage des Triglycérides.....	28
– Dosage de HDL <sub>C</sub> .....	29
– Dosage de LDL <sub>C</sub> .....	30
▪ Exploration des paramètres hématologiques.....	30
▪ Exploration de l'activité enzymatique hépatique.....	30
– Dosage des Protéines Totales .....	30
– Dosage de l'Activité Catalase.....	30
– Dosage des TBARS Dosage des Protéines Carbonylées.....	31
– Dosage des taux du Glutathion Réduit (GSH).....	31
– Mesure de l'activité de la GST.....	32
2.2.3 Etude histologique.....	32
3. Analyse statistique .....	32

## CHAPITRE III – RESULTATS..... 33

1. <i>Evaluation de la toxicité aiguë (détermination DL50)</i> .....	33
1.1. Etude du comportement.....	33
1.2. Mortalité .....	33
2. Evaluation de la toxicité subchronique .....	35
2.1. Observation du comportement .....	35
2.2. Variation de la courbe pondérale.....	35
2.3. Examens biochimiques et hématologiques .....	36
2.3.1. Variation des paramètres biochimiques sériques.....	36
➤ Variation de la glycémie.....	36
➤ Variation de la cholestérolémie.....	37
➤ Variation des taux sériques des triglycérides.....	38
➤ Variation des concentrations sériques en HDL et LDL .....	39
➤ Variations de la créatinémie et de l'urémie.....	40
➤ Variation de la concentration sérique en phosphatase alcaline (PAL).....	42
➤ Variation des concentrations sériques en transaminases (GOT et GPT) .....	43
2.3.2. Paramètres hématologiques.....	44
2.4. Biomarqueurs du stress oxydatif .....	46
➤ Variation de l'activité de la catalase.....	46
➤ Variation des TBARS .....	46
➤ <i>Variation des protéines carbonyles</i> .....	47
➤ <i>Variation de l'activité du glutathion réduit (GSH)</i> .....	48
➤ <i>Variation de l'activité du glutathion transférase (GST)</i> .....	48
2.5. Résultats histologiques.....	49
2-5-1 Observation macroscopique.....	49
2-5-2 Observations microscopiques .....	51
➤ Observation histologique de la paroi colique des rats témoins .....	51
➤ Observation histologique de la paroi colique des rats traités à petite et à moyenne concentration.....	53

➤ Observation histologique de la paroi colique des rats traités à forte concentration .....	55
➤ Observation histologique du parenchyme hépatique des rats témoins et traités .....	57
➤ Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats témoins .....	59
➤ Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats traités à faible concentration.....	61
➤ Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats traités à moyenne concentration.....	63
➤ Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats traités à forte concentration.....	65
 7. Etude de la persistance ou de la réversibilité des effets toxiques observés.....	67
7.1 Variations des paramètres biochimiques.....	67
7.2 Résultats histologiques .....	69
 <b>Chapitre IV : Discussion et Conclusion</b> .....	71
 <b>Références Bibliographiques</b> .....	80
 <b>Annexe</b> .....	91

## Résumé :

Le présent travail a eu pour but l'évaluation de la toxicité aiguë et subchronique de Proclaim®, produit phytosanitaire à base d'Emamectine benzoate chez les rats wistar mâles. L'étude de la toxicité aiguë a permis de calculer la DL 50 du Proclaim® à 1300 mg/kg. L'intoxication aiguë s'est traduite principalement par des effets neurotoxiques.

L'étude de la toxicité subchronique du Proclaim®, pendant une période de 28 jours avec des concentrations correspondant respectivement à 1/8, 1/16 et 1/32 de la DL50 s'est traduite par une hyperglycémie significative chez l'ensemble des lots traités et une augmentation significative de l'urée et de la créatinine sérique témoignant d'une atteinte des fonctions rénales.

Cependant nous n'avons pas enregistré de perturbations significatives au niveau du développement pondéral et des autres paramètres biochimiques (cholestérol, LDL, HDL, triglycéride, GOT, GPT) et hématologiques (globules blancs, globules rouges, hématocrite, hémoglobine).

L'étude des variations des marqueurs du stress oxydatifs a mis en évidence une diminution importante de l'activité de la catalase et de la GSH hépatique, ainsi qu'une augmentation significative des TBARS, des protéines carbonylées, témoignant l'installation d'un état de stress oxydatif.

Les altérations histologiques observées dans notre étude sont caractérisées par l'apparition d'une atteinte structurale au niveau néphrotique, de lésions tissulaires au niveau de la paroi colique et quelques modifications structurales au niveau du parenchyme hépatique.

Après interruption de deux mois de traitement et afin d'évaluer la persistance ou la réversibilité des effets toxiques précédemment observés, le suivi des paramètres altérés a permis d'observer une normalisation des valeurs de la glycémie, de la créatinémie et une amélioration notable de l'urémie chez les rats satellites.

**Mots clés :** Proclaim®, toxicité aiguë, toxicité subchronique, biomarqueurs (biochimiques et hématologiques), stress oxydatif, Rats

## **Abstract :**

The main objective of the present work was the evaluation of acute and subchronic toxicity of plant protection product: Proclaim® at the dose of 1300 mg/kg. Severe acute poisoning induced mainly neurotoxic effects. The study of subchronic toxicity of Proclaim®, for a period of 28 days with concentrations corresponding respectively to 1/8, 1/16, and 1/32 of LD50 showed a significant hyperglycemia and a significant increase of uremia and creatinemia expressing kidney function failure/lesion.

No significant modifications of weight, and both biochemical (cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, GOT, GPT) and hematologic parameters (white blood cells, red blood cells, hematocrit, hemoglobin) were recorded.

The study of stress oxidative markers showed a significant decrease in hepatic GSH and catalase activity and a significant increase in TBARS and carbonyl protein revealing an oxidative effect of Proclaim®.

The histological alterations observed in our study were mainly characterized by nephritic structural lesions, tissue alteration of colon in addition to some hepatic structural modifications.

The assessment of reversibility persistence of toxic effects previously observed was studied after two months treatment interruption. The obtained results showed normalization of the values of glycemia and a significant improvement of uremia in satellites rats.

**Key words:** Proclaim®, acute toxicity, subchronic toxicity, biologic markers (biochemical and hematologic), oxidative effect, Rats

## ملخص:

يهدف هذا العمل إلى تقييم السمية الحادة و السمية الشبه مزمنة لبروكليم<sup>®</sup>، مادة مُصنَّعة من فصل إمامكتين بنزوات عند ذكور الجرذان ويستار.

سمحت دراسة السمية الحادة بتحديد الجرعة المميتة 50 ب 1300 مع/كغ.

يُترجم التسمُّم الحاد أساسا بآثار تسمُّمية- عصبية.

إن دراسة السمية الشبه - المزمنة لبروكليم<sup>®</sup>، لمدة 28 يوم مع تراكيز توافق بالترتيب ل 1/8، 1/16، 1/32

للجرعة الممية 50، أظهرت ارتفاعا دلاليا في نسبة السُّكَّر في الدم عند كل المجموعات المعالجة و ارتفاعا دلاليا في اليوريا ونسبة الكرياتنين المصلي مما يثبت الإصابة في الوظائف الكلوية.

لكن لم تُسجل إضطرابات دلالية على مستوى التطوُّر الوزني، وباقي العناصر

حجم الخلايا المكدوسة ، الكيمائية - الحيوية (الكولسترول، الهيموغلوبين) HDL، LDL، ثلاثي الغليسريد، GOT، GPT) و الدموية (الكريات البيضاء، الكريات الحمراء، كم تمّ دراسة تغيّرات علامات الإجهاد التأكسدي.

بيّنت هذه الدراسات إنخفاضا هاما في عمل الكاتالاز و GSH الكبدية،

وارتفاعا دلاليا لTBARS، البروتينات الكربونيلية مما يدل على وجود إجهاد تأكسدي.

تتميّز التغيّرات النسيجية الملاحظة في هذه الدراسة بظهور إصابة في البنية الكلوية، تلف نسيجي على مستوى جدار القولون بعض التغيّرات البنيوية على مستوى البرنثيم الكبدية.

بعد وقف العلاج لمدة شهرين من أجل تقييم استمرارية أو معكوسية الآثار السامة الملاحظة سابقا، لوحظ رجوع للمستوى العادي لنسبة السُّكَّر في الدم، الكرياتنين و تحسّن بارز في نسبة اليوريا في الدم عند ذكور الجرذان ساتيليت.

**الكلمات المفتاح:** لبروكليم<sup>®</sup>، السمية الحادة، السمية الشبه - المزمنة، المؤشرات الحيوية (الكيمائية - الحيوية،

و الدموية) ، الإجهاد لتأكسدي، جرذان

## ABREVIATIONS

<b>DDT</b>	:	Dichloro-Diphényl-Trichloro-éthane.
<b>DL<sub>50</sub></b>	:	Dose Létale 50.
<b>DNPH</b>	:	Dinitrophénylhydrazine
<b>GABA</b>	:	Acide Gamma Amino-Butyrique.
<b>GOT (ou ASAT)</b>	:	Transaminase Glutamo Oxaloacétique ou Aspartate Amino Transférase.
<b>GPT (ou ALAT)</b>	:	Transaminase Glutamo Pyruvique ou Alanine Amino Transférase.
<b>HT</b>	:	Hématocrite.
<b>HB</b>	:	Hémoglobine.
<b>IARC</b>	:	International Agency for Research on Cancer.
<b>ONAB</b>	:	Organisation Nationale de l'Alimentation de Bétails.
<b>PAL</b>	:	Phosphatase Alcaline.
<b>PBS</b>	:	Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate
<b>SOD</b>	:	Superoxyde Dismutase
<b>TBARS</b>	:	ThioBarbituric Acid Reactive Substances

## Index des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Classification pour estimer la toxicité aiguë des pesticides	<b>4</b>
2	Croisements entre la classification chimique et la classification biologiques des pesticides	<b>5</b>
3	Principaux signes cliniques observés chez l'Homme lors d'intoxication aiguë ou chronique par certains pesticides en fonction de leur classe chimique	<b>9</b>
4	Principaux signes cliniques observés chez l'animal lors d'intoxication aiguë ou chronique par certains pesticides en fonction de leur classe chimique	<b>10</b>
5	Composition de l'alimentation des rats	<b>20</b>
6	Concentration de Proclaim® administrées aux 5 groupes expérimentaux lors du test de la toxicité subchronique	<b>22</b>
7	Examens hématologiques, biochimiques et biomarqueurs de stress oxydatif étudiés lors du test de toxicité subchronique.	<b>23</b>
8	Pourcentage de mortalité observé chez les rats traités par différentes concentration de Proclaim®.	<b>33</b>
9	Valeurs moyennes des pesées hebdomadaires (g) des rats témoins et des rats traités.	<b>35</b>
10	Valeurs moyennes des taux sériques du cholestérol (g/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim® sur 28 jours	<b>38</b>
11	Valeurs moyennes des taux sériques des triglycérides (g/l) des rats des lots témoin et traités au Proclaim® sur 28 jours	<b>39</b>
12	Valeurs moyennes des taux sériques moyens des HDL (g/l) chez les rats témoins et traités au Proclaim® sur 28 jours	<b>39</b>
13	Valeurs moyennes des taux sériques moyens des LDL (g/l) chez les rats témoins et traités au Proclaim® sur 28 jours	<b>40</b>
14	Valeurs moyennes de la concentration sérique de la PAL (U/l) des rats des lots témoin et traités au Proclaim® sur 28 jours	<b>43</b>
15	Valeurs moyennes de la concentration sérique de la GOT (U//l) des rats des lots témoin et traités au Proclaim® sur 28 jours	<b>43</b>
16	Valeurs moyennes de la concentration sérique de la GPT (U//l) des rats des lots témoin et traités au Proclaim® sur 28 jours	<b>44</b>
17	Résultats de l'évolution des paramètres hématologiques des rats témoins et traités.	<b>45</b>
18	Valeurs moyennes de la glycémie, de la créatinémie et de l'urémie en g/l chez le lot satellite témoin (st) et traité (s)	<b>68</b>

## INDEX DES FIGURES

<b>Figures</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	Structure chimique de l'Emamectine benzoate ( <b>Dodd, 2008</b> )	<b>16</b>
2	Mode d'action au niveau des synapses de l'Emamectine benzoate	<b>17</b>
3	Estimation de la DL50	<b>34</b>
4	Evolution des valeurs moyennes de la glycémie des rats des lots témoin et traités par Proclaim® sur 28 jours	<b>37</b>
5	Evolution des valeurs moyennes de l'urémie (g/l) des rats des lots témoin et traités par Proclaim® sur 28 jours	<b>41</b>
6	Evolution des valeurs moyennes de la créatinémie (g/l) des rats des lots témoin et traités par Proclaim® sur 28 jours	<b>42</b>
7	Activité de la catalase dans des échantillons hépatiques des rats du lot témoin et des lots traités par Proclaim® au 28e jour de traitement	<b>46</b>
8	Taux des TBARS dans des échantillons hépatiques des rats des lots témoin et traités par Proclaim® au 28e jour	<b>47</b>
9	Taux des concentrations hépatiques des protéines carbonylés des rats des lots témoin et traités par Proclaim® au 28e jour	<b>47</b>
10	Taux des concentrations hépatiques de glutathion réduit des rats des lots témoin et traités par Proclaim® au 28e jour	<b>48</b>
11	Activité de la glutathion transférase dans des échantillons hépatiques des rats des lots témoin et traités par Proclaim® au 28e jour	<b>48</b>

## INDEX DES PLANCHES

Planches	Titre	Page
Planche I	Figure a : Colon d'un rat témoin (aspect normal)	<b>50</b>
	Figure b : Colon d'un rat traité à moyenne concentration	
Planche II	Observation histologique de la paroi colique des rats du lot témoin.	<b>52</b>
Planche III	<b>Observation histologique de la paroi colique des rats traités</b>	<b>54</b>
	Figure a : Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot P (Coloration HE GX20)	
	Figure b : Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot P (Coloration HE GX40)	
	Figure C : Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot M (Coloration HE GX20)	
	Figure d : Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot M (Coloration HE GX20)	
Planche IV	<b>Observation histologique de la paroi colique des rats traités</b>	<b>56</b>
	Figure a : Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot F (Coloration HE GX20).	
	<b>Figure b :</b> Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot F (Partie A) Coloration (HE GX40)	
	<b>Figure C :</b> Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot F (Partie B) Coloration (HE GX40)	
Planche V	<b>Coupes histologique de parenchyme hépatique des rats des lots témoins et traités au Proclaim® (Grossissement x 200)</b>	<b>58</b>
	Figure a : morphologie du foie des rats témoins montrant un parenchyme hépatique normal (Coloration: H-E, G X 200)	
	Figure b : morphologie du foie des rats du lot P montrant un parenchyme hépatique normal (Coloration: H-E, G X 200)	
	Figure c : morphologie du foie des rats lots M, montrant une désorganisation du parenchyme hépatiques (Coloration: H-E, G X 200)	
	Figure d : morphologie du foie des rats lots M, montrant une altération des cellules hépatiques (Coloration: H-E, G X 200)	
Planche VI	<b>aspect histologique du rein du lot témoin</b>	<b>60</b>
	Figure a : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 5</i>	
	Figure b : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 10</i>	
	Figure c : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 40</i>	

## Suite planches

Planches	Titre	Page
Planche VII	<b>Aspect histologique du rein chez le rat traité par la faible concentration (Lot P 40,62 mg/kg).</b>	<b>62</b>
	Figure a : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 5</i>	
	Figure b : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 10</i>	
	Figure c : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 40</i>	
Planche VIII	<b>Aspect histologique du rein chez le rat traité par la moyenne concentration (Lot M : 81,25 mg/kg).</b>	<b>64</b>
	Figure a : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 5</i>	
	Figure b : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 10</i>	
	Figure c : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 40</i>	
Planche IX	<b>Aspect histologique du rein chez le rat traité par la forte concentration (Lot F : 162,5 mg/kg)</b>	<b>66</b>
	Figure a : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 5</i>	
	Figure b : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 10</i>	
	Figure c : <i>Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 40</i>	
Planche X	<b>Aspect histologique des échantillons d'un tissu (colique, hépatique et nephrotique chez un rat satellite traité par la forte concentration</b>	<b>70</b>
	<b>Figure a :</b> Aspect histologique d'un tissu du colon chez un rat du lot satellite traité (Coloration : H-E,G X 200)	
	<b>Figure b :</b> Aspect histologique d'un tissu hépatique chez un rat du lot satellite traité (Coloration: HE, obj G X 40 )	
	<b>Figure c :</b> Aspect histologique d'un tissu nephrotique chez un rat du lot satellite traité (Coloration: HE, obj G X 40 )	

# *Introduction*

## Chapitre I : Introduction

### 1- Généralités

Le recours aux pesticides pour usage agricole en Algérie est devenu indispensable pour atteindre les niveaux de production maximaux et satisfaire une demande de plus en plus accrue des consommateurs en produits alimentaires

Cependant la contamination des milieux naturels et des denrées alimentaires par ces produits peut entraîner de très large répercutions sur les composants de l'écosystème (sol, air et atmosphère) par conséquent sur l'être humain (*Bouziyani, (2007)*).

En effet, l'exposition professionnelle et environnementale aux pesticides est associée à un risque accru de développer certains types de cancer, une baisse de la fertilité masculine, des perturbations du système hormonal, des problèmes immunitaires, des malformations congénitales, etc... Parmi les effets les plus graves, certains peuvent même se transmettre d'une génération à une autre (*Veillerette, 2005*).

L'évaluation du risque des produits phytosanitaire peut adéquatement rendre compte des dangers de ces produits pour l'humain et pour l'environnement. De plus, depuis l'arrivée sur le marché des pesticides, les dispositifs actuels d'évaluation de la toxicité de ces produits demeurent parsemés d'incertitudes. L'absence de certitude scientifique absolue ne doit pas servir de prétexte pour remettre à plus tard l'adoption de mesures effectives visant à prévenir la dégradation de l'environnement (*Laurin, 2007*)

Comme d'autres disciplines la toxicologie intervient dans le développement de molécules plus sûres comme médicaments, additifs alimentaires et pesticides. Le toxicologue se voit dans l'obligation d'identifier dans la mesure du possible des indicateurs d'exposition et des signes cliniques précoces alors que les effets sur la santé sont encore réversibles. Une telle démarche permet alors la prise de décision en temps utile pour préserver la santé des individus travaillant ou résidant à l'intérieur des zones exposées.

Pour transformer la connaissance scientifique acquise en outils pour les professions de santé, le toxicologue est de plus en plus impliqué dans la détermination des limites d'exposition ou dans l'évaluation du risque. Ces déterminations prennent en compte l'étude rationnelle des effets toxiques, la mise en évidence de doses qui ne produisent pas d'effets, ou des effets sur le minimum d'individus.

Il est classique de distinguer deux formes de toxicité, l'une est dite aigue, et correspond à l'adsorption massive d'une seule dose de poison, l'autre est dite chronique et survient à la suite d'adsorption de faibles doses de substances nocives durant plusieurs jours, plusieurs mois ou même plusieurs années.

Notre travail consiste à évaluer la toxicité aigue et subchronique d'un produit phytosanitaire Proclaim<sup>®</sup> matière active à base d'emamectine benzoate, nouvellement homologué en Algérie chez le rat Wistar mâle adulte par voie orale

*Revue Bibliographique*

## 2-Définition et utilisation des produits phytosanitaires

Le terme *Pesticide* dérive du mot anglais « Pest » qui désigne tout animal ou plante (virus, bactérie, champignon, ver, mollusque, insecte, rongeur, oiseau et mammifère) susceptibles d'être nuisible à l'homme et à son environnement, et regroupe toute substance destinée pour protéger les cultures contre leurs ennemis ou bien utilisée pour l'assainissement des locaux, matériels et véhicules qui servent pour l'élevage des animaux domestiques ou encore dans la collecte, le transport, le stockage ou la transformation des produits d'origine animale ou végétale (Periquet, 1986).

Selon l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (*OEPP, 2004*) les pesticides ou produits phytopharmaceutiques (PPP), sont des préparations contenant une ou plusieurs substances chimiques actives destinées à protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action.

La plupart des principaux produits phytopharmaceutiques sont des composés chimiques spécifiquement formulés et ont des effets pesticides. Les PPP sont utilisés dans un large éventail d'applications telles que l'agriculture, l'aménagement des paysages et l'entretien des abords d'axes de transport. Ils sont également utilisés, dans une certaine mesure, pour la sylviculture et le jardinage. Ils peuvent être aussi des produits chimiques de base (acides gras, acides aminés, autres substances chimiques courantes), des extraits végétaux ou animaux (huiles végétales ou huile d'os, gélatine, etc...) ou des dérivés de métabolites végétaux ou d'autres substances (*Maroni, 2000 et Pedigo, 2002*). Il s'agit de l'ensemble des produits chimiques naturels ou synthétiques utilisés contre les parasites animaux ou végétaux des plantes, des animaux et de l'Homme. Ils appartiennent donc à cette catégorie les herbicides, fongicides, insecticides, acaricides, anthelminthiques et rodenticides, dont les résidus constituent principalement un danger de toxicité chronique par accumulation (Hoerner, 1995).

### 3. Classification des produits phytosanitaires

Les pesticides peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose (*Fournier, 1988*).

Le premier système de classification repose sur le type de parasites à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles de produits phytosanitaires selon la nature des cibles visées: les herbicides, les fongicides et les insecticides, à celles-ci s'ajoutent des produits divers tels que les acaricides (contre les acariens), les nématicides (contre les nématodes), les rodenticides (contre les rongeurs), les taupicides (contre les taupes), les molluscicides (contre les limaces et les escargots essentiellement), les corvicides et les corvifuges (contre les oiseaux ravageurs de culture et surtout les corbeaux) et enfin les répulsifs (*ACTA, 2005*).

Le deuxième système repose sur la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires (tableau2). Les principaux groupes chimiques comprennent les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes, les triazines et les urées substituées. (*Merhi, 2008 ; UIPP, 2009*).

Les systèmes de classification sont universels, néanmoins l'Organisation Mondiale de la Santé (*OMS, 2005*) a classé les produits phytosanitaires en fonction de la toxicité orale et de la toxicité cutanée des matières actives de ces derniers (Tableau 1). Cette classification comprend cinq niveaux allant d'extrêmement dangereux au sans risque.

**Tableau 1:** Classification pour estimer la toxicité aiguë des pesticides (*OMS, 2005*)

Classification	Désignation	DL <sub>50</sub> pour le rat (mg/kg poids du corps)			
		Oral		Cutané	
Classe	Niveau du risque	Solide	Liquide	solide	liquide
Ia	Extrêmement dangereux	≤5	≤20	≤10	≤40
Ib	Très dangereux	5-50	20-200	10-100	40-400
II	Modérément dangereux	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	Peu dangereux	≥500	≥2000	≥1000	≥4000
U	Sans risqué dans le cadre d'une utilisation normale	≥2000	≥4000		

**Tableau 2** : Croisements entre la classification chimique et la classification biologiques des pesticides (Calvet, 2005).

<i>Groupe</i>	<i>Classe chimique</i>	<i>Exemples de molécules</i>
<b>Antiparasitaires (insecticides et anticoccidiens)</b>	Insecticides minéraux	Arséniate de plomb, fluorure d'aluminium, composés soufrés, mercuriques, sélénisés
	Organochlorés	DDT (dichlorodiphényl trichloréthane) HCH (hexachloro-cyclohexane) dont le lindane
	Organophosphorés	Dichlorvos, chlorfenvinphos, phorate
	Carbamates	Aldicarbe, carbofuran, carbaryl, benfuracarbe,
	Pyréthroïdes	Perméthrine, cyperméthrine, deltaméthrine .
	Macrolides endectocides	Ivermectine, doramectine, abamectine, moxidectine, sélénamectine, éprinomictine
<b>Herbicides</b>	Herbicides minéraux	Sulfates, nitrates, chlorures, chlorates, cyanamide
	Phytohormones	Pichloranne, trichlopyr, fluroxypyr, glyphosate,
	Carbamates	Asulame, diallate, sulfallate
	Dérivés de l'urée	Monuron, diuron, linuron
	Divers	Triazines, dinitrophénols, aminotriazole,
<b>Fongicides</b>	Dithiocarbamates	Mancozèbe, manèbe, zinèbe, propinèbe,
	Carbamates benzimidazolés	Bénomyl, carbendazime
	Dérivés de l'imidazole	Kétoconazole, niconazole, imazalil, prochloraz

#### **4. Devenir des produits phytosanitaires dans l'environnement**

L'utilisation importante des produits phytosanitaires en agriculture a engendré la contamination de l'environnement. A la suite de leur application, ces molécules sont susceptibles de quitter leur site d'application et sont alors considérées comme des micropolluants organiques à l'origine de la pollution de tous les compartiments environnementaux (*Shrack, 2009*). Du fait de leur écotoxicité et de leur potentiel de bioaccumulation, ces molécules présentent un risque pour l'environnement en général (*Wendt-Rasch, 2004 ; Capkin, 2006*).

Ainsi, de nombreuses études ont montré la présence de produits phytosanitaires dans l'atmosphère aussi bien en milieu rural, qu'en milieu urbain (*Trevisan 1993 ; Chevreuil, 1993 ; Sanusi, 1996*).

Ces composés peuvent être soumis au transport atmosphérique. La diffusion est possible sur de grandes distances comme en témoigne la détection de pesticides organochlorés dans les précipitations en Antarctique (*Bidleman, 1993*). Le sol et les ressources en eau sont aussi concernés par cette pollution. Les pesticides peuvent aussi être transportés par ruissellement et contaminer ainsi les eaux de surface et les nappes phréatiques. On observe actuellement une contamination préoccupante et généralisée des eaux par les pesticides selon, (*Grange, 2008*).

Les pesticides sont donc retrouvés dans tous les compartiments de l'environnement et peuvent donc conduire à une exposition de la population générale par les aliments, l'eau de boisson, l'air intérieur et extérieur et les poussières de la maison.

## 5. Effets toxiques des pesticides sur l'homme et l'animal

Les connaissances relatives aux conséquences potentielles de l'action des pesticides sur l'homme sont encore incomplètes. Les pays en voie de développement demeurent les plus concernés du fait de l'usage incontrôlé de pesticides (Jurewicz, 2006).

Si les divers pesticides sont aujourd'hui mis à l'index, c'est parce qu'ils sont susceptibles, chez les animaux comme chez l'homme, de provoquer certains troubles c'est pourquoi s'il renferme des xénobiotiques, on peut craindre des conséquences sanitaires à plus ou moins long terme.

Ces considérations sont d'ailleurs à l'origine de l'établissement des LMR (= limites maximales de résidus) et de la réglementation générale sur les pesticides ou d'autres produits chimiques. Cependant, ces limites maximales sont aujourd'hui de plus en plus remises en cause car elles sont peut-être encore trop élevées pour exclure tout risque à long terme avec certitude, générées par l'exposition à des résidus de pesticides contenus dans l'alimentation et/ou l'eau de boisson (Xue, 2005).

Les agriculteurs et les éleveurs demeurent les personnes les plus fortement exposées aux divers produits phytosanitaires car ce sont eux qui appliquent ces substances sur les sols et les cultures et car il peut parfois se dégager des poussières lors de la récolte et de la manipulation de denrées stockées, ainsi qu'en préparant la ration destinée aux animaux de rente. D'ailleurs, les effets observés au sein de cette population sont aussi bien des conséquences à court terme qu'à long terme (Van Balen, 2006). Il ne faut cependant pas non plus oublier les enfants, qui sont plus fortement exposés à ces xénobiotiques, les enfants boivent et mangent proportionnellement plus que les adultes en raison des besoins liés à la croissance (Landrigan, 2004).

Selon *Multigner*, (2005) l'exposition aux produits phytosanitaire peut se présenter sous trois formes

- ❖ Une exposition unique, intense et de courte durée à laquelle sont soumises les personnes chargées de la préparation ou de l'épandage de pesticides lors d'accident.
- ❖ Une exposition intense et prolongée auxquels sont soumis les personnes chargées de la préparation, de l'épandage ou de la récolte.
- ❖ Une exposition faible et prolongée.

Le premier risque concerne peu de monde alors que le dernier concerne l'ensemble de la population. Dans ce dernier cas, les personnes les plus nombreuses sont aussi les moins protégées (pas de gant, de lunettes, de masque).

### **5.1 Effets aigus**

L'intoxication aiguë se manifeste en général immédiatement ou peu de temps après une exposition à un pesticide. Les signes d'intoxication (tableau 3 et 4) observés sont très divers et parfois difficiles à reconnaître. On a souvent tendance à attribuer les malaises ressentis à d'autres causes qu'une intoxication par des pesticides, car ils ne sont pas toujours spécifiques. Les risques d'intoxications les plus élevées apparaissent essentiellement lors de la manipulation du produit. Les voies de contamination suspectées sont la peau, les systèmes respiratoire et digestif. Les signes symptomatiques les plus souvent rencontrés lors d'une intoxication aiguë sont les céphalées, les nausées, les vomissements, les étourdissements, la fatigue, la perte d'appétit et les irritations cutanée ou oculaire, difficultés respiratoires, convulsions et même coma (*Samuel, 2000*). Ces effets nocifs peuvent être réversibles ou irréversibles (*Bliefert., 2001*).

### **5.2 Effets chroniques cancérigènes et non cancérigènes**

L'intoxication chronique survient généralement suite à l'absorption répétée de faibles doses de pesticides pendant une longue durée. Le délai avant l'apparition de symptômes ou de maladies peut être très long, il est donc souvent difficile de faire le lien entre l'exposition chronique et les effets constatés. L'évaluation des effets toxiques à long terme est complexe car de nombreux paramètres entrent en jeu comme la nature des composés et leurs propriétés toxicodynamiques, leur synergie, les différents types d'exposition etc...

Les principaux effets d'une exposition chronique aux pesticides (tableau 3 et 4) sont des effets sur la reproduction, le développement, les systèmes immunitaires et endocriniens ainsi que des effets cancérigènes (*Samuel, 2001*).

**Tableau 3** : Principaux signes cliniques observés chez l'Homme lors d'intoxication aiguë ou chronique par certains pesticides en fonction de leur classe chimique selon (Periquet, 1986).

<i>Classe chimique</i>	<i>Signes observés chez l'homme lors d'intoxication</i>	
	<i>Aiguë</i>	<i>Chronique</i>
<b>Organochlorés</b>	Vomissements, diarrhées céphalées, vertiges, convulsions, coma	Des atteintes digestives avec nausées, vomissements, diarrhée, atteintes hépatique et digestive atteintes cardiovasculaires (tachycardie, arythmie, hyper- puis hypotension)
<b>Organophosphorés et carbamates</b>	Vomissements, nausées, diarrhées, sialorrhée toux, essoufflements tachycardie, hyper puis hypotension contractions musculaires, crampes, paralysie	atteintes respiratoires avec bronchite et hypersécrétion atteintes neurologiques périphériques effets cancérigènes et mutagènes
<b>Phytohormones</b>	Tétanie, œdème pulmonaire, troubles rénaux et hépatiques	Effets tératogènes
<b>Pesticides minéraux</b>	Non renseigné	Atteintes rénales

**Tableau 4 :** Principaux signes cliniques observés chez l'animal lors d'intoxication aiguë ou chronique par certains pesticides en fonction de leur classe chimique selon

(Periquet, 1986 ; Kammerer, 2000).

<i>Classe chimique</i>	<i>Principaux signes cliniques chez l'animal</i>
<i>Organochlorés</i>	Trémulations musculaires, important ptyalisme, des troubles du comportement, une incoordination motrice, des convulsions Troubles digestifs avec vomissements et diarrhée
<i>Organophosphorés et carbamates</i>	Troubles muscariniques secondaires à une excitation du système parasympathique : myosis, hypersécrétions, diarrhées, difficultés respiratoires, bradycardie, incontinence urinaire
<i>Macrolides endectocides</i>	Eventuellement chez les bovins traités contre l'hyodermose, paralysies aiguës ou œsophagites secondaires à la lyse des larves
<i>Pyréthriinoïdes</i>	Incoordination motrice ou choréathétose Tremblements et convulsions Excitation du système nerveux parasympathique avec hypersalivation, diarrhée profuse, dyspnée, tachycardie
<i>Macrolides endectocides</i>	Apathie et prostration Ataxie, tremblements Hypersalivation
<i>Dinitrophénols</i>	Hyperthermie Faiblesse musculaire Polypnée
<i>Dipyridilliums (paraquat)</i>	Hypersalivation, ulcération de la langue Dyspnée et toux

### 5.2.1 Effets cancérigènes

Les données actuelles sur le lien entre pesticides et cancers sont controversées chez l'adulte. Cependant, des études sur des populations professionnellement exposées ont mis en évidence des corrélations entre l'exposition à certains pesticides et l'apparition d'affections localisées (*ORS, 2001 ; Air Breizh, 2003*).

#### ✚ *Cancers des organes génitaux:*

Au cours des dernières décennies, on a vu augmenter l'incidence des cancers testiculaires chez les jeunes hommes en âge de procréer, en association avec l'exposition aux pesticides et aux résidus industriels (Queiroz, 2006). L'étiologie de cette tumeur met aussi en jeu les oestrogènes *in utero*. Ainsi, l'exposition à des xéno-oestrogènes pendant la grossesse multiplie par quatre le risque de cancer testiculaire chez l'enfant (Ejaz, 2004). Chez les agriculteurs en particulier, de nombreux pesticides sont mis en cause dans l'augmentation des cancers de la prostate. Parmi les molécules incriminées, on trouve : l'alachlore, l'atrazine, l'aldicarbe, l'aldrine, le bénomyl, le carbofuran, le carbaryl, le chlordane, le chlorpyrifos, le coumaphos, le dichlorvos, le diazinon, la dieldrine, le DDT, le fonofos, l'heptachlor, le lindane, le malathion, le parathion, la perméthrine, le métolachlor, le 2,4-D, le métalaxyl, le bénomyl, le captane... (Alavanja., 2005).

#### ✚ **Cancer du sein**

Jusqu'en 2005, l'implication des pesticides appartenait encore au domaine des hypothèses (Jaga, 2005), mais de nombreux xénobiotiques sont aujourd'hui mis en cause dans l'augmentation de la fréquence des cancers du sein (Mukherjee, 2006). L'association entre exposition aux pesticides et augmentation du risque de cancer du sein est statistiquement significative.

Certaines molécules agissent par inhibition de l'apoptose des lignées cellulaires sensibles aux oestrogènes, d'autres induisent un stress oxydatif, et d'autres encore jouent le rôle de perturbateurs endocriniens, ces mécanismes favorisant le développement du cancer du sein (Mukherjee, 2006).

Dans certains cas, c'est la surexpression des récepteurs aux oestrogènes qui participe au développement des cellules cancéreuses, surexpression parfois provoquée par certains xénobiotiques (Kim, 2004).

Les organochlorés sont nettement mis en cause dans l'augmentation du risque de cancer du sein car une étude menée au Pakistan a montré que les femmes atteintes par ce type de tumeur avaient de plus fortes concentrations d'organochlorés dans le sang et le tissu adipeux que des femmes témoins saines. Les organophosphorés et les dioxines peuvent aussi favoriser ce cancer en raison de leur action sur le système endocrinien, qui influe sur le développement mammaire (Ejaz, 2004).

### **Cancer du poumon**

Lee. (2004) ont montré que la fréquence d'exposition au chlorpyrifos est positivement corrélée à l'incidence du cancer du poumon chez l'homme. Le DDT a lui aussi été mis en relation avec ce type de cancer (Ejaz, 2004).

### **Leucémies et autres cancers**

Chez l'enfant, l'exposition aux pesticides est accusée d'induire des leucémies, certains lymphomes et des neuroblastomes, mais l'évaluation du risque épidémiologique reste problématique car (Jurewicz, 2006) et Lee (2005) ont mis en évidence un lien entre le développement d'un cancer lympho-hématopoïétique et l'emploi d'alachlore : chez les agriculteurs, le risque de leucémie est multiplié par 2,83 et celui de myélome multiple par 5,66 par rapport à une population témoin. Les triazines auraient elles-aussi un lien avec l'apparition de certains lymphomes et de leucémies (Ejaz, 2004).

### **Cancer de la thyroïde**

Certains organochlorés inhibent la synthèse et intensifient la dégradation des hormones thyroïdiennes chez l'Homme par leur pouvoir œstrogène. Avec le mécanisme opposé, comme la TSH est l'hormone majeure de régulation de la croissance et du fonctionnement général de la glande thyroïdienne, tout ce qui augmente sa concentration est susceptible d'encourager les cancers de la thyroïde (Ejaz, 2004).

D'autres cancers pourraient aussi découler de l'exposition aux différents insecticides, herbicides et fongicides : cancers du foie, du pancréas et de divers organes (Jaga, 2005 ; Van Maele-Fabry, 2006 ; Provost, 2007 ; Bassil, 2007).

Ces effets sont susceptibles d'apparaître quelle que soit la dose reçue, la probabilité de survenue croît avec la dose. L'hypothèse retenue est qu'une seule molécule du produit utilisé peut provoquer un changement dans une cellule et être à l'origine des effets décrits. (Nasterlack, 2007).

## 5.2.2 Effets non cancérogènes

### Effets sur le système endocrinien et la reproduction

Les mécanismes d'action varient selon les pesticides et se révèlent complexes et non totalement explorés. Les pesticides agiraient comme des perturbateurs endocriniens et interféreraient avec les hormones, les facteurs de croissance ou les neurotransmetteurs (*Vos 2000 ; Rogan, 2007 ; Hotchkiss, 2008*). Ils entraîneraient de nombreuses pathologies comme l'infertilité masculine, la mort fœtale, avortement spontané et mortinatalité, ainsi que des malformations congénitales (*Sanborn, 2004 ; Weselak, 2007 ; Wigle, 2008*). Selon l'Observatoire Régional de la Santé en Bretagne (*O.R.S, 2001*) le lien entre exposition aux pesticides et malformations congénitales est envisagé dans de nombreuses études. L'augmentation du risque d'infertilité masculine ou féminine, de mortalité fœtale, et de répercussions sur le fœtus (diminution de la croissance fœtale) est largement mise en avant (*Engel, 2000*).

### Effets neurologiques et neurocomportementaux

Pour certains pesticides, principalement les organophosphorés qui inhibent l'activité de l'acétylcholinestérase et les carbamates, la neurotoxicité est le mécanisme même de leur mode d'action. Ces effets informent sur la neurotoxicité potentielle de certains produits, principalement les organophosphorés et les carbamates, comme autres produits phytosanitaires capables d'induire un effet neurotoxique, (*Kamel, 2004*) citent les pyréthriinoïdes qui sont capables d'induire des paresthésies et des convulsions à des doses massives, les dérivés de l'urée qui sont associés à différentes altérations tels que des troubles neurologiques centraux, une polyneuropathie, ainsi que les anciens organochlorés qui peuvent entraîner des convulsions épileptiformes en particulier le DDT. Quant aux effets chroniques, les principales données disponibles concernent l'exposition aux pesticides et les troubles neurocomportementaux et neurodégénératifs entre autre la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (*Baldi, 2003*), plusieurs études écologiques et épidémiologiques ont montré une relation entre le risque de développer la maladie de Parkinson et l'utilisation professionnelle des pesticides en particulier les organochlorés, organophosphorés et carbamates (*Brown, 2006 ; Elbaz, 2007 ; Hancock, 2008*).

## Effets sur l'immunité

Les pesticides sont capables d'agir sur le système immunitaire selon différents mécanismes. Ils entraînent des pathologies immunitaires plus fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte (*Sanborn, 2004 ; Duramad, 2007*). Les résultats des études épidémiologiques ont montré que l'exposition chronique aux pesticides peut jouer un rôle dans le développement de certaines pathologies respiratoires comme l'asthme et la bronchite chronique (*Whalen, 2003 ; Salameh, 2006 ; Rowe, 2007*). Enfin, d'après les études menées par *Fournier, 1992 ; Theus, 1992* et *Filipov, 2005*), certains pesticides agissent essentiellement in utero en altérant l'activité des macrophages et en diminuant la quantité des lymphocytes au niveau de la rate et du thymus fœtaux. Ces produits phytosanitaires entraînent également sur des animaux adultes une diminution de la production d'immunoglobulines et de la prolifération des lymphocytes T (*Fournier, 1992*).

### 5.2.3- Autres effets

Les pesticides pourraient avoir d'autres effets sur la santé après une longue durée d'exposition. A noter que ces divers effets sont variés et que le lien entre l'exposition à ces produits phytosanitaires et ces effets, n'est pas clairement défini. Les pesticides pourraient ainsi provoquer, suite à un dérèglement endocrinien, des atteintes métaboliques (la perte de poids, l'obésité, le diabète, les troubles digestifs...), (*Kammerer, 2000*), des atteintes hématologiques (*Provost, 2007*), ainsi que des atteintes immunitaires (diminution de la production d'anticorps, réaction d'hypersensibilité retardée (*Muniz, 2008*)).

Cependant le fait que ces différents effets soient dus à une exposition aux produits phytosanitaires n'est pas démontré avec certitude. Tous ces effets non cancérogènes surviennent au-delà d'une certaine dose administrée et pour une durée d'exposition déterminée. Ce sont des effets à seuil, puisque l'intensité des effets croît avec l'augmentation de la dose administrée (*Alavanja , 2005 ; Baldi, 2007 ; Bassil, 2007*), il existe donc une dose limite en dessous de laquelle le danger ne peut apparaître.

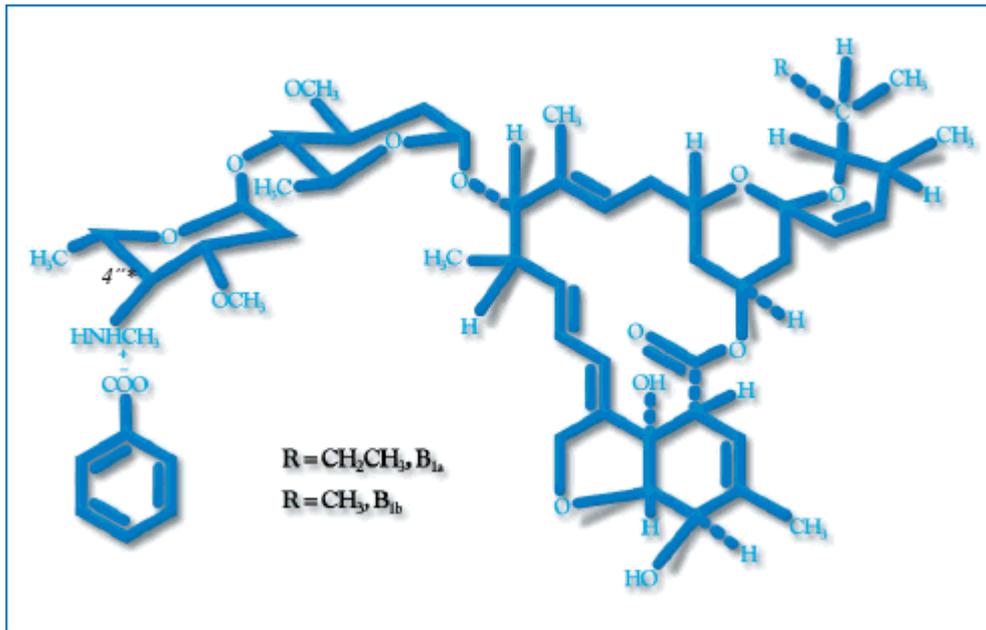
## 6. Caractéristiques du Proclaim®

Proclaim® est un insecticide constitué de 5 % d'Emamectine Benzoate. Il s'agit d'un groupe d'insecticides naturels, qui renferme plusieurs produits de structure plus au moins complexe. La plus importante famille appartenant à cette classe d'insecticide, "les avermectines" (Terry-Roberts, 1998). Les avermectines (a : anti ; verm : ver ; ect : ectoparasite ; in : produit pharmaceutique) sont des lactones macrocycliques naturels issu de la culture de *Streptomyces avermitilis*. Les avermectines peuvent être utilisés en médecine humaine et vétérinaire (Derlon, 2006). Leur découverte a conduit à un véritable bouleversement dans la lutte contre certaines parasitoses, et notamment les filarioses (Boussenisq, 2005), la strongyloïdose (anguillulose) gastro-intestinale et la gale humaine (Marigny, 2001). Elles sont utilisées aussi à grande échelle pour combattre les ectoparasites et les endoparasites, ainsi que les ectoparasites chez les poissons d'aquaculture. (Kövecses, 2005 ; Derlon, 2006). Ces antiparasitaires sont mis sur le marché international en 1981 (Meissonnier, 1997 ; Boissay, 2007), et leurs utilisation en tant que pesticide en agriculture a vue le jour depuis 1985 (Boissay, 2007). Plus de cinq milliards de produits commercialisés à base d'ivermectine ont été vendus dans le monde (Shoop, 2002), dont l'Emamectine benzoate.

Bien que l'ivermectine soit un acaricide actif contre une très grande gamme d'insectes, il s'est avéré qu'il est moins actif sur les lépidoptères, ce spectre d'action déficient a initié des programmes des tests biologiques en 1984 dont le résultat était la découverte de l'ivermectine semi-synthétique de deuxième génération : l'Emamectine benzoate, ce composé représente une haute efficacité contre les larves des lépidoptères et d'autres insectes (Ishaaya, 1998).

## 7. Caractéristiques chimiques de l'Emamectine benzoate (Proclaim®)

Proclaim® est un insecticide obtenue par synthèse chimique à partir de l'ivermectine (un composé qui contient l'ivermectine B1a et l'ivermectine B1b) par substitution d'un aminométhyl (NH-CH<sub>3</sub>) par un groupe hydroxyle (-OH) au niveau du carbone C4 (Heasook, 2004). Cet insecticide de nom chimique " 4benzoate d'epi-méthylamino-4deoxyivermectineB1 " est un mélange d'un maximum de 90% de 4benzoate d'epi-méthylamino-4'deoxyivermectine B1a (MAB1a) et un minimum de 10% de 4 benzoate d'epi-méthylamino-4 deoxyivermectineB1b (MAB1b), (Purvine, 2005). Dodd, (2008) a représenté la formule développée de cette molécule voir (Figure 02).



**Figure 01 :** Structure chimique de l'Emamectine benzoate (Dodd, 2008)

## 8. Mode d'action de l'Emamectine benzoate (Proclaim®)

L'Emamectine benzoate est classé dans le groupe des activateurs des canaux chlore ( figure,3). Il agit au niveau neuromusculaire, en se fixant de manière irréversible au niveau du récepteur GABA (situé au niveau de la synapse inhibitrice de la contraction musculaire) et sur le récepteur glutamate H (situé au niveau de la cellule nerveuse) (Syngenta, 2005). Cette fixation provoque un blocage des canaux chlore en position ouverte et donc un flux entrant d'ions chlore au sein des cellules nerveuses, il s'ensuit une hyperpolarisation cellulaire qui bloque toute activité nerveuse et entraîne une inhibition de la contraction musculaire de l'insecte donc une paralysie (Bloomquist, 2003).

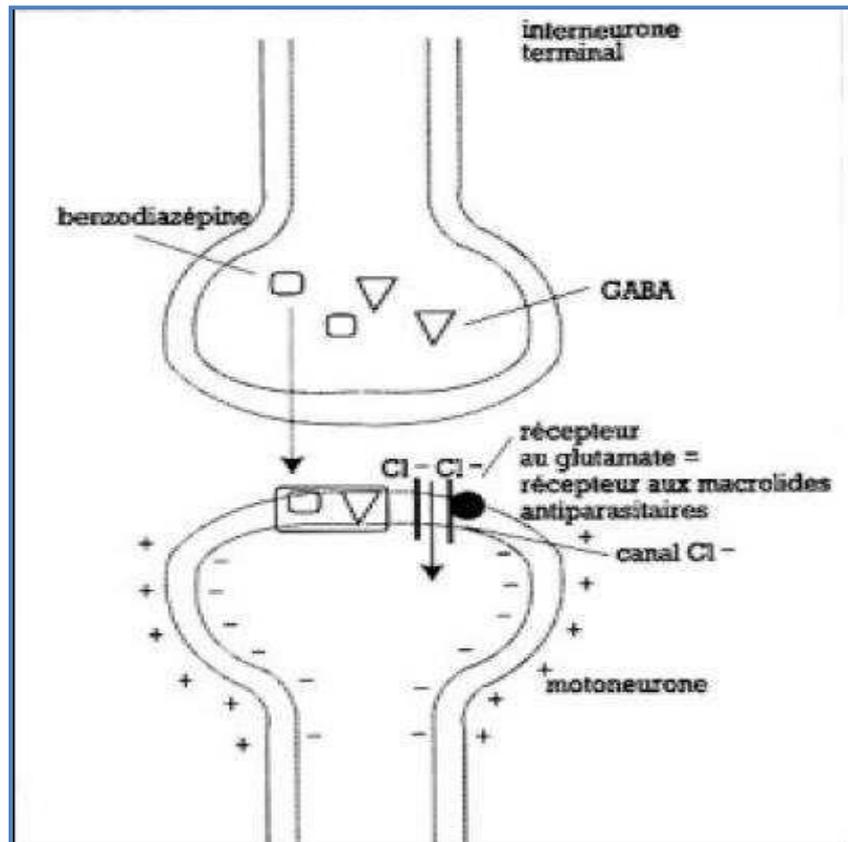


Figure 02 : Mode d'action de l'Emamectine benzoate (Beugnet, 1997).

## 9. Pharmacocinétique de l'Emamectine benzoate (Proclaim<sup>®</sup>)

L'Emamectine benzoate est faiblement métabolisé par l'organisme et donc rapidement éliminée et excréter en majeure partie dans les excréments (plus de 98% du total des résidus radioactifs est observé chez les rats après une administration unique par voie orale d'une faible ou forte dose de l'Emamectine benzoate). Cependant, une faible radioactivité est observée dans les urines ( $\leq$  à 0,4%) et au niveau des tissus ( $\leq$  à 1,6%) (Mushtaq, 1996).

## 10. Toxicologie de l'emamectine benzoate

### 10.1 Toxicité aiguë

Les signes observés de la toxicité aiguë suite à une exposition orale dans toutes les études sont : des tremblements, une ataxie, une activité diminuée, une ptose et une perte de réflexe. En plus les rats ont montrés une irritation et hypersalivation ainsi qu'une dégénérescence du cerveau, de la moelle épinière et du nerf sciatique (EMEA, 2003)

## 10.2 Toxicité chronique:

Le principal effet chronique est en premier lieu neurotoxique, les principaux symptômes sont des signes cliniques de neurotoxicité, une diminution du poids corporels des animaux, une constipation et des lésions histo-pathologiques au niveau du nerf sciatique (*EMEA, 2003*). Etant donné que la cible de l'émamectine benzoate est les récepteurs glutamate au niveau des terminaisons nerveuses ses effets chroniques sont plus importants sur le système nerveux est basée en une dégénérescence de la moelle épinière et du cerveau et des anomalies neurologique (*Federal Register, 2003 ; FINAL REPORT . 2007*).

## 11. Comportement dans l'environnement

La majeure voie de dégradation de l'émamectine benzoate dans le sol est l'oxydation. En contact avec le xénon il est rapidement dégradé, le clivage des liaisons osidiques de la molécule donne naissance à des groupements monosacharidiques et des aglycones (*Roberts, 1998*). Dans la plante: L'émamectine benzoate est rapidement dégradé en complexes polaires de faible poids moléculaires (*Roberts, 1998*)

## 12. Biomarqueurs d'exposition

Un biomarqueur est un indicateur de toute modification morphologique, structurale, ou physiologique au niveau tissulaire, cellulaire, ou moléculaire, d'un organisme. Dans le contexte toxicologique, le biomarqueur est un moyen de quantification objective du niveau d'exposition d'un organisme à une substance chimique toxique.

Les paramètres biochimiques qui pourraient être mis à profit comme biomarqueur de l'exposition animale. Les plus fréquemment analysés, cholestérol total, LDL, HDL, glycémie, triglycéride, créatinine, urée, transaminases (alanine aminotransférase et aspartate aminotransférase), phosphatase alcaline. Ces enzymes ne présentent quantitativement qu'une partie infime des protéines plasmatiques, elles sont mises en évidence grâce à leur activité catalytique spécifique sur des composés appropriés. Ces enzymes existent normalement dans le sérum en quantité relativement constante, mais dès qu'un organe ou un tissu est lésé à la suite d'une infection, ou nécrose...etc... les enzymes solubles présentent dans les cellules de ce tissu ou de cet organe franchissent les limites cellulaires, et passe dans le sérum. Il en résulte une augmentation du taux

des enzymes sériques dont la nature dépend de l'organe ou du tissu lésé. Cette augmentation n'apparaît que si un nombre suffisamment élevé de cellule est détruit, La sémiologie enzymatique permet la connaissance des perturbations tissulaires de l'organe ou du tissu lésé et peut fournir des indications sur l'étendue des dégâts(*Bernard, 1989*).

La majorité des insecticides sont métabolisés chez les mammifères et sont facilement éliminés par l'appareil digestif mais leur grand caractère lipophile les rend des substances actives et toxiques, qui ont une influence sur le foie, le système nerveux, les reins etc...

### **13. Objectifs de l'étude**

L'objectif principal de notre étude est l'évaluation de la toxicité aiguë et de la toxicité subchronique d'un insecticide Proclaim<sup>®</sup>, matière active à base d'émamectine benzoate, chez le rats wistar.

Cette étude va nous permettre d'une part de calculer la DL50 et d'apprécier d'autre part les critères cliniques (comportement, poids,...), biologiques (hématologie, biochimie,...) et examen histologique des différents organes (foie, rein, colon) suite à une exposition des rats pendant 28 jours au Proclaim<sup>®</sup>.

Nous avons envisagé d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 07 animaux dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la forte dose, afin d'observer, une fois la période de traitement écoulée, la persistance ou la réversibilité de tout effet toxique. Après interruption de deux mois de traitement. L'étude s'est déroulée au sein du laboratoire de pharmacotoxicologie du Centre de Recherche du Groupe SAIDAL.

# *Matériel et Méthodes*

## CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES

### 1. Matériel biologique :

L'évaluation de la toxicité aiguë et subchronique de l'insecticide Proclaim<sup>®</sup> est effectuée sur 112 rats Wistar males âgés de trois mois, pesant  $180 \pm 20$ g fournis par CRD SAIDAL répartis en 07 lots de 10 rats pour l'étude de la toxicité aiguë et 6 lots de 7 rats pour l'étude de la toxicité subchronique dont 2 lots satellites.

Avant tout traitement, les animaux bénéficient d'un temps d'adaptation de 10 jours. Les animaux témoins et traités sont isolés dans des cages avec eau et aliment à volonté et soumis à des conditions expérimentales identiques de température ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), d'hygrométrie (55 à 60%) et de photopériode (12 heures). Les animaux sont nourris par des aliments fournis par l'ONAB d'Alger (Tableau 5). La valeur énergétique pour 100g d'aliment est de 310 Kcal .

**Tableau 5** : Composition de l'alimentation des rats

Aliment	Quantité en %
Glucides	49,80
Protéines	23,50
Lipides	5,00
Complexe minéral-vitamine	5,70

## 2. Méthodes:

### 2.1. Etude de la toxicité aigue

Dans l'étude de la toxicité aigue, le produit à tester est administré par voie orale aux 7 lots de rats, mis à jeun la veille du test. Chaque lot reçoit 2ml d'une concentration variant entre 0 et 2000 mg/kg. Afin de déterminer la toxicité aigue du produit, une concentration unique de Proclaim<sup>®</sup>. Le lot témoin recoit de l'eau. Les animaux sont ensuite mis en observation pendant une durée totale de 14 jours, afin de déceler toute manifestation toxique éventuelle et la mortalité est reportée quotidiennement.

Pour la détermination de la DL50, nous avons suivi la méthode de Miller et Tainter (1994). Le taux de mortalité observé est ainsi reporté en fonction de la concentration administrée avec une correction pour les pourcentages extrêmes (0% et 100 %). Cette dernière est effectuée selon les formules mathématiques suivantes :

$$[0\% = 0,5 / n \times 100 ; 100\% = (n - 0,5) / n \times 100]$$

### 2.2. Etude de la toxicité subchronique

Dans l'étude de la toxicité subchronique 42 rats sont répartis en 6 groupes de 7 individus chacun (Tab. 6):

- Groupe témoin ( lot T), reçoit la solution véhicule ;
- Groupe traité avec une concentration faible (lot P), reçoit le 1/32 ème de la DL50 ;
- Groupe traité avec une concentration moyenne (lot M), reçoit le 1/16 ème de la DL50 ;
- Groupe traité avec une concentration forte (lot F), reçoit le 1/8ème de la DL50.
- Groupe satellite ( lot S), reçoit le 1/8ème de la DL50 ;
- Groupe satellite témoin (lot St), reçoit la solution véhicule .

**Tableau 6 :** Concentration de Proclaim<sup>®</sup> administrées aux 5 groupes expérimentaux pour l'étude de la toxicité subchronique.

<b>Groupe</b>	<b>Identification</b>	<b>Concentration de Proclaim<sup>®</sup> administrée en mg/kg</b>
T	Témoin	0
P	Concentration faible	40, 62
M	Concentration moyenne	81, 25
F	Concentration forte	162, 5
S	Satellite	162.5
Ts	Satellite témoin	0

Les concentrations administrées sont calculées sur la base de la valeur de la DL50 déterminée au cours de l'étude de toxicité aiguë.

Le Proclaim<sup>®</sup> est administré quotidiennement aux rats des lots traités pendant une période de 28 jours, pendant laquelle les animaux sont minutieusement observés, de manière à déceler toutes les manifestations éventuelles de toxicité consécutives à l'accumulation de l'insecticide Proclaim<sup>®</sup> dans l'organisme.

En plus de l'observation comportementales rigoureuse, les mesures et les examens suivants sont réalisés :

- Etude de l'évolution pondérale ;
- Examens hématologiques et biochimiques ;
- Dosage des marqueurs de stress oxydatif ;
- Nécropsie ;
- Examens histopathologiques.

### 2.2.1 Etude de l'évolution pondérale

L'étude de l'évolution pondérale est effectuée par pesée des animaux au 1<sup>er</sup>, 7<sup>e</sup>, 14<sup>e</sup> et au 28<sup>e</sup> jour de traitement.

### 2.2.2 Examens hématologiques et biochimiques

#### ▪ Prélèvements

Cinq prélèvements sanguins de 4 ml sont effectués au niveau du sinus rétro- orbitaire après une légère anesthésie à l'éther à J1, J7, J14, J21 et J28 soit un total de (154) prélèvements. Un volume de 1 ml est prélevé sur tube hépariné, en vue de l'étude des paramètres hématologiques et un volume de 3 ml est recueilli sur tube sec afin de réaliser l'analyse des différents paramètres biochimiques étudiés (Tab. 7).

**Tableau 7 :** Examens hématologiques, biochimiques et biomarqueurs de stress oxydatif étudiés lors du test de toxicité subchronique

PARAMETRES HEMATOLOGIQUES	PARAMETRES BIOCHIMIQUES	PARAMETRES STRESS OXYDATIF
GLOBULES BLANCS	GLYCEMIE	TBARS
	CHOLESTEROL	
GLOBULES ROUGES	TRIGLYCERIDE	PROTEINES CARBONYL
	HDL / LDL	
HEMATOCRITE	UREE	CATALASE
	CREATININE	
HEMOGLOBINE	PHOSPHATASE ALCALINE	GST
	TRANSAMINASE (GOT , GPT)	GSH

Au terme des 28 jours de traitement, les rats sont sacrifiés. Des prélèvements hépatiques, rénaux et coliques sont effectués afin de réaliser les différents dosages (Protéines totales, TBARS, GSH réduit, activité GST et catalase) et l'étude histologique.

## ▪ Exploration des paramètres biochimiques sériques

### – Dosage de la phosphatase alcaline

Le dosage de la phosphatase alcaline (PAL) est effectué par la technique colorimétrique de *Bowers (1966)*, avec des substrats dont la déphosphorylation libère un produit coloré. La PAL catalyse l'hydrolyse du p-nitrophenyl phosphate à pH10, en libérant le p-nitrophenol et un groupement phosphate selon la réaction suivante:



Un volume de 1,2 ml de réactif est ajouté à 20 µl d'échantillon. Les solutions sont par la suite incubées à 25°C. La lecture de l'absorbance des solutions après 1, 2 et 3 mn d'incubation est effectuée à une longueur d'onde de 405 nm. Le taux de phosphatase alcaline exprimé en g/l est donné par l'équation suivante:

$$\Delta A / \text{min} \times 3300 = \text{U/L de PAL}$$

### – Dosage de la Transaminase Glutamo Oxaloacétique (GOT)

Le dosage de la GOT est effectué en utilisant la réaction couplée de la malate-déshydrogénase (MDH) en s'appuyant sur la mesure de la vitesse de disparition du NADH (Bergmeyer, 1978) :



Un volume de 1ml de réactif est ajouté à 0,1ml d'échantillon et le tout est incubé à 25°C. La lecture de l'absorbance (A) des solutions après incubation est effectuée à une longueur d'onde de 340 nm. Le taux de GOT exprimé en U/L est donné par l'équation suivante:

$$\Delta A / \text{min} \times 1745 = \text{U/L}$$

### - Dosage de la GPT

Le dosage de la GPT est effectué en utilisant la réaction secondaire qui permet de suivre l'oxydation du NADH, H<sup>+</sup>, dont le taux est proportionnelle à l'activité catalytique de l'enzyme (GPT) (Bergmeyer, 1978). La transaminase glutamo pyruvique catalyse la réaction suivante :



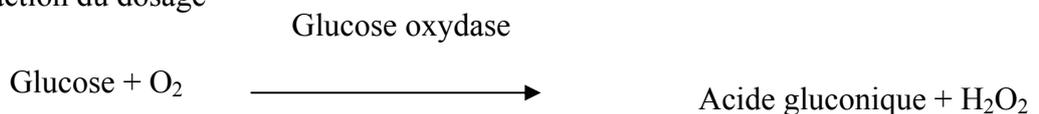
Un volume de 1ml de réactif est ajouté à 0,1ml d'échantillon et le tout est incubé à 25°C. La lecture de l'absorbance (A) des solutions après 1, 2, 3 et 4mn d'incubation est effectuée à une longueur d'onde de 340 nm. Le taux de GPT exprimé en U/L est donné par l'équation suivante:

$$\Delta A / \text{min} \times 1745 = \text{U/L}$$

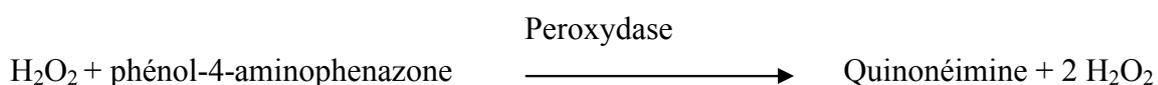
### - Dosage de la Glycémie

Le dosage du glucose est effectué selon la méthode enzymatique colorimétrique de Trinder (1969) impliquant un glucose oxydase. Le glucose est transformé par l'enzyme glucose oxydase en gluconolactone, hydrolysé en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène, selon la réaction chimique suivante :

**Réaction 1 :** réaction du dosage



**Réaction 2 :** réaction indicatrice

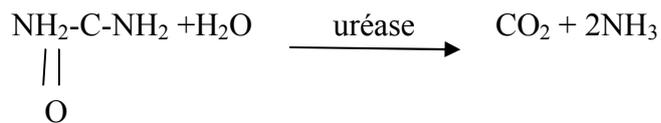


Trois échantillons sont préparés. Un blanc contenant 1,0 ml de réactif, un standard contenant 1,0ml de réactif et 10 µl de standard et enfin un échantillon contenant 1,0ml de réactif et 10 µl d'échantillon. L'ensemble est incubé à 37° C pendant 10 minutes. La lecture de l'absorbance (A) des solutions est effectuée à une longueur d'onde de 505 nm. Le taux du glucose exprimé en g/l est donné par l'équation suivante :

$$(A \text{ échantillon} / A \text{ standard}) \times 100 = \text{g/l}$$

### - Dosage de l'urée

L'urée est dosée en cinétique selon la réaction suivante :



Au cours de cette réaction, les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte, le dicarboxylindophenol, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée (Chaney,1962).

Trois échantillons sont préparés. Un blanc contenant 1,0 ml de réactif, un standard contenant 1,0ml de réactif et 10 µl de standard et enfin un échantillon contenant 1,0ml de réactif et 10 µl d'échantillon. L'ensemble est incubé à 37° C pendant 10 minutes.

La lecture des absorbances (A) est effectuée à une longueur d'onde de 590 nm. Le taux d'urée en g/l est obtenu par l'équation suivante

$$\Delta A \text{ échantillon} / \Delta A$$

### - Dosage de la Créatinine

C'est le catabolite de la créatine et de la phospho-créatine d'origine musculaire. La créatinine est filtrée par le glomérule rénal (Hare, 1950). En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate un complexe coloré (couleur jaune orangé), dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en créatinine.

Pour le dosage de la créatinine, trois échantillons sont préparés. Un blanc contenant 1,0 ml de réactif, un standard contenant 1,0ml de réactif et 10 µl de standard et enfin un échantillon contenant 1,0ml de réactif et 10 µl d'échantillon. L'ensemble est incubé à 37° C pendant 10 minutes.

Pour ce paramètre, on effectue deux lectures des absorbances (A) à une longueur d'onde de 492 nm. La première lecture après 30 secondes, la deuxième après une minute. Une fois les lectures faites, on calcule la variation de la densité optique pour le standard et pour les échantillons selon l'équation suivante :

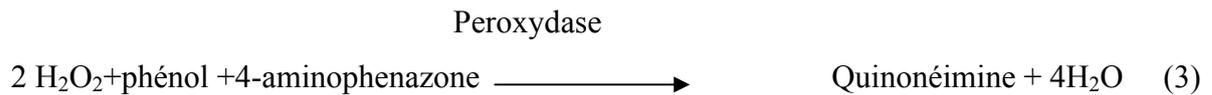
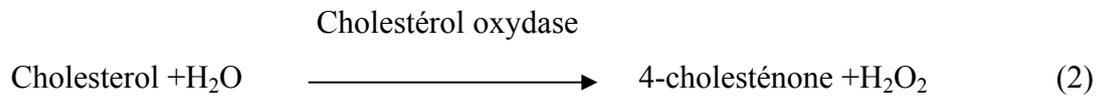
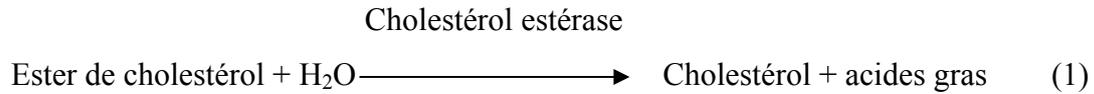
$$(\Delta DO = DO2 - DO1)$$

Le taux de créatinine en g/l est obtenu par l'équation suivante:

$$[(\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}) / (\Delta A \text{ standard} - \Delta A \text{ blanc})] \times 2 = \text{mg / dl}$$

### - Dosage du Cholestérol Total

Le dosage du cholestérol est effectué selon la méthode enzymatique colorimétrique impliquant l'enzyme cholestérol oxydase (Trinder, 1969). En effet, les esters de cholestérol sont hydrolysés par une cholestérol estérase en cholestérol libre et en acides gras. Le cholestérol total est oxydé par une cholestérol oxydase en 4-cholesténone et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxydase, oxyde le 4-aminophénazone et le phénol en quinonéimine de couleur rose selon les réactions chimiques suivantes:



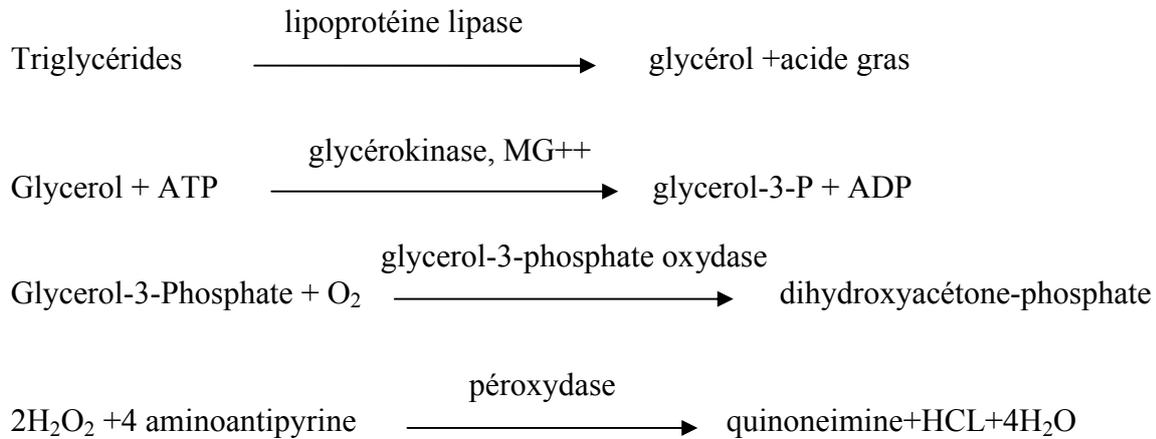
Trois échantillons sont préparés. Un blanc contenant 1,0 ml de réactif, un standard contenant 1,0ml de réactif et 10 µl de standard et enfin un échantillon contenant 1,0ml de réactif et 10 µl d'échantillon. Les solutions sont laissées à température ambiante pendant 10 minutes.

La lecture des absorbances (A) est effectuée à une longueur d'onde de 505 nm. La concentration du cholestérol en g/l est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$(A \text{ échantillon} / A \text{ standard}) \times 200 = \text{mg} / \text{dl}$$

### - Dosage des Triglycérides

Les triglycérides sont dosés par la méthode colorimétrique et enzymatique de Fossati, (1982). Le glycérol, libéré suite à l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase, est transformé en glycérol-3-phosphate grâce à l'action de la glycérokinase. Le glycérol-3-phosphate subit l'action de la glycérophosphate oxydase pour former la déhydroxy-acétone phosphate et le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci en présence de peroxydase, oxyde un groupement chromogène (amino-4-antipirine / chloro-4-phénol), pour former un composé coloré en rose. les réactions chimiques sont les suivantes:



Afin de réaliser ce dosage, trois échantillons sont préparés. Un blanc contenant 1,0 ml de réactif, un standard contenant 1,0ml de réactif et 10 µl de standard et enfin un échantillon contenant 1,0 ml de réactif et 10 µl d'échantillon. L'ensemble est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture est effectuée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 505 nm. Le taux de triglycérides exprimé en g/l est donné par l'équation suivante :

$$(A \text{ échantillon} / A \text{ standard}) \times 200 = \text{mg} / \text{dl}$$

### Dosage de HDL<sub>C</sub>

Very low density lipoproteins (VLDL) et low density lipoproteins (LDL) sont précipités par le phosphotungsten en présence des ions de magnésium à partir du sérum. Après homogénéisation, on centrifuge le mélange et on récupère le surnageant. A partir de ce dernier on dose le high density lipoproteins ( l'HDL) (Grove, 1979).

Un volume de 100µl de réactif est ajouté à 1ml d'échantillon le tout est laissé à température ambiante pendant 10min. les tubes sont centrifugés à 4000 t.p.m. pendant 20 minutes. Le surnageant récupéré est dosé de la même manière que celle utilisée pour doser le cholestérol total.

La lecture des absorbances se fait à une longueur d'onde de 505nm.

La concentration de l'HDL est déterminée à partir de la formule suivante :

$$\text{HDLc (g/l)} = \text{DO échantillon} \times 3,2$$

### - Dosage de LDL<sub>C</sub>

Les valeurs de LDL cholestérol ont été calculées sur la base de la formule de *Friedwald, (1972)*.

$$\text{LDL}_C \text{ (g/l)} = \text{cholesterol total} - \text{triglycerides} / 5 - \text{HDLc}$$

### ▪ Exploration des paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques ( l'hémoglobine (HB), les globules rouges (GR), les globules blancs (GB) et l'hématocrite (HT) ), sont explorés sur des échantillons de 2ml de sang recueilli dans des tubes à EDTA.

### ▪ Exploration de l'activité enzymatique hépatique:

#### - Dosage des Protéines Totales

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) permet de déterminer des concentrations très faibles de protéines. C'est une méthode colorimétrique, qui utilise le bleu de Coomassie G 250 qui s'associe au groupement amine des résidus protéiques modifiant son spectre d'absorption de façon à former une bande intense dont le maximum est à 595 nm. Les concentrations des protéines sont proportionnelles à l'intensité de l'absorption du réactif de Bradford.

#### - Dosage de l'Activité Catalase

La superoxyde dismutase et la catalase sont les enzymes antioxydantes les plus couramment mesurées dans les recherches liées aux radicaux libres. La catalase est l'enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le protocole est le plus direct (Aebi, 1984). Il consiste à mesurer la disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par la catalase contenue dans l'échantillon en mesurant l'absorbance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 240 nm.

### - Dosage des TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances assay)

Dans la réaction de dosage des TBARS, deux molécules d'acide thiobarbiturique réagissent avec une molécule de MDA (malonaldéhyde) pour former un pigment rose possédant une absorbance maximale entre 532 et 535 nm. L'échantillon hépatique est mélangé avec du TCA (30%), de l'acide ortho phosphorique suivis du TBA (0.74%). Ce mélange est incubé à la température d'ébullition 100°C pendant 30 mn. Après incubation, un volume de 3000 µl du n-butanol est ajouté et les échantillons sont centrifugés à 3000 tours pendant 15 minutes.

Le taux des TBARS est exprimé en nm/mg de protéine après lecture à 532 nm avec un coefficient d'extinction de  $1.56 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Buege, 1978).

### - Dosage des Protéines Carbonylées

Les protéines carbonylées sont mesurées après réaction avec la dinitrophénylhydrazine (DNPH) générant ainsi des groupements chromogènes appelés dinitrophenylhydrazones (Levine, 1990). Les homogénats déprotéinisés par une solution de TCA 20% et centrifugé à 4000 tpm pendant 5 minutes. Le précipité est dissout dans du NaOH 0.2M et du DNPH 10M puis incubé est réalisée à température ambiante pendant 30 minutes. Après une deuxième précipitation par le TCA, on procède à trois lavages avec la solution éthanol- éthyle acétate (v / v). La redissolution des protéines dans du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (20mM) permet la mesure de l'absorbance à 370 nm avec un coefficient d'extinction de  $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Les protéines carbonylées sont quantifiées en nm/milligramme de protéine.

### - Dosage des taux du Glutathion Réduit (GSH)

Le taux du glutathion dans les échantillons hépatiques, mesuré selon la procédure d'Elman (1959), est basé sur le développement de la couleur jaune de DTNB. Le complexe formé entre le GSH et le DTNB présente un maximum d'absorption à 412nm (Gonzalez, 2005).

Après déprotéinisation de l'échantillon par l'acide sulfosalicyclique à froid, le surnageant en présence de réactif d'Elman à 0.6mM développe une coloration jaune. Le taux de GSH est exprimé en µmole / mg de protéine avec un coefficient d'extinction de  $13.6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## - Mesure de l'activité de la GST

L'activité de la GST a été mesurée par spectrophotométrie en se basant sur la cinétique de formation d'un complexe entre un substrat des GST : le 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB), et le glutathion (GSH). Le complexe formé peut être visualisé par une augmentation de la densité optique à une longueur d'onde de 340 nm.

### 2.2.3 Etude histologique

La technique histologique passe par plusieurs opérations qui s'enchaînent et qui sont obligatoires. La technique histologique utilisée est celle de l'inclusion à la paraffine (adoptée par Martoja, 1967). Elle comporte 7 temps principaux:

- Prélèvement des pièces (rein, foie et colon);
- Fixation des pièces;
- Lavage, déshydratation et éclaircissement dans un solvant de la paraffine;
- Inclusion dans la paraffine et réalisation des blocs;
- Microtomisation et étalement des coupes;
- Coloration et montage des coupes.

## 3. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés de manière générale sous la forme : moyenne  $\pm$  écarttypes. Le traitement statistique des résultats est exploité en réalisant tout d'abord pour les paramètres biochimiques et hématologiques une analyse de variance à un facteur (ANOVA) après vérification de l'homogénéité des variantes. Dans le cas des biomarqueurs du stress oxydatif, la différence entre moyennes de différents lots est déterminée par le test de Kruskal et Wallis et pour les paramètres portant sur les études de réversibilité la différence entre moyennes de différents lots est déterminée par le test de Student.

Quand des différences significatives entre les moyennes sont signalées ( $P < 0.05$ ), elle seront soulignées par des étoiles ( \* ) sur les graphiques.

# *Résultats*

## CHAPITRE III - RESULTATS

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats obtenus dans notre travail relatifs aux paramètres étudiés.

### 1. Evaluation de la toxicité aiguë (Détermination DL50):

#### 1.1. Etude du comportement

Des signes de toxicité sont observés dans les premières 48 heures qui suivent l'administration de Proclaim<sup>®</sup>. Il s'agit essentiellement de troubles du système nerveux central, illustrés par des troubles locomoteurs (ataxie, parésie) et par des signes de stimulation neuromusculaire excessive (tremblements, prostration).

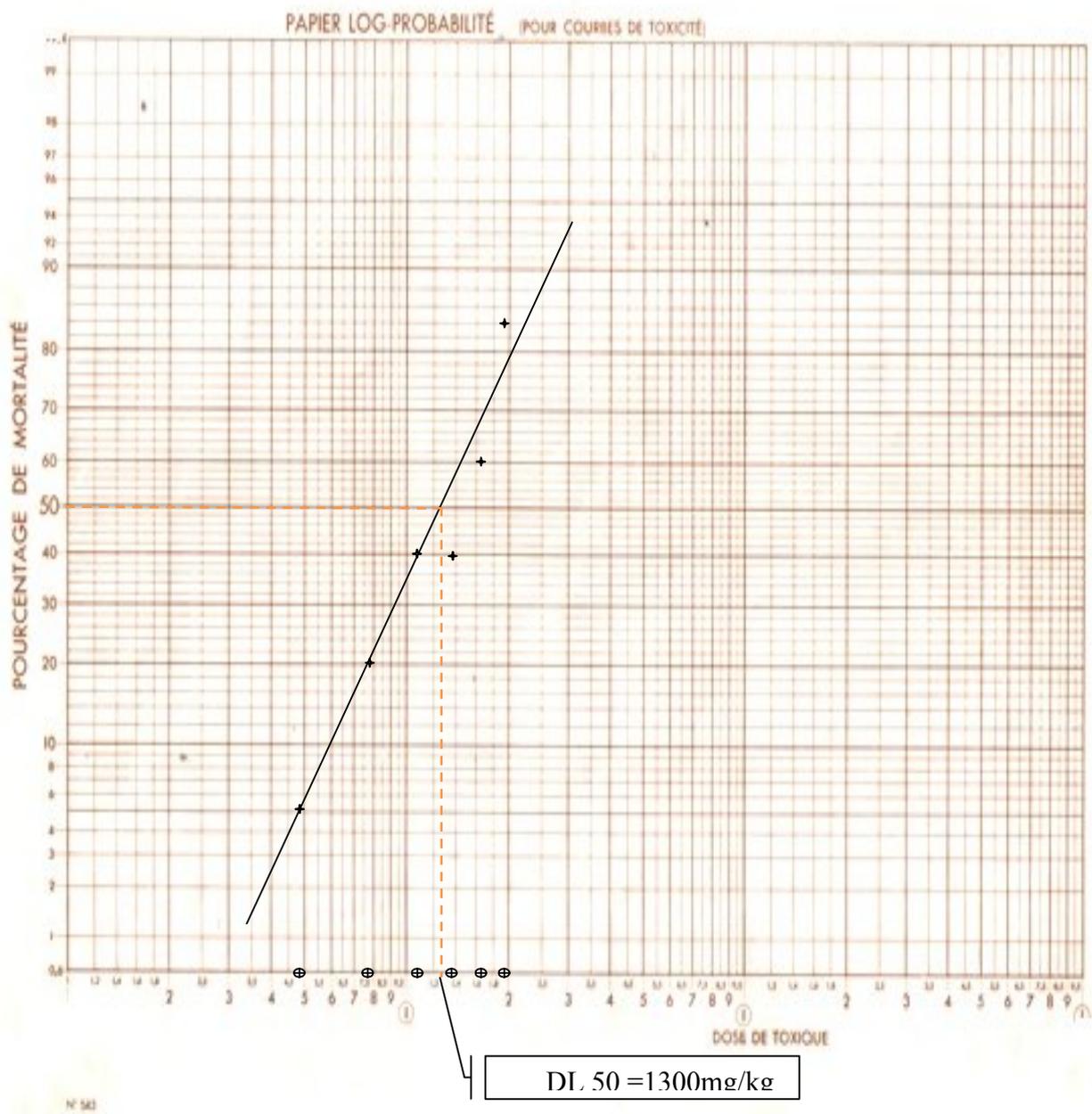
#### 1.2. Mortalité

Le tableau ci-dessous, regroupe le pourcentage de mortalité observée pendant 14 jours chez les rats traités par différentes concentration de Proclaim<sup>®</sup>.

**Tableau 8:** Pourcentage de mortalité observé chez les rats traités par le Proclaim<sup>®</sup>.

Concentration de Proclaim <sup>®</sup> (mg/Kg)	Effectif	Mortalité (nombre)	Mortalité en %
Témoin	10	0	0
500	10	0	0
800	10	2	20
1100	10	4	40
1400	10	4	40
1700	10	6	60
2000	10	10	100

La figure (3) permet d'estimer la DL50 à une valeur de **1300mg/kg**. Selon les normes de l'O.M.S. (2005), On peut classer le Proclaim® parmi les insecticides qui sont peu toxiques (Classe III).



**Figure 3:** Estimation de la DL50

## 2. Evaluation de la toxicité subchronique

### 2.1. Observation du comportement et étude de la courbe pondérale des animaux

Les résultats obtenus montrent qu'aucun trouble du comportement n'est observé chez les lots d'animaux recevant une faible concentration de Proclaim<sup>®</sup> de l'ordre de 40,62 mg/kg. En revanche, des tremblements ont été notés chez certains animaux des lots traités par les moyenne et forte concentrations de Proclaim<sup>®</sup>, en l'occurrence 81,25 mg/kg et 162,5 mg/kg. Cependant le taux de mortalité est nul pour l'ensemble des lots étudiés.

### 2.2. Variation de la courbe pondérale

Les pesées hebdomadaires tout au long de la durée de l'expérimentation (28 jours) ont permis de suivre l'évolution pondérale des animaux traités et témoins, les résultats des 4 pesées hebdomadaires effectuées pendant l'étude expérimentale (28 jours) sont rapportés dans le tableau (9).

**Tableau (9):** Valeurs moyennes des pesées hebdomadaires (g)  
des rats témoins et des rats traités par le Proclaim<sup>®</sup>

Temps (jours)	Lot témoin	Lot F	Lot M	Lot P
<b>0</b>	248,25 ± 2,51	248,00 ± 2,13	250,63 ± 0,75	251,50 ± 1,84
<b>7</b>	253,88 ± 1,33	251,88 ± 0,97	255,00 ± 0,80	254,38 ± 1,74
<b>14</b>	259,75 ± 2,09	250,38 ± 0,94	256,75 ± 0,92	258,75 ± 1,88
<b>21</b>	263,13 ± 3,38	253,63 ± 1,35	260,50 ± 1,02	262,75 ± 1,94
<b>28</b>	266,00 ± 3,27	260,88 ± 1,13	265,00 ± 1,51	265,50 ± 1,95

L'évolution des valeurs pondérales moyennes des animaux des lots traités par des moyennes et faibles concentrations (lot M : 81,25 mg/kg et lot P : 40,62 mg/kg) est comparable à celle des animaux du lot témoin pendant les 4 semaines de l'étude. Par contre, les valeurs pondérales moyennes des animaux

du lot traité par une forte concentration (lot F : 162,5 mg/kg) sont plus faibles par rapport au témoin.

Cette diminution est accentuée entre 2 et 3 semaines de traitement. Néanmoins, le test d'analyse de variance révèle que cette différence est non significative au seuil de 5 % pour les différents groupes. Ainsi, il semble que l'administration de Proclaim<sup>®</sup>, aux différentes concentrations utilisées, *per os* n'affecte pas l'évolution du poids corporel des rats.

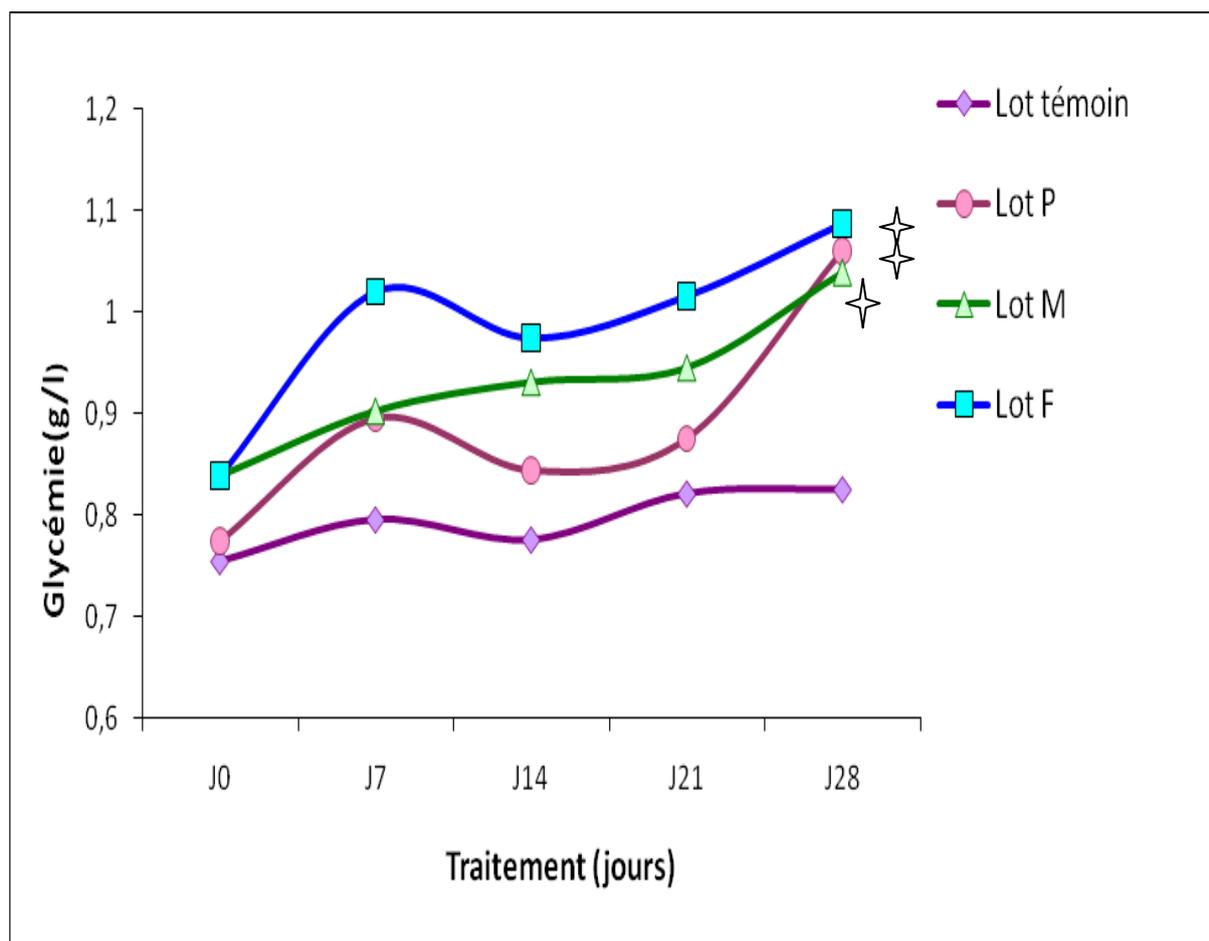
## **2.3. Examens biochimiques et hématologiques**

### **2.3.1. Variation des paramètres biochimiques sériques**

#### **➤ Variation de la glycémie**

Les dosages hebdomadaires représentés sur la figure (4), montrent qu'après 28 jours de traitement, la glycémie augmente de manière significative chez tous les lots traités aux différentes concentrations (lot F : 162,5 mg/kg ; lot M : 81,25 mg/kg et lot P : 40,62 mg/kg) par rapport aux témoins.

L'analyse de la variance des résultats obtenus, montre que les différences observées entre les 4 lots sont significative au seuil de 5% (P= 0,00002).



**Figure 4:** Evolution des valeurs moyennes de la glycémie des rats des lots témoin et traités par le Proclaim® sur 28 jours

### ➤ Variation de la cholestérolémie

Les dosages hebdomadaires de la cholestérolémie présentés dans le tableau 10 montrent une augmentation de la cholestérolémie chez les animaux témoins et traités à différentes doses (lot F : 162,5 mg/kg ; lot M : 81,25 mg/kg et lot P : 40,62 mg/kg) au 7<sup>ème</sup> jour post administration, pour ensuite diminuer et atteindre des valeurs très proches au 28<sup>ème</sup> jour. L'analyse de la variance montre que les différences observées entre les 4 lots ne sont pas significatives.

**Tableau 10** : Valeurs moyennes des taux sériques du cholestérol (g/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim<sup>®</sup> sur 28 jours

Temps (jours)	Lot témoin	Lot F	Lot M	Lot P
0	0,67 ± 0,03	0,68 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,66 ± 0,02
7	0,82 ± 0,05	0,70 ± 0,02	0,72 ± 0,05	0,77 ± 0,08
14	0,85 ± 0,04	0,70 ± 0,01	0,76 ± 0,02	0,80 ± 0,03
21	0,75 ± 0,02	0,71 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,74 ± 0,01
28	0,69 ± 0,01	0,70 ± 0,02	0,68 ± 0,02	0,67 ± 0,02

### ➤ Variation des taux sériques des triglycérides

Le tableau (11) représente les valeurs moyennes des triglycérides. Ainsi au 14<sup>e</sup> jour de traitement, le dosage montre une augmentation de leurs valeurs chez les lots ayant reçu des fortes et moyennes concentrations de Proclaim<sup>®</sup> (lot F : 162,5 mg/kg ; lot M : 81,25 mg/kg) par rapport au lot témoin. Ces valeurs diminuent et deviennent très proches au 28<sup>ème</sup> jour. Chez les rats traités à la plus faible concentration de Proclaim<sup>®</sup> (P : 40,62 mg/kg) les taux des triglycérides demeurent comparables à ceux du lot témoin.

**Tableau 11** : Valeurs moyennes des taux sériques des triglycérides (g/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim<sup>®</sup> sur 28 jours

Temps (jours)	Lot témoin	Lot F	Lot M	Lot P
0	0,53 ± 0,03	0,53 ± 0,05	0,51 ± 0,04	0,52 ± 0,03
7	0,53 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,58 ± 0,04	0,59 ± 0,04
14	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,03	0,62 ± 0,03	0,67 ± 0,05
21	0,56 ± 0,04	0,55 ± 0,05	0,57 ± 0,03	0,62 ± 0,04
28	0,55 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,53 ± 0,02

### ➤ Variation des concentrations sériques en HDL et LDL

Sur une durée de 28 jours de traitement au Proclaim<sup>®</sup>, on ne constate aucune variation des concentrations sanguines en HDL et LDL respectivement représentés sur les tableaux (12) et (13). L'analyse de la variance ne met pas en évidence une différence significative entre les animaux des lots témoin et ceux des lots traités par les concentrations forte, moyenne et faible (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg).

**Tableau 12** : Valeurs moyennes des taux sériques de HDL (g/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim<sup>®</sup> sur 28 jours

Temps (jours)	Lot témoin	Lot F	Lot M	Lot P
0	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,28 ± 0,01
7	0,28 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,02
14	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,01
21	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,01
28	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01

**Tableau 13 :** Valeurs moyennes des taux sériques des LDL (g/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim® sur 28 jours

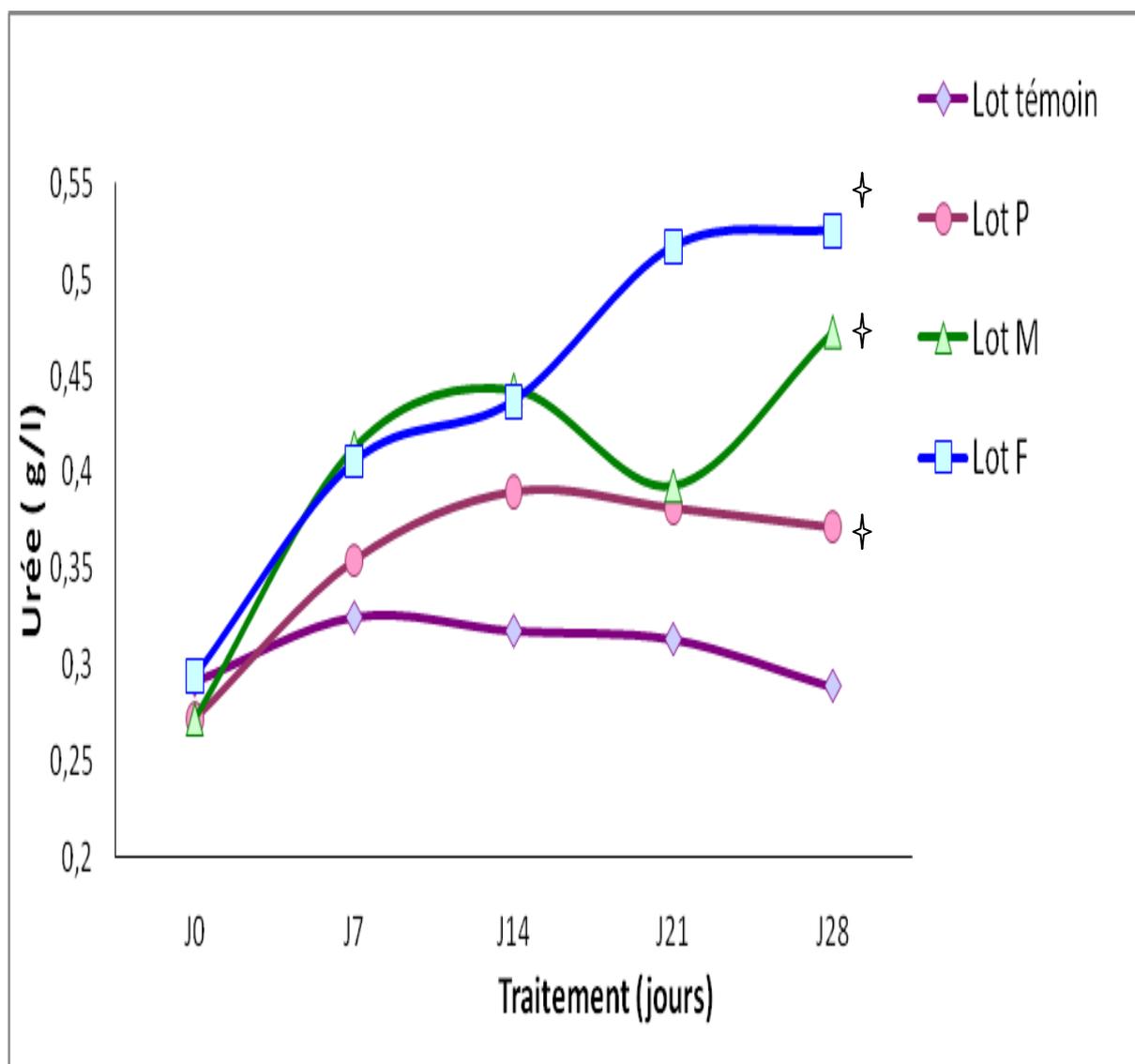
Temps (jours)	Lot T	Lot F	Lot M	Lot P
<b>0</b>	0,30 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,30 ± 0,03	0,29 ±0,02
<b>7</b>	0,32 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,08	0,38 ± 0,04
<b>14</b>	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,04
<b>21</b>	0,32 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,34 ± 0,03
<b>28</b>	0,31 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,30 ±0,02

### ➤ Variations de la créatinémie et de l'urémie

La figure (5) montre le suivi de l'urémie sur une durée de 28 jours.

L'analyse de la variance a mis en évidence une augmentation significative (P= 0.001) de l'urée chez les rats traités par rapport au rat témoin.

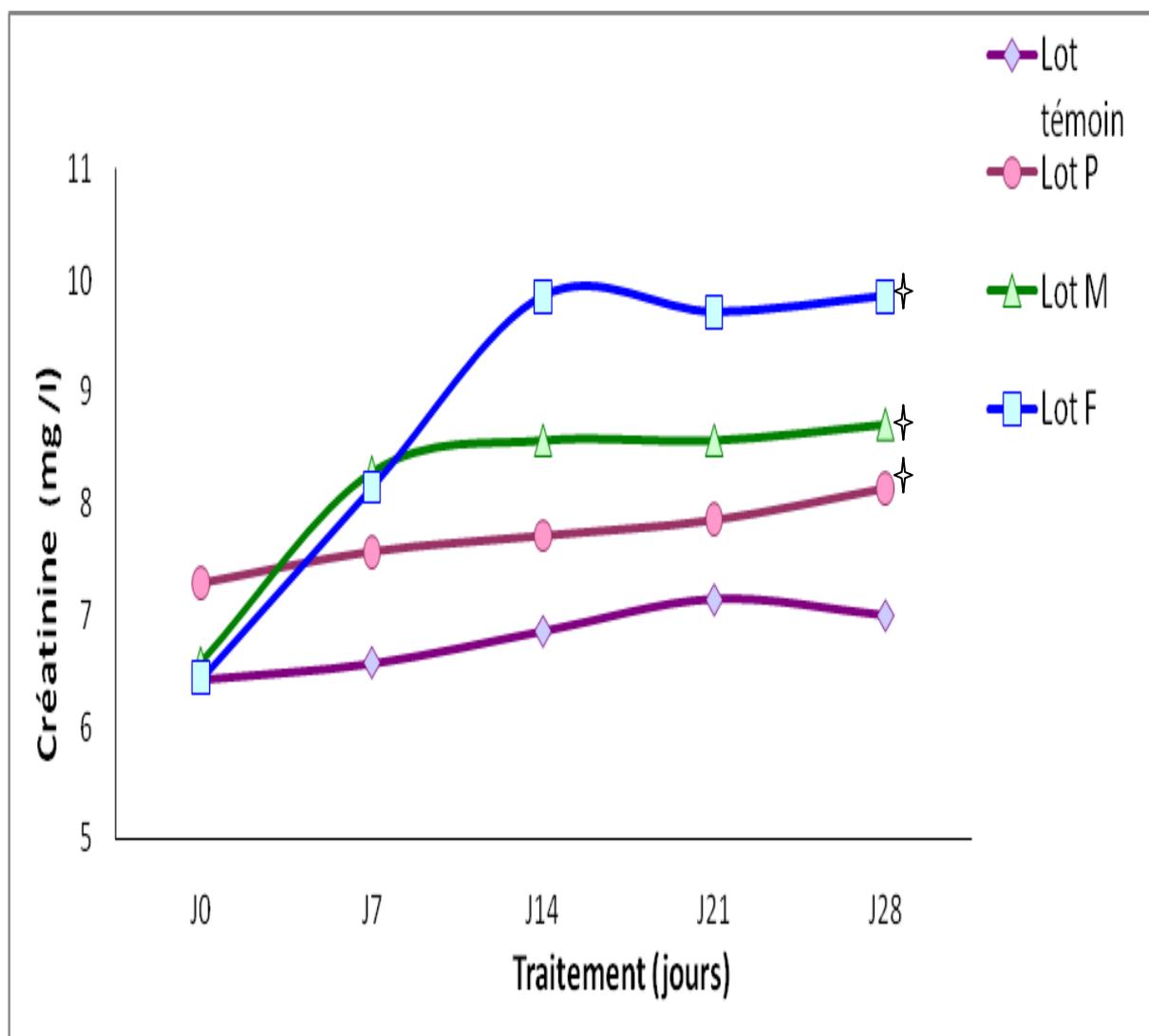
Cette augmentation est plus importante chez les rats exposés à une forte concentration de Proclaim® (162,5 mg/kg).



**Figure 5 :** Evolution des valeurs moyennes de l'urémie (g/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim<sup>®</sup> sur 28 jours

La figure (6) résume les résultats de l'évolution de la créatinémie chez les rats témoins et les rats traités par différentes concentration de Proclaim<sup>®</sup> (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg).

Les résultats obtenus révèlent une différence significative de la créatinémie chez les rats traités par rapport à ceux du lot témoin. (P= 0,0234).



**Figure 6 :** Evolution des valeurs moyennes de la créatinémie (g/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim<sup>®</sup> sur 28 jours

### ➤ Variation de la concentration sérique en phosphatase alcaline (PAL)

Les valeurs moyennes des concentrations sériques de la PAL représentées sur le tableau (14) se situent entre 150 U/l chez les rats témoins et 159,7 UI/l chez les rats du lot à forte concentration (162,5 mg/kg). Néanmoins, ces variations restent statistiquement non significatives. Ainsi, le Proclaim<sup>®</sup> ne semble avoir aucun effet sur les concentrations sériques de la PAL, quelque soit la concentration administrée (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg).

**Tableau 14 :** Valeurs moyennes de la concentration sérique de la PAL (UI / l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim<sup>®</sup> sur 28 jours

Temps (jours)	Lot T	Lot F	Lot M	Lot P
<b>0</b>	151,21 ± 4,06	149,57 ± 8,20	144,78 ± 10,31	148,95 ± 21,92
<b>7</b>	149,71 ± 22,15	154,28 ± 5,44	149,6 ± 9,26	156,14 ± 21,79
<b>14</b>	150 ± 25,07	155,85 ± 8,42	153,71 ± 11,60	159,71 ± 23,13
<b>21</b>	150,3 ± 31,22	153,28 ± 8,15	153,57 ± 14,42	153,71 ± 25,72
<b>28</b>	152 ± 28,55	156,02 ± 8,72	151,27 ± 16,22	156,02 ± 18,79

➤ **Variation des concentrations sériques en transaminases (GOT et GPT)**

Les résultats du suivi sur 28 jours des concentrations sériques en GOT et GPT sont rapportés dans les tableaux (15) et (16). L'analyse de la variance ne montre aucune différence significative de leurs valeurs quelque soit la concentration de Proclaim<sup>®</sup> administrée (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg).

**Tableau 15 :** Valeurs moyennes de la concentration sérique de la GOT (U/l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim<sup>®</sup> sur 28 jours

Temps (Jours)	Lot T	Lot P	Lot traité M	Lot F
<b>0</b>	53,88 ± 5,40	55,38 ± 2,25	54,77 ± 3,86	55,38 ± 4,06
<b>7</b>	55,9 ± 4,20	54,94 ± 2,37	54,54 ± 3,18	54,94 ± 3,82
<b>14</b>	55,11 ± 4,13	56,09 ± 0,68	54,73 ± 2,74	56,09 ± 4,05
<b>21</b>	56,34 ± 4,97	55,42 ± 1,13	55,64 ± 2,28	55,42 ± 3,99
<b>28</b>	56,12 ± 3,78	54,98 ± 4,14	55,75 ± 2,16	54,98 ± 3,50

**Tableau 16 :** valeurs moyennes de la concentration sérique de la GPT (U//l) des rats des lots témoin et traités par le Proclaim® sur 28 jours

Temps (Jours)	Lot T	Lot P	Lot traité M	Lot F
0	32,11 ± 5,94	26,07 ± 2,77	25,62 ± 2,03	30,37 ± 9,34
7	31,48 ± 5,72	26,28 ± 2,69	25,37 ± 1,56	30,59 ± 9,26
14	31,3 ± 6,46	31,3 ± 3,50	25,60 ± 1,79	31,49 ± 11,91
21	31,4 ± 5,71	31,4 ± 3,05	26,02 ± 2,34	31,25 ± 11,19
28	31,42 ± 5,29	31,45 ± 2,41	26,36 ± 2,82	30,99 ± 11,88

### 2.3.2. Paramètres hématologiques

Les valeurs individuelles des paramètres hématologiques des rats témoins et traités sont consignées dans le tableau (17). On ne constate aucune variation des paramètres hématologiques sur 28 jours de traitement. L'analyse de la variance ne met en évidence aucune modification statistiquement significative chez les rats traités par rapport aux témoins et ce quelle que soit la concentration utilisée de Proclaim® (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg). Ainsi les taux d'hémoglobine (HB), d'hématocrite (HT), de globules rouges (GR) et des globules blancs (GB) des rats traités sont restés comparables à ceux des rats témoins.

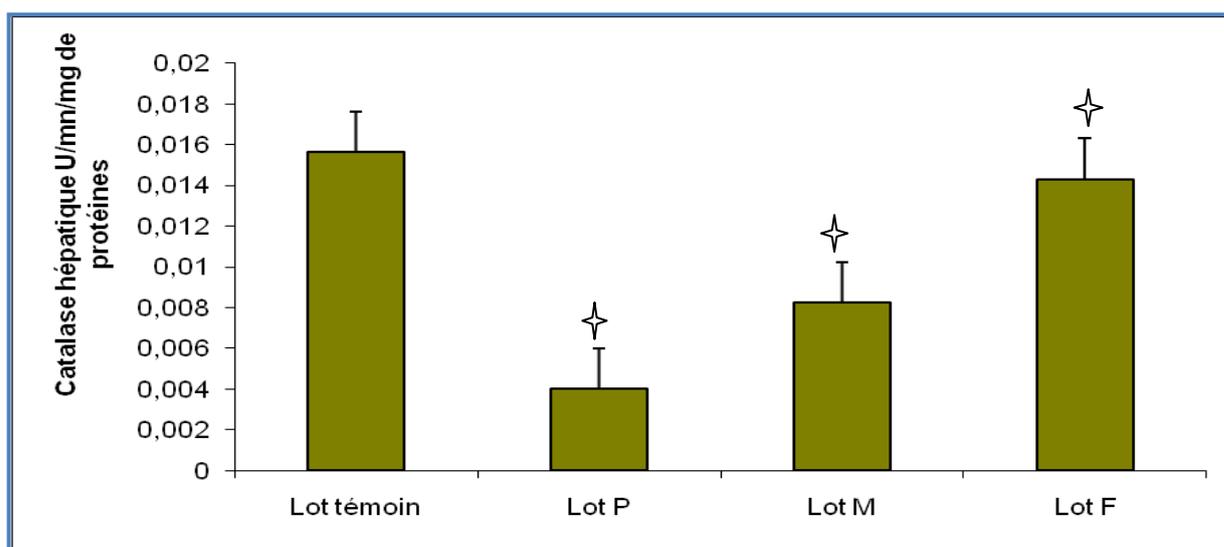
**Tableau 17 :** Evolution des paramètres hématologiques des rats témoins et traités par le Proclaim®

Paramètres	Période	Lots											
		Lot T			Lot F			Lot M			Lot P		
		<i>n</i>	$\bar{x}$	$\sigma$	<i>n</i>	$\bar{x}$	$\sigma$	<i>n</i>	$\bar{x}$	$\sigma$	<i>n</i>	$\bar{x}$	$\sigma$
<b>HB (g/l)</b>	J0	7	14,74 ± 0,28	7	14,6 ± 0,37	7	14,94 ± 0,29	7	14,64 ± 1,03				
	J7	7	15,15 ± 0,41	7	15,47 ± 0,17	7	14,38 ± 1,02	7	15,53 ± 0,31				
	J14	7	14,90 ± 0,28	7	15,15 ± 0,48	7	14,67 ± 1,26	7	15,44 ± 0,61				
	J21	7	15,04 ± 0,63	7	15,44 ± 0,38	7	15,28 ± 0,46	7	14,78 ± 0,27				
	J28	7	14,96 ± 0,31	7	15,35 ± 0,54	7	15,55 ± 0,38	7	15,02 ± 0,17				
<b>GB (×10<sup>9</sup>/l)</b>	J0	7	8,15 ± 0,77	7	8,31 ± 0,81	7	8,39 ± 0,96	7	8,71 ± 0,90				
	J7	7	7,1 ± 0,66	7	7,80 ± 0,72	7	6,37 ± 1,15	7	7,67 ± 0,40				
	J14	7	7,85 ± 0,85	7	7,48 ± 1,02	7	7,47 ± 1,47	7	7,66 ± 1,17				
	J21	7	7,82 ± 0,85	7	7,78 ± 0,80	7	7,41 ± 0,47	7	7,36 ± 0,36				
	J28	7	7,96 ± 0,65	7	7,82 ± 1,14	7	7,97 ± 0,83	7	7,54 ± 0,88				
<b>GR(×10<sup>6</sup>/l)</b>	J0	7	7,67 ± 0,46	7	7,75 ± 0,91	7	7,54 ± 0,32	7	7,90 ± 0,56				
	J7	7	7,68 ± 0,29	7	7,58 ± 0,48	7	7,82 ± 0,59	7	7,36 ± 0,36				
	J14	7	7,57 ± 0,38	7	7,59 ± 0,25	7	7,35 ± 0,37	7	7,75 ± 0,95				
	J21	7	7,54 ± 0,26	7	7,46 ± 0,36	7	7,49 ± 0,17	7	7,74 ± 0,87				
	J28	7	7,54 ± 0,41	7	7,50 ± 0,34	7	7,39 ± 0,74	7	7,41 ± 0,23				
<b>HT (l)</b>	J0	7	42,42 ± 0,84	7	41,88 ± 1,54	7	42,24 ± 1,10	7	42,72 ± 3,05				
	J7	7	44,04 ± 1,43	7	45,94 ± 0,90	7	40,60 ± 1,07	7	44,76 ± 1,88				
	J14	7	44,51 ± 1,27	7	44,82 ± 1,05	7	42,63 ± 3,16	7	45,42 ± 2,81				
	J21	7	44,85 ± 1,21	7	45,18 ± 2,04	7	44,94 ± 1,80	7	40,07 ± 2,43				
	J28	7	44,89 ± 1,42	7	44,99 ± 2,38	7	45,04 ± 1,67	7	44,07 ± 1,08				

## 2.4. Biomarqueurs du stress oxydatif

### ➤ Variation de l'activité de la catalase

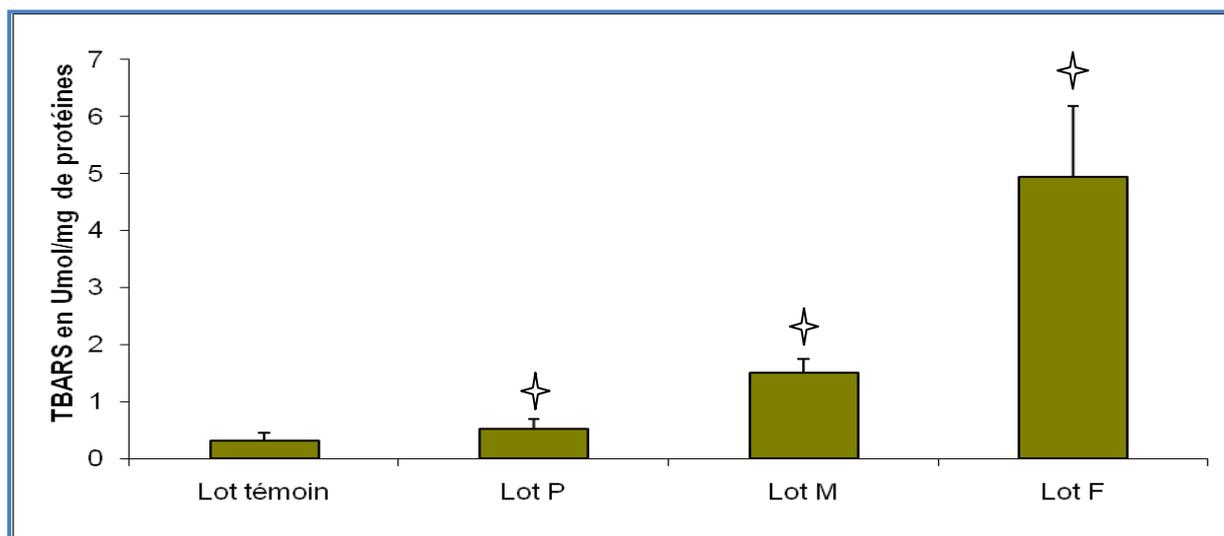
La figure (7) illustre les résultats de la mesure de l'activité de la catalase au 28<sup>e</sup> jour de l'administration des différentes concentrations de Proclaim® (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg). Les résultats montrent une réduction significative de l'activité de la catalase dans les homogénats tissulaires hépatiques au seuil de 5% (P= 0,0001).



**Figure 7 :** Activité de la catalase hépatique chez les rats témoins et traités par le Proclaim® au 28<sup>e</sup> jour de traitement

### ➤ Variation des TBARS

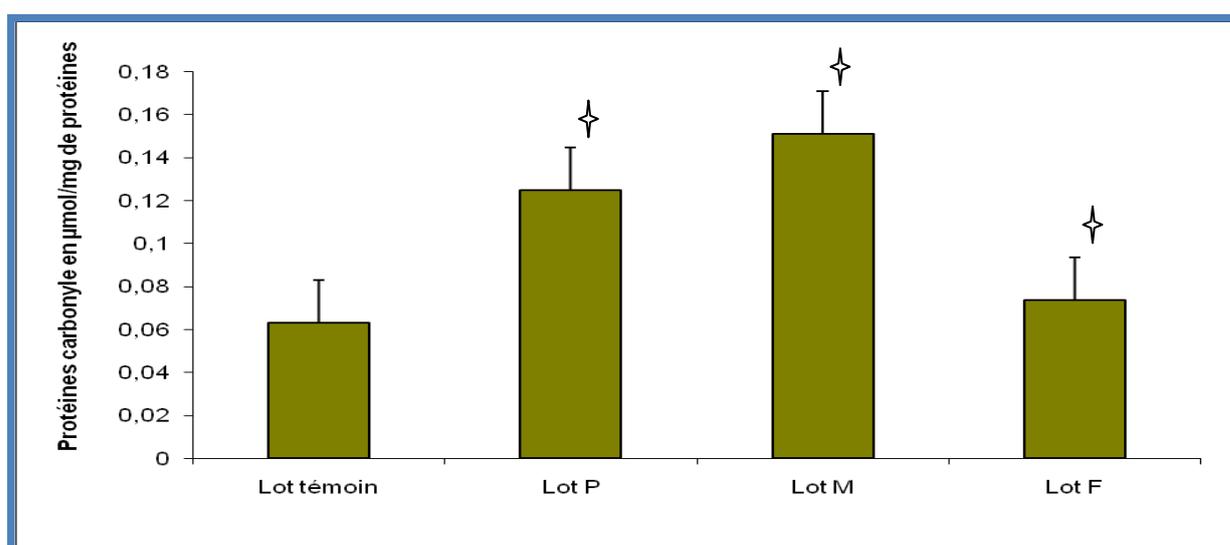
Le dosage des TBARS au niveau d'homogénats hépatiques est représenté dans la figure (8). Les résultats révèlent une très forte augmentation de l'ordre 606,25 %, 706,25, 1412,5 % pour les lots F (162,5 mg/kg), M (81,25 mg/kg) et P (40,62 mg/kg), comparé au témoin.



**Figure 8 :** Taux des TBARS hépatiques chez les rats témoins et traités par le Proclaim® au 28<sup>e</sup> jour

### ➤ Variation des protéines carbonyles

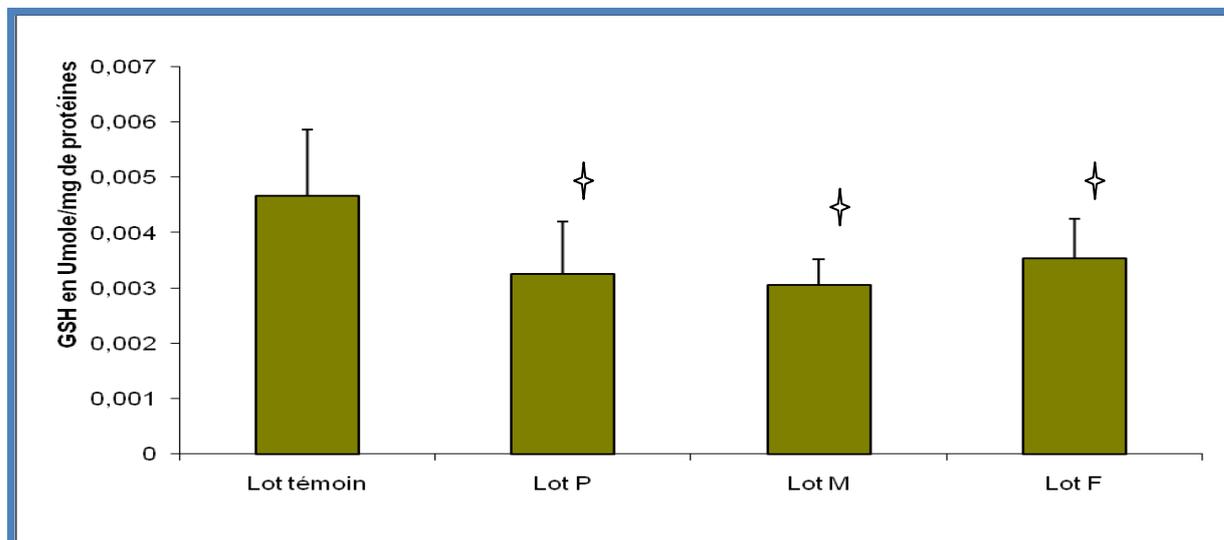
Les résultats des concentrations des protéines carbonylées dans les homogénats hépatiques sont représentés dans la figure (9). Les résultats obtenus montrent une très forte augmentation des concentrations des protéines carbonyles des lots P (116,34 %) et M (155,12 %) par rapport au témoin. En revanche, cette augmentation est limitée à 22,83 % pour le lot F comparé au lot témoin.



**Figure 9:** Taux hépatiques des protéines carbonylés chez les rats témoins et traités par le Proclaim® au 28<sup>e</sup> jour

### ➤ Variation de l'activité du glutathion réduit (GSH)

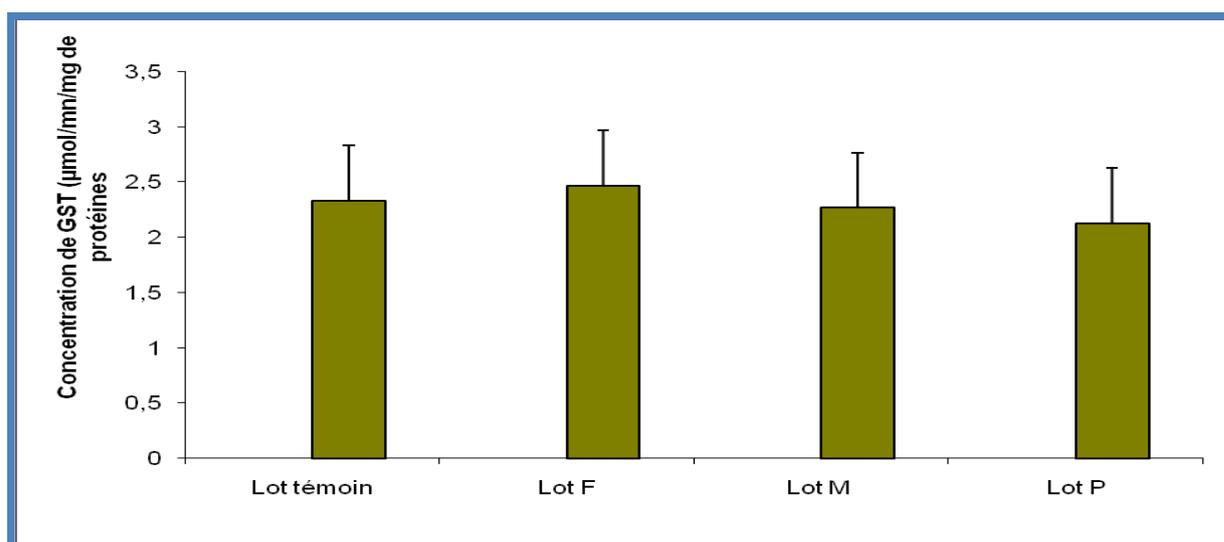
Comme le montre la figure (10), On constate une diminution significatives au seuil de 5% ( $P= 0,0001$ ) de la GSH hépatique chez les rats traités par rapport aux témoins cette diminution est de 76 % pour le lot F et de 65 % et 70% respectivement pour les lots M et P



**Figure 10:** Taux du glutathion hépatique réduit chez les rats témoin et traités par le Proclaim® au 28<sup>e</sup> jour

### ➤ Variation de l'activité du glutathion transférase (GST)

L'activité de la glutathion transférase (GST) est illustrée dans la figure (11). Ainsi nous ne constatons aucune différence significative entre les lots traités et le lot témoin.



**Figure 11 :** Activité de la glutathion transférase hépatique chez les rats témoins et traités par le Proclaim® au 28<sup>e</sup> jour

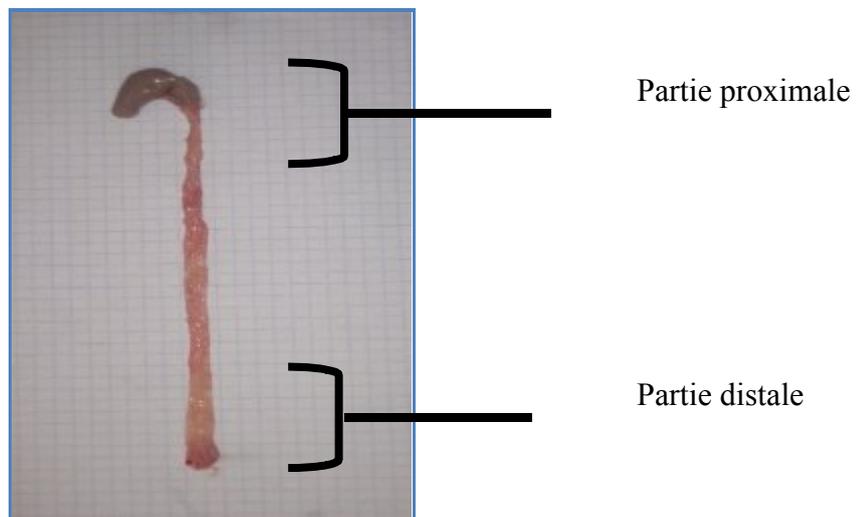
## 2.5. Résultats histologiques

### ➤ Observation macroscopique

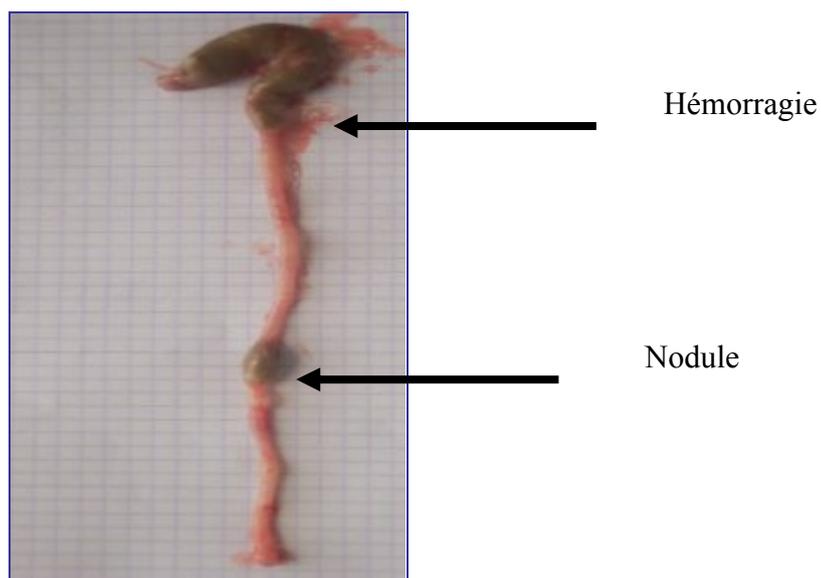
L'examen macroscopique des reins et des foies des rats traités par Proclaim<sup>®</sup> à différentes concentrations pour les lots F (162,5 mg/kg), M (81,25 mg/kg) et P (40,62 mg/kg) ne révèle aucune lésion spécifique ou particulière comparé aux mêmes organes des rats des lots témoins. En revanche, certaines anomalies sont observées au niveau du colon des rats traités : il s'agit essentiellement de nodules sur les parties distale et proximale des colons, des hémorragies plus ou moins importantes et un rétrécissement de la paroi colique en particulier au niveau de la partie distale du colon.

Ces anomalies ou lésions sont retrouvés chez tous les rats des lots traités aux différentes concentrations utilisées.

La planche I représente respectivement le colon d'un rat témoin (figure a) et colon traité à moyenne concentration par le Proclaim<sup>®</sup> (figure b).



**Figure a** : Colon d'un rat témoin (aspect normal)



**Figure b** : Colon d'un rat traité à moyenne concentration (81,25 mg/kg)  
(Présence de nodules, hémorragie, et un rétrécissement de la paroi colique)

**Planche I** : Observation des colons de rats du lot témoin et du lot traité par le Proclaim<sup>®</sup> à moyenne concentration (81,25 mg/kg).

---

## 2-5-2 Observations microscopiques

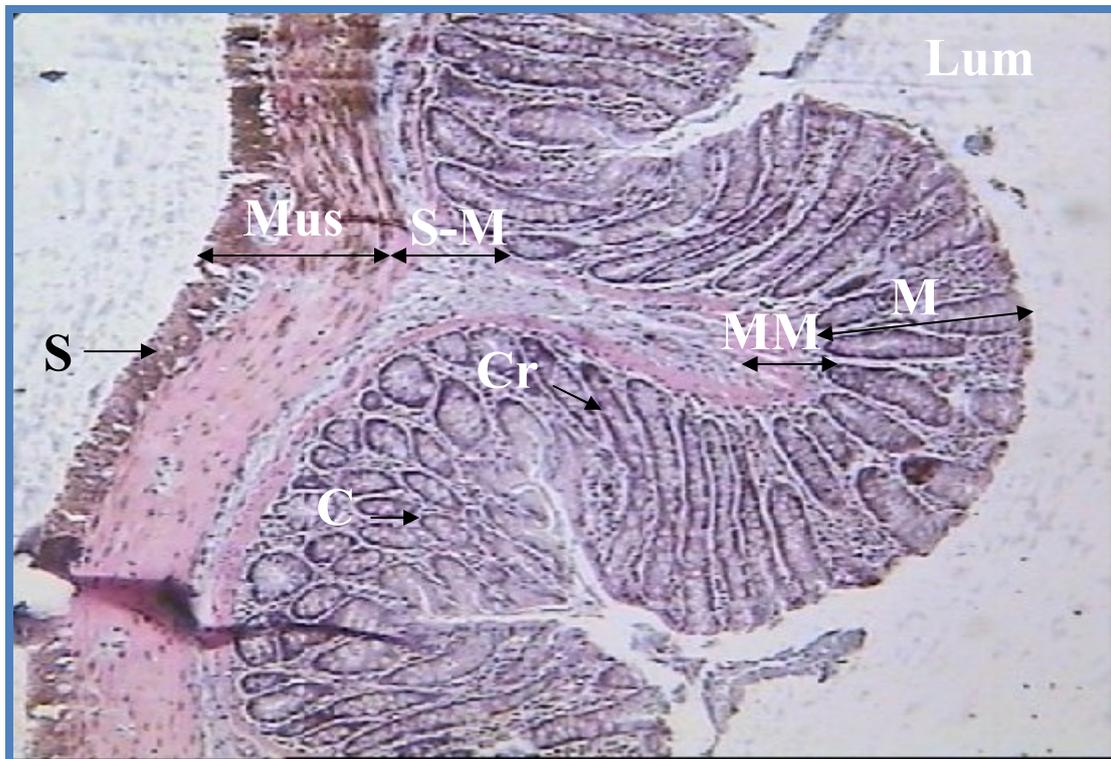
### ➤ Observation histologique de la paroi colique des rats témoins

La planche II représente une coupe histologique d'un colon d'un rat témoin. La structure est intacte et présente cinq couches, à partir de la lumière vers l'extérieur selon Chang, (1984) et Shansuddine, (1990).

- La muqueuse constituée d'un épithélium simple agencé en cryptes en forme de tubes et s'ouvrant dans la lumière digestive composé de deux types cellulaires ; les entérocytes et les mucocytes.

L'agencement des cryptes est très régulier à la surface du colon, si bien que ce tapis ressemble aux alvéoles d'une ruche lorsqu'on les observe au microscope ;

- La musculaire muqueuse représentée par des agrégats de cellules lymphoïdes séparant la muqueuse de la sous muqueuse ;
- La sous muqueuse formée du tissu conjonctif peu dense qui contient plusieurs vaisseaux sanguins;
- La musculuse, couche musculaire relativement épaisse et capable d'une activité péristaltique puissante; elle est constituée d'une couche interne circulaire et d'une couche externe longitudinale;
- La séreuse, couche qui entoure le colon ; elle est riche en vaisseaux lymphatiques



**M** : la muqueuse. **MM** : musculaire muqueuse. **S-M** : sous-muqueuse. **Mus** : musculeuse. **S** : la séreuse. **Lum** : lumière intestinale. **C** : le chorion (la lamina propriae). **Cr** : crypte de Liberkuhn

**Planche II** : Observation histologique de la paroi colique des rats du lot témoin.

Coupe histologique du colon d'un rat du lot témoin (Coloration HE. G×20).

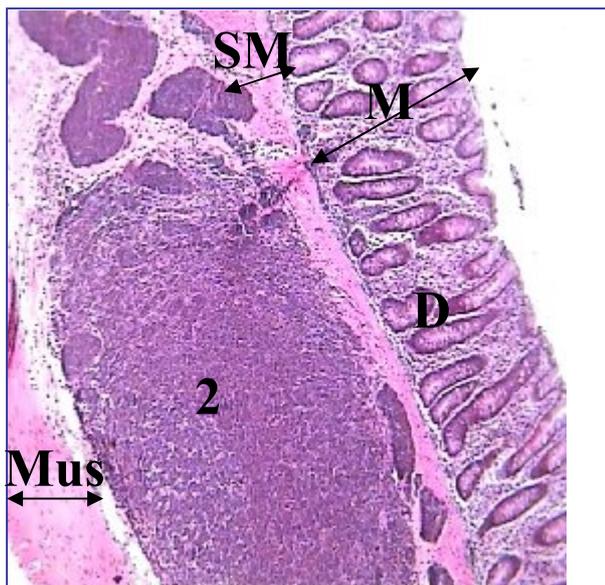
---

➤ **Observation histologique de la paroi colique des rats traités à petite et à moyenne concentration**

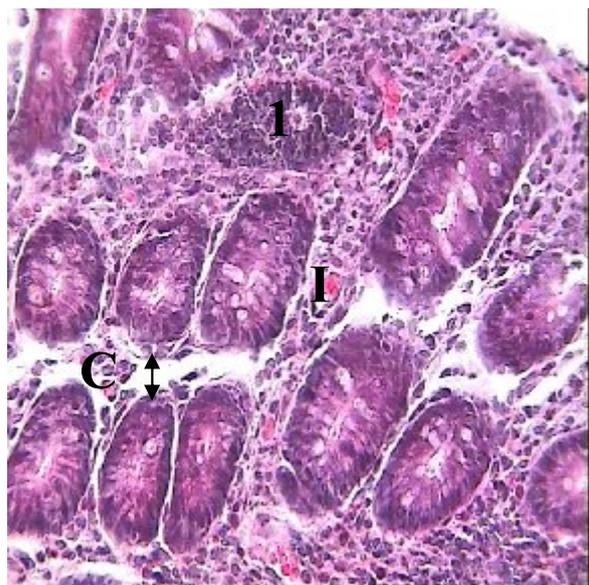
La planche (III), figure (a) et (b)) montre la présence d'agrégats lymphoïdes au niveau de la sous muqueuse et une hyperplasie de la plaque de Peyer avec un centre germinatif clair ainsi qu'une infiltration lymphocytaire du chorion chez les rats traités avec une faible concentration de Proclaim® (40,62 mg/kg).

La planche (III), figure (d) présente une augmentation de la masse des agrégats lymphoïdes précédemment observés chez le lot P, formant ainsi un follicule lymphoïde chez le lot de rats traité avec une concentration moyenne (81,25 mg / kg).

La planche (III) figure (c) montre la présence de proliférations tumorales au niveau de la sous muqueuse infiltrant et ulcérant la muqueuse en surface avec effacement des structures glandulaires



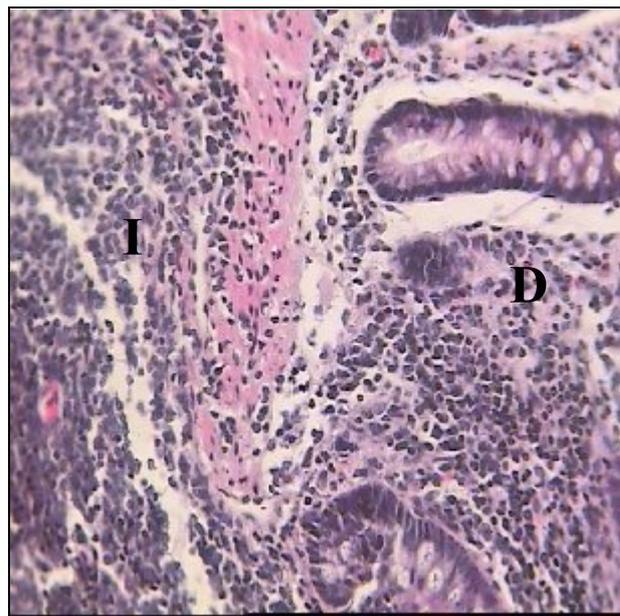
a- Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot P (Coloration HE GX20)



b- Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot P (Coloration HE Gx40)



c- Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot M (Coloration HE GX20)



d- Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot M (Coloration HE GX40)

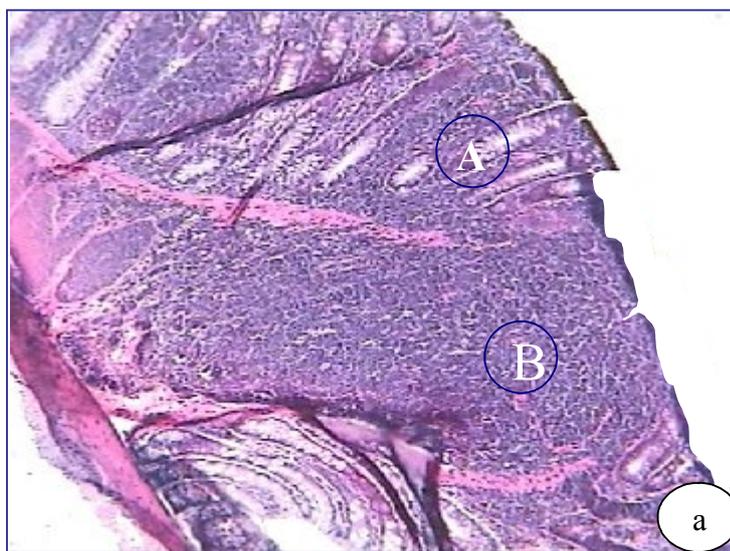
**M** : la muqueuse. **S-M** : sous-muqueuse. **Mus** : musculature. **C** : le chorion (la lamina propriae). **I** : infiltrat cellulaire. **1** : agrégat lymphoïde, **2** : plaque de PEYER hyperplasique, **D** : dégénérescence

**Planche III** : Observation histologique de la paroi colique des rats traités par le Proclaim® à concentration moyenne (81,25 mg/ kg ) et faible (40,62 mg/kg)

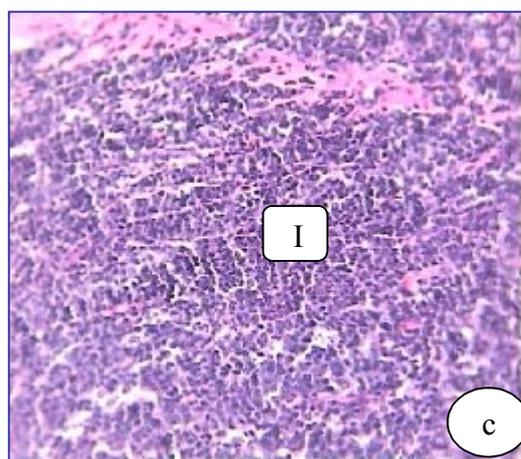
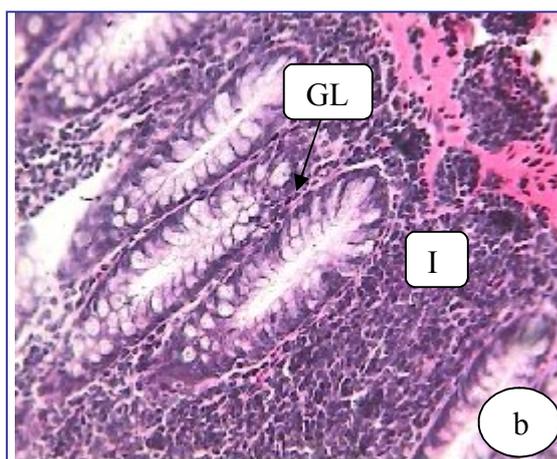
---

➤ **Observation histologique de la paroi colique des rats traités à forte concentration :**

La planche (IV) figure (a), met en évidence les observations histologiques au niveau du colon chez le rat traité à forte concentration de Proclaim<sup>®</sup> (162,5 mg/kg). Les figures (b) et (c) montrent une infiltration plus importante avec un envahissement lymphocytaire de l'épithélium qui a conduit à l'effacement des structures glandulaires, une forte infiltration lymphocytaire et plasmocytaire reflète le début d'une inflammation chronique.



**Figure a** Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot F (Coloration HE GX20).



**Figure b** Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot F (Partie A)  
Coloration (HE GX40)

**Figure c** Coupe histologique d'une paroi colique d'un rat du lot F (Partie B)  
Coloration (HE GX40)

**I** : infiltrat cellulaire. **GL** : glande

**Planche IV : Observation histologique de la paroi colique des rats traités par la forte concentration de Proclaim® (162,5 mg/kg).**

---

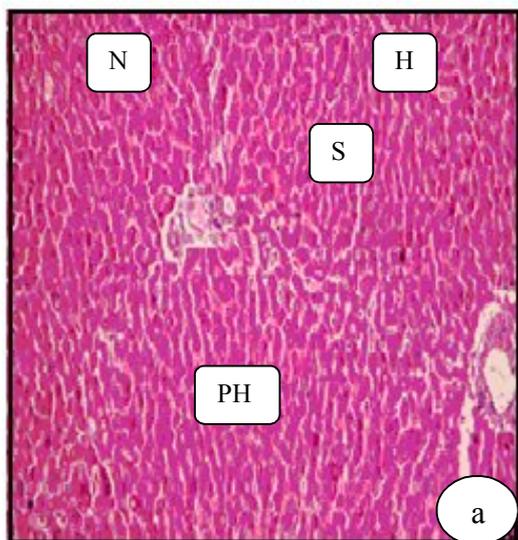
➤ **Observation histologique du parenchyme hépatique des rats témoins et traités**

L'observation microscopique du foie des rats témoins montre un parenchyme hépatique sain, une architecture lobulaire de base et des espaces portes normaux. Les espaces portes (EP) sont normaux et ne présente pas d'infiltrations inflammatoires.

La planche (V), figure (a), montre des hépatocytes (H) organisés en travées radiaires autour de la veine centrolobulaire. Ces travées sont séparées par des sinusoides (S).

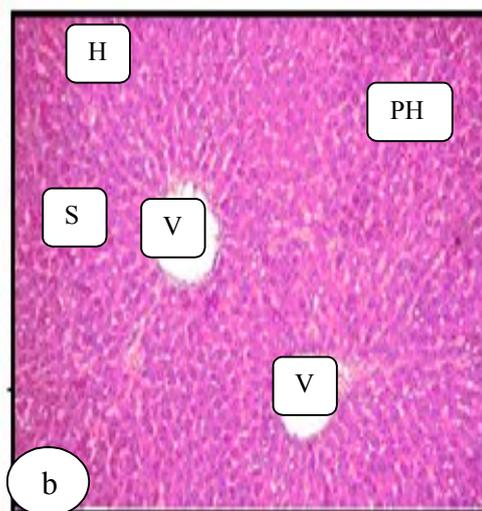
La planche (V), figure (b), présentent un parenchyme hépatique sain, une architecture lobulaire de base et des espaces portes normaux chez les animaux traités à faible concentration (40,62 mg/kg). Aucun signe d'infiltration ou d'inflammation ne sont apparents. Cependant, on note la présence de quelques vacuoles (V) dans les espaces centrolobulaires .

La Planche V, figure (c) et(d), montrent quelques modifications structurales, chez les animaux traités à moyenne concentration (lot M : 81,25 mg/kg) et à forte concentration (lot F : 162,5 mg/kg) par rapport au témoin après 28 jours d'administration quotidienne de Proclaim<sup>®</sup>. En effet, les espaces centrolobulaires présentent des vacuoles de différentes tailles ainsi qu'une désorganisation du parenchyme hépatique.

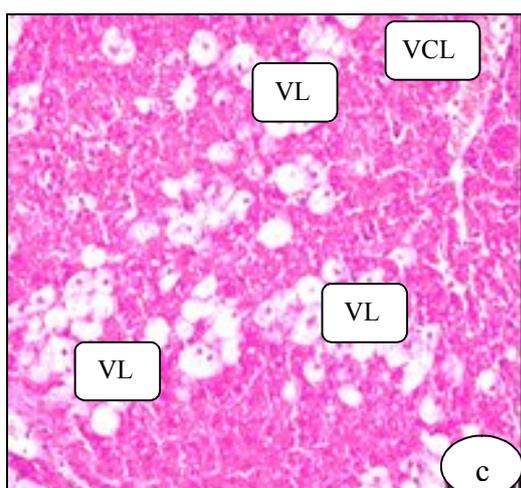


**a-** morphologie du foie des rats témoins montrant un parenchyme hépatique normal

Coloration: H-E, G X 200

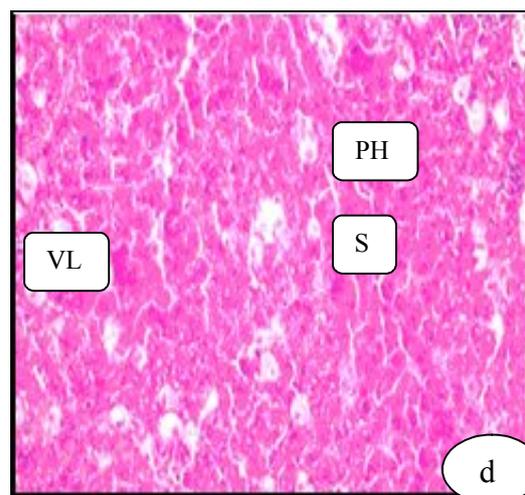


**b-** morphologie des rats du lot P montrant un parenchyme hépatique normal



**c-** morphologie du foie des rats lots M, montrant une désorganisation du parenchyme

Coloration: H-E, G X 200



**d-** morphologie des rats du lot F montrant une altération des cellules hépatiques

S : sinusoides.. H: hépatocyte. NB : noyaux binuclées. N : noyau. PH : parenchyme hépatique.  
VCL : veine centrolobulaire ; VL: veine centrolobulaire ; V : vacuoles

**Planche V : Coupes histologique de parenchyme hépatique des rats des lots témoins et traités au Proclaim® (Grossissement x 200)**

---

### ➤ **Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats témoins**

La planche VI présente l'aspect histologique du rein de rat du lot témoin

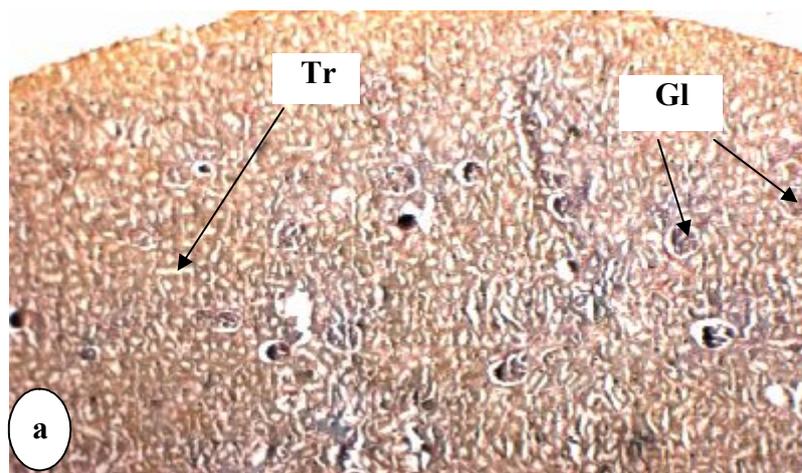
Le parenchyme rénal représente le résultat d'une association d'unité morphologique, les néphrons avec des vaisseaux sanguins.

Au grossissement (G X 10), l'architecture du rein est bien visible, on distingue deux parties : la partie cortical et la partie médullaire.

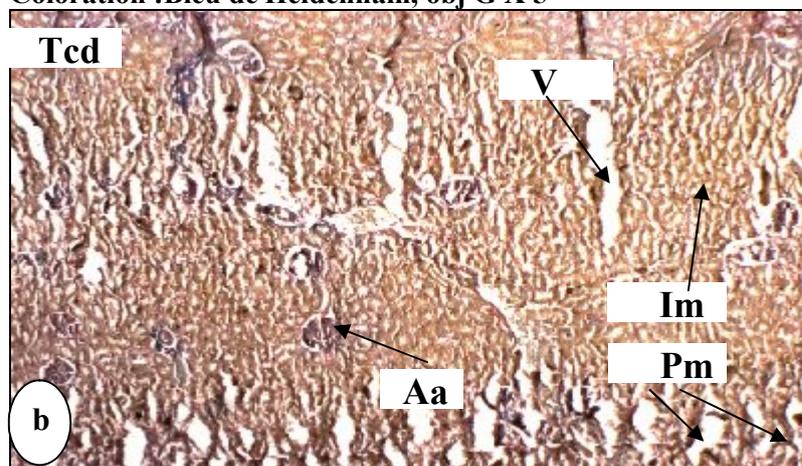
Au niveau de cortex (a), de nombreux glomérules (GI) ou corpuscules rénaux disposées en rangées parallèle et des tubules rénaux (Tr) sont visibles.

Dans la partie médullaire (b), les éléments veineux apparaissent comme des vaisseaux à paroi mince (V), plusieurs irradiations médullaires (Im) pénètrent dans une pyramide médullaire, c'est la pyramide de Malpighi (Pm) et on observe aussi la présence d'artère arciformes (Aa)

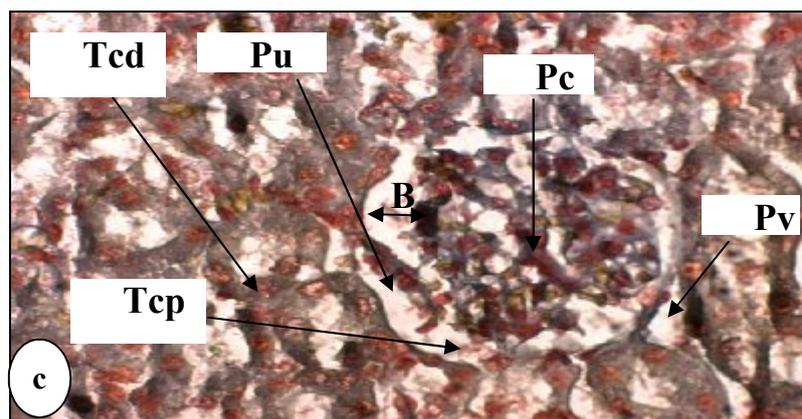
Au grossissement (G X 40), On observe plusieurs sections de tubes contourné à différent diamètres, intensité de couleur et de formes, les tubes contournés proximaux (Tcp) et distaux (Tcd). Les corpuscules rénaux appariassent comme des structures denses arrondies ( C ), les peletons capillaires (Pc) sont entouré par un espace étroit c'est la chambre glomérulaire ( B ) ( espace de bowman et on observe aussi deux pôles, un pole vasculaire (Pv) et un pole urinaire (Pu ).



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 5



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 10



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 40

**G1** : glomérules, **Tr** : Tubules rénaux, **V** : vaisseau à paroi mince, **Im** : irradiation médullaire, **Aa** : artère arciforme, **Tcp** : tube contourné proximal, **Tcd** : tube contourné distal, **Pc** : peloton capillaire, **B** : chambre glomérulaire (espace de Bowman), **Pv** : pole vasculaire, **Pu** : pole urinaire, **Pc** : peloton capillaire.

**Planche VI** : Aspect histologique du rein du lot témoin

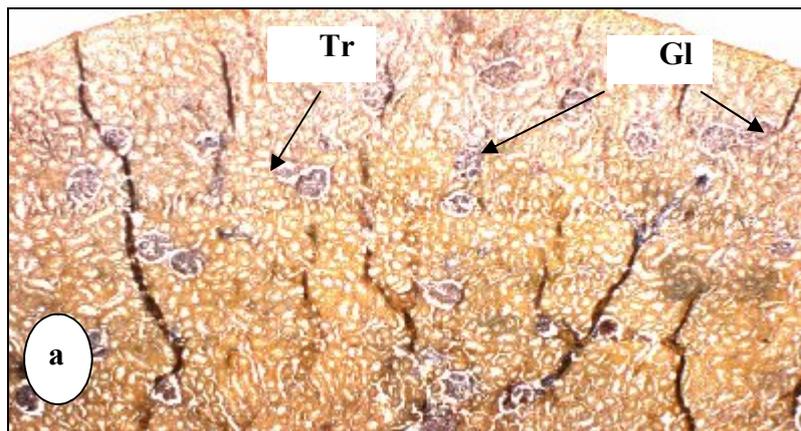
---

➤ **Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats traités à faible concentration**

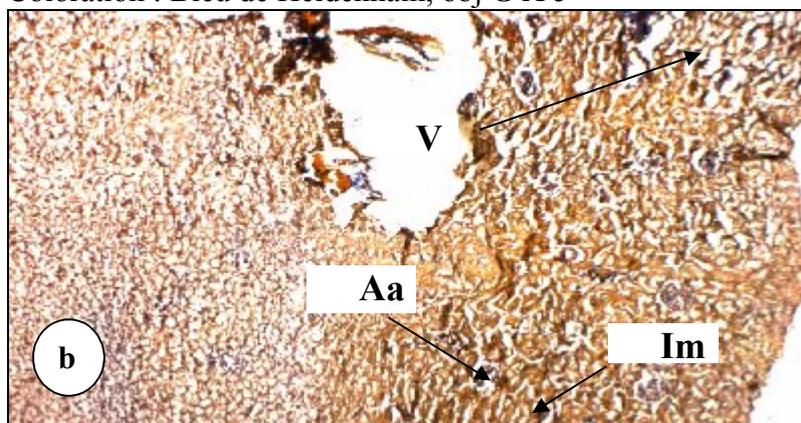
Les résultats obtenus pour les animaux traités à faible concentration (lot P 40,62 mg/kg) présentent le même aspect que celui des rats témoins. De nombreux glomérules (G1) ou corpuscules rénaux sont disposés en rangés parallèles et les tubules rénaux (Tr) sont visibles. Dans la partie médullaire(b) des vaisseaux à paroi mince (V) des irradiations médullaires (Im) et les artères arciformes (Aa) sont apparentes (Planche VII, figure a et b).

Au grossissement x 40, on remarque plusieurs sections de tubes contourné à différent diamètres, les tubes contournés proximaux (Tcp) et distaux (Tcd) sont moins condensé que ceux du lot témoin.

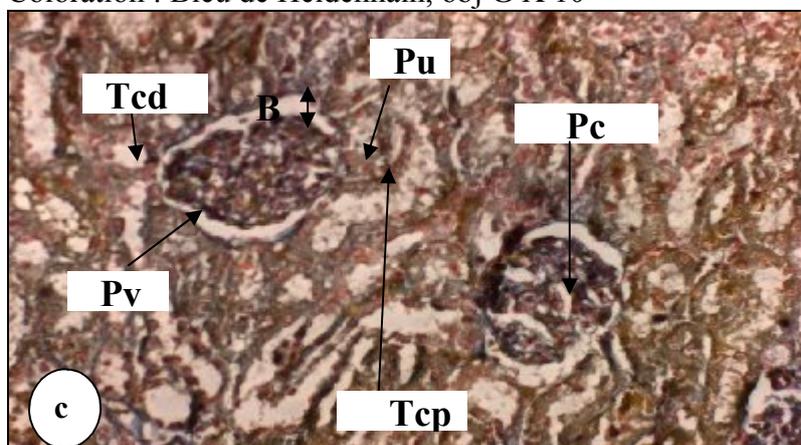
Les corpuscules rénaux apparaissent comme des structures denses arrondies © le peloton capillaire (Pc) est rétracté entouré par un espace plus important que chez le lot témoin (Planche VII, figure c) .



Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 5



Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 10



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 40

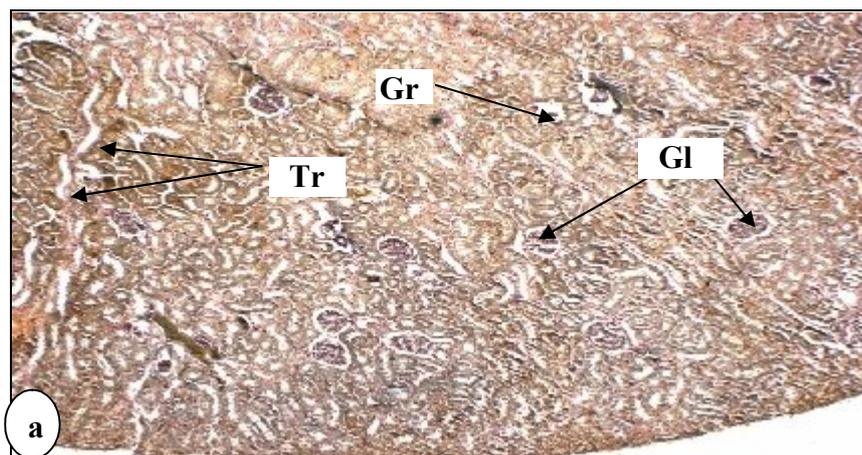
**G1** : glomérules, **Tr** : Tubules rénaux, **V** : vaisseau à paroi mince, **Im** : irradiation médullaire, **Aa** : artère arciforme, **Tcp** : tube contourné proximal, **Tcd** : tube contourné distal, **Pc** : peloton capillaire, **B** : chambre glomérulaire (espace de Bowman), **Pv** : pole vasculaire, **Pu** : pole urinaire, **Pc** : peloton capillaire.

**Planche VII :** Aspect histologique du rein chez le rat traité par la faible concentration(Lot P 40,62 mg/kg).

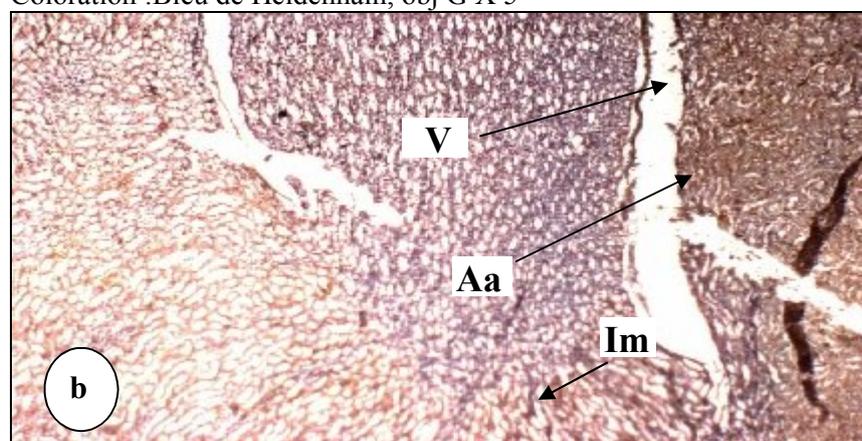
**➤ Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats traités à moyenne concentration**

Les résultats obtenus pour les animaux traités à moyenne concentration (lot M : 81,25 mg/kg) après 28 jours d'administration quotidienne de Proclaim® montrent un parenchyme rénal présentant des glomérules avec un peloton capillaire (Pc) en cours de résorption (Glr) et des tubules rénaux (Tcp et Tcd) avec un diamètre plus important (Planche VIII, figures a et b).

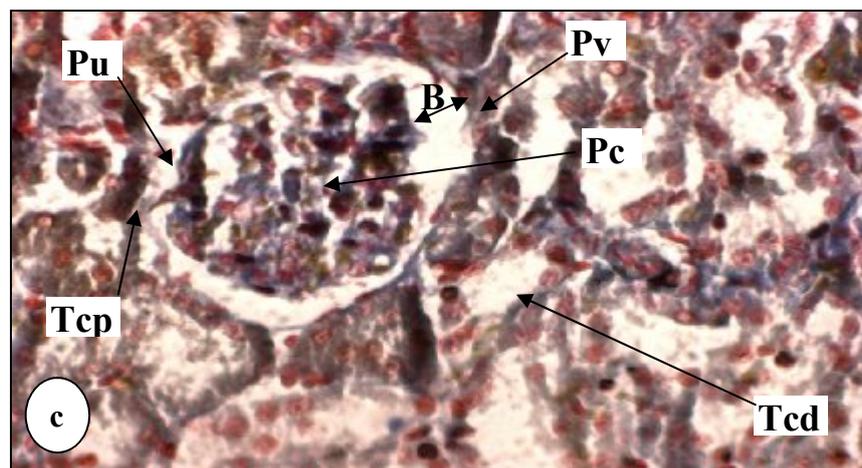
Au grossissement x 40, On observe une modification de la structure du glomérule rénale, en effet l'espace entre la capsule et le peloton capillaire est plus important (espace de Bowman) (Planche VIII, figure c).



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 5



Coloration : Bleu de Heidenhain, obj G X 10



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 40

**G1** : glomérules, **Tr** : Tubules rénaux, **V** : vaisseau à paroi mince, **Im** : irradiation médullaire, **Aa** : artère arciforme, **Tcp** : tube contourné proximal, **Tcd** : tube contourné distal, **Pc** : peloton capillaire, **B** : chambre glomérulaire (espace de Bowman), **Pv** : pole vasculaire, **Pu** : pole urinaire, **Pc** : peloton capillaire.

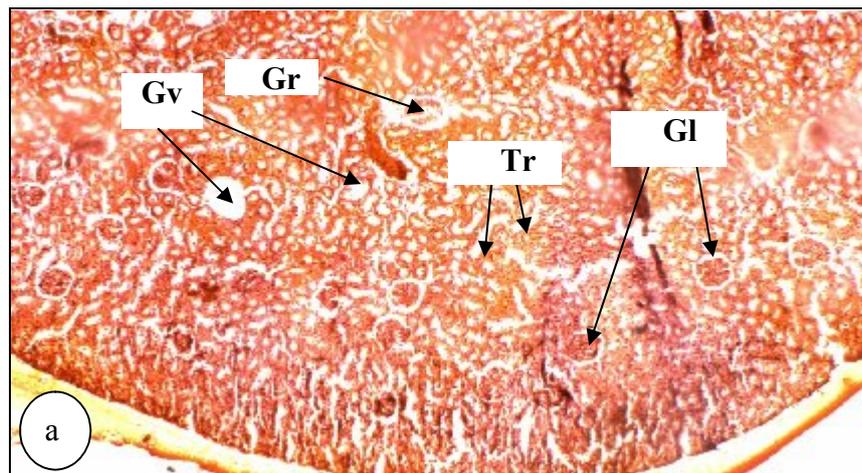
**Planche VIII** : Aspect histologique du rein chez le rat traité par la moyenne concentration (Lot M : 81,25 mg/kg).

---

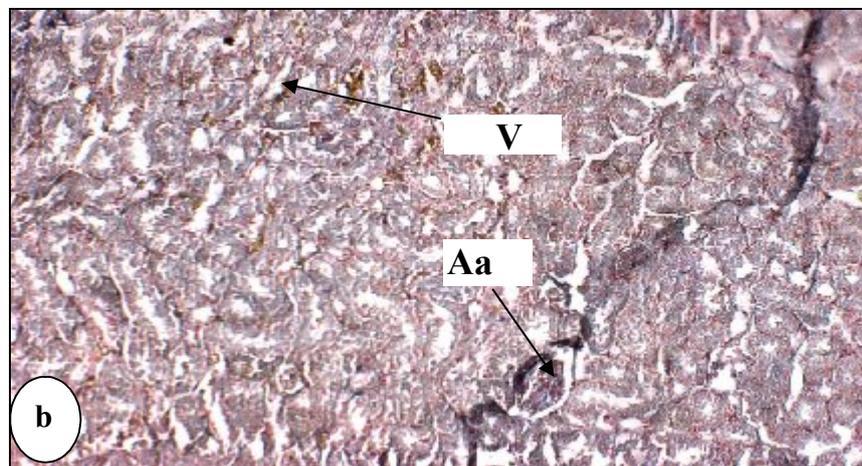
### ➤ **Observation histologique du parenchyme néphrotique des rats traités à forte concentration**

Les résultats obtenus chez les animaux traités à forte concentration (lot F : 162,5 mg/kg) après 28 jours d'administration quotidienne de Proclaim®, montrent des modifications plus importantes du parenchyme rénal.

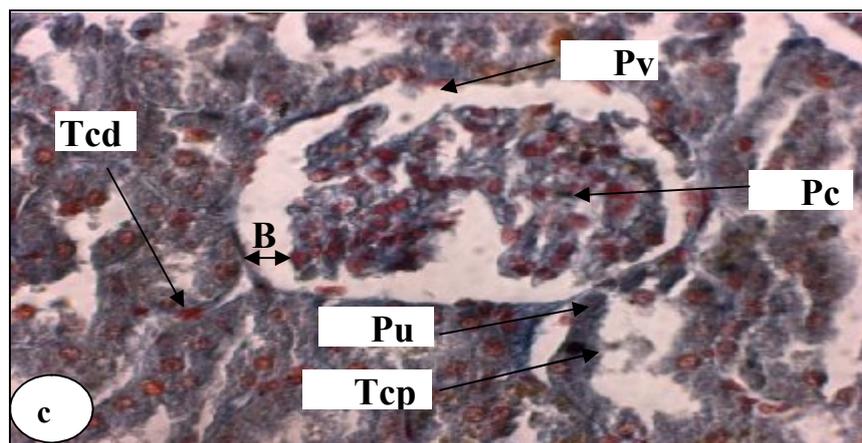
On note la présence des glomérules normaux, des glomérules en cours de résorption (Glr) et d'espace vide occupé par des glomérules dégénérés (Glv) (Planche IX, figure a). De plus l'espace de bowman est plus dilaté et ses parois sont endommagés (Planche IX, figures b et c).



Coloration :Trichrome de Masson, obj G X 5



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 10



Coloration :Bleu de Heidenhain, obj G X 40

**G1** : glomérules, **Tr** : Tubules rénaux, **V** : vaisseau à paroi mince, **Im** : irradiation médullaire, **Aa** : artère arciforme, **Tcp** : tube contourné proximal, **Tcd** : tube contourné distal, **Pc** : peloton capillaire, **B** : chambre glomérulaire (espace de Bowman), **Pv** : pole vasculaire, **Pu** : pole urinaire, **Pc** : peloton capillaire.

**Planche IX** : Aspect histologique du rein chez le rat traité par la forte concentration (Lot F : 162,5 mg/kg)

## 7. Etude de la persistance ou de la réversibilité des effets toxiques observés

L'exposition des rats au Proclaim® pendant 28 jours à des concentrations de (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg), s'est traduit par des altérations de certains paramètres biochimiques (la glycémie, l'urée et la créatinine) et par des lésions de certains organes (le foie, rein et colon).

Des rats d'un groupe satellite, destinés à des observations ultérieures en vue de détecter d'éventuels effets toxiques différés ou persistants, ou de mettre en évidence le rétablissement des animaux traités ont été introduit dans l'étude. ce groupe de rat a reçu la même concentration administrée au animaux du lot F (162,5 mg/kg) pendant 28 jours, conjointement à un lot satellite témoin a reçu de l'eau.

Deux mois après interruption de traitement.

Le groupe satellite est suivi sur les paramètres précédemment altérés :

- Variations des Paramètres biochimiques (Dosage de la glycémie, Dosage de l'urémie, Dosage de la créatinémie,
- Histologie du colon, du parenchyme hépatique et du rein.

### 7.1 Variations des paramètres biochimiques

Les valeurs moyennes de la glycémie de l'urémie et de la créatinémie des rats de lot satellite témoin (lots st) et lot satellite traité (lot s) sont rapportées dans le tableau (18)

L'administration de Proclaim® pendant 28 jours a induit une hyperglycémie chez l'ensemble des lots traités à différentes concentrations (lot T =  $0,82 \pm 0,07$  g/l : lot F : 162,5 mg/kg =  $1,08 \pm 0,03$  g/l; lot M : 81,25 mg/kg =  $1,06 \pm 0,12$  g/l et lot P : 40,62 mg/kg =  $1,04 \pm 0,06$  g/l), une élévation de la créatinémie chez l'ensemble des lots traités à différentes concentrations (lot T =  $7 \pm 0,75$  g/l : lot F : 162,5 mg/kg =  $8,15 \pm 0,63$  g/l; lot M : 81,25 mg/kg =  $8,71 \pm 0,69$  g/l et lot P : 40,62 mg/kg =  $9,85 \pm 1,45$ g/l) et une augmentation de l'urémie chez les rats traités à différentes concentration de Proclaim® (lot T =  $0,28 \pm 0,05$  g/l : lot F : 162,5 mg/kg =  $0,37 \pm 0,04$  g/l; lot M : 81,25 mg/kg =  $0,37 \pm 0,02$  g/l et lot P : 40,62 mg/kg =  $0,52 \pm 0,05$  g/l).

Après 2 mois d'interruption de traitement, la glycémie et la créatinémie retrouvent ces valeurs normales chez le lot satellite (lot S : 162,5 mg/kg). Le test de Student ne montre aucune différence significative entre la glycémie et la créatinémie du lot satellite témoin et celle du lot satellite traité à forte concentration, cependant la valeur moyenne de l'urémie du lot satellite (lot S : 162,5 mg/kg) demeure quand à elle supérieure à celle du lot témoin après 2 mois d'interruption de traitement.

La comparaison des moyennes des lots satellite de l'urémie par le test de Student montre une différence significative entre le lot satellite témoin et lot satellite à forte concentration.

**Tableau 18 :** Valeurs moyennes de la glycémie, de la créatinémie et de l'urémie en g/l chez le lot satellite témoin (st) et traité (s)

Paramètres	Lots					
	Lot St			lot S		
	<i>n</i>	$\bar{x}$	$\sigma$	<i>n</i>	$\bar{x}$	$\sigma$
Glycémie (g/l)	7	0,76	0,07	7	0,81	0,08
Créatinémie (g/l)	7	6,75	1,45	7	7,57	1,63
Urémie (g/l)	7	0,35	0,04	†7	0,45	0,07

---

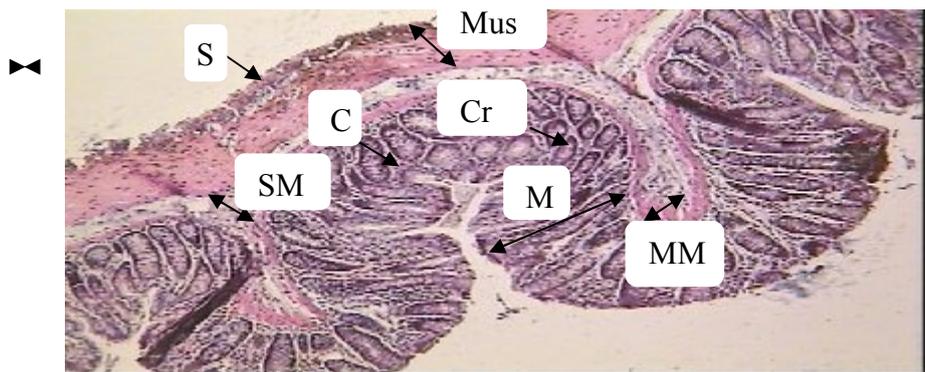
## 7.2 Résultats histologiques

Après l'examen des paramètres biochimiques nous avons procédé à des examens histologiques des tissus précédemment altérés à savoir au niveau du colon, du parenchyme hépatique et du parenchyme rénale.

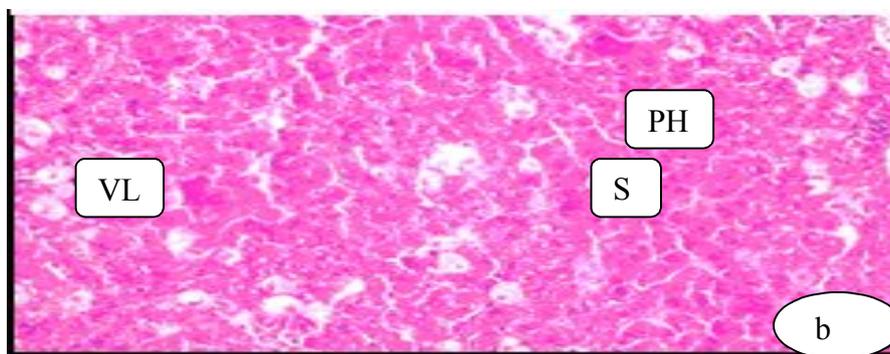
La planche X, figure (a) présente une coupe histologique d'un échantillon d'un colon d'un rat satellite traité à forte concentration (lot S : 162,5 mg/kg). On ne dénote aucune altération tissulaire, la structure du colon est intacte et présente cinq couches, qui sont de la lumière vers l'extérieur : la muqueuse, la musculaire muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse et la séreuse.

La planche (X), figure (b) montre une coupe histologique d'un échantillon du foie d'un rats satellites traité celui-ci présente un parenchyme hépatique sain, une architecture lobulaire de base et des espaces portes normaux.

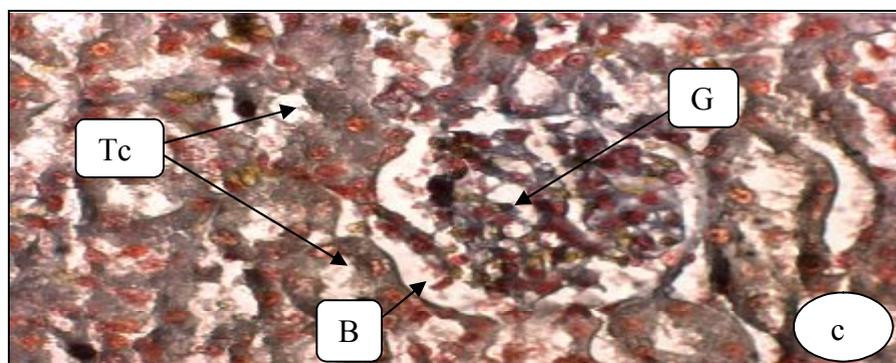
La planche (X), figure (c) représente une coupe histologique d'un échantillon du parenchyme rénale d'un rats du lot satellite traités à forte concentration (lot S : 162,5 mg/kg), ainsi nous n'avons observé aucune altération tissulaire.



**Figure a :** Aspect histologique d'un tissu du colon chez un rat du lot satellite traité (Coloration : H-E,G X 200)



**Figure b :** Aspect histologique d'un tissu hépatique chez un rat du lot satellite traité (Coloration: HE, G X 40 )



**Figure c :** Aspect histologique d'un tissu nephrotique chez un rat du lot satellite traité (Coloration: HE, obj G X 40 )

Abréviation:

M: la muqueuse, MM: musculaire muqueuse, SM: sous muqueuse, Mus: musculature, S: la séreuse, Lum: lumière intestinale, C: le chorion (la lamia propriae), Cr: crypte de Liberkuhun. VL: veine centrolobulaire ; , PH: parenchyme hépatique, S: sinusoid. Tc: tube contourné, B: espace de Bowman, G: glomérules.

**Planche X :** Aspect histologique des échantillons d'un tissu (colique, hépatique et nephrotique) chez un rat satellite traité par la forte concentration



# *Discussion*

---

## CHAPITRE III – DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous allons discuter les résultats obtenus et les comparer à ceux rapportés dans la bibliographie.

Proclaim® est un insecticide dont la matière active est à base d'Emamectine benzoate. Il est obtenu par synthèse chimique à partir de l'abamectine et il présente une forte activité contre un large éventail de lépidoptères. En effet il entraîne la paralysie de l'insecte en se fixant de manière irréversible au récepteurs GABA (acide gamma aminobutyrique) et glutamate H des cellules nerveuses (*Syngenta, 2005*).

Les résultats de l'étude de la toxicité aiguë ont permis d'estimer la DL50 du Proclaim® à une concentration de 1300 mg /kg *per os*. Cette valeur le place dans la catégorie III selon la classification de la toxicité aiguë de l'OMS, qui comporte quatre catégories (allant de hautement toxique : catégorie I, à non toxique : catégorie IV) et permet par conséquent de le qualifier de produit non dangereux.

Les principales manifestations de toxicité aiguë observées, apparaissent dans les 48 heures qui suivent l'administration, à travers des troubles du système nerveux central. (Ataxie, parésie, prostration, tremblements et amaurose). Ces troubles sont très certainement le produit de la stimulation par le neuromédiateur GABA (*Tzung-Hai, 2004*). Ces résultats sont également en accord avec ceux de *Chapman (2001) et Muhammed (2004)*.

Les manifestations de la toxicité subchronique observées durant notre expérimentation, ont porté essentiellement sur la survenue des tremblements chez les rats traités à forte concentration (162,5 mg/kg) et à moyenne concentration (81,25 mg/kg). Ces mêmes observations ont été décrites par différentes études suite à l'administration répétée de l'Emamectine benzoate par voie orale chez des rats (*Wise, 1997 ; Tzung-Hai, 2004*).

Par ailleurs, les résultats relatifs à l'évolution pondérale suite au traitement des rats par le xénobiotique, ont fait ressortir à première vue, un retard de la croissance notable entre les différents lots traités par rapport au lot témoin. Néanmoins ; l'analyse de la variance n'a révélé aucune différence significative.

---

Le Proclaim® n'exerce par conséquent aucun effet négatif sur la croissance des sujets testés. Or la diminution du poids corporel est l'une des constatations les plus fréquemment observées lors d'une exposition subchronique aux avermectines chez le rat par voie orale (*Campbell, 1989 ; OMS 1999 ; Environmental Protection Agency EPA, 2006*)

L'analyse des différents paramètres biochimiques (Glycémie, cholestérol, LDL, HDL, triglycéride, urée, créatinine, GOT, GPT) et hématologiques (globules blanc, globules rouge, hématocrite, hémoglobine) étudiés a permis de constater que le traitement quotidien au Proclaim® par voie orale aux différentes concentrations étudiées (162,5 mg/kg ; 81,25 mg/kg et 40,62 mg/kg) provoque une perturbation de la concentration sanguine en glucose, reflétée par une hyperglycémie. Des résultats similaires sont obtenus par *Arise (2009)* suite à l'exposition des rats à un produit appartenant à la famille des avermectines à une concentration de 0,4 mg/kg pendant 15 jours. Cette augmentation du taux sérique en glucose est probablement due à des troubles de la glycorégulation (*Rezg, 2007*).

Plusieurs études récentes ont ainsi fortement suggéré une association entre exposition aux pesticides et trouble de la glycémie, dont *Codru (2007)* qui a rapporté une association entre exposition aux agents organochlorés et troubles de la glycorégulation. Une étude conduite sur plus de 30 000 applicateurs professionnels de pesticides, a montré que sur les 50 pesticides étudiés, 7 produits phytosanitaires (aldrine, chlordane, heptachlor, dichlorvos, trichlorfon, alachlore et cynazine) ont augmenté le risque de développer un diabète chez les participants à l'étude. Par ailleurs, nous avons observé une normalisation des valeurs de la glycémie chez le lot satellites traité dans les 2 mois suivant l'interruption du traitement. *Apurva-Kumar, (2008)*, a décrit une réversibilité identique de l'hyperglycémie chez des rats exposés à l'acéphate, un insecticide organophosphoré.

Les résultats de l'étude du métabolisme lipidique, a montré que le Proclaim® n'a pas entraîné, des perturbations chez les rats. Les valeurs moyennes de Cholestérolémie, LDH, LDL et de Triglycéridémie des rats traités et des rats témoins ne présentent aucune différence significative, ceci est en accord avec les résultats obtenus par *Lankas (1983)*

---

L'exposition de rats à l'émamectine benzoate par l'alimentation à des concentrations de (0, 25 ; 1 ; 2,5 et 5 mg / kg / jour) n'entraîne pas de perturbations lipidiques sériques pour les rats mâles. Par ailleurs, d'autres études dont celle de *Saleh (1998)* ont affirmé que le traitement des rats avec un insecticide de la famille des pyréthrinoides, le cyperméthrine, a causé une diminution significative du cholestérol.

L'étude de l'évolution de certains marqueurs comme l'urémie et la créatinémie a permis d'étudier l'effet du Proclaim<sup>®</sup> sur la fonction rénale et le métabolisme azoté. Les résultats obtenus ont montré que l'intoxication par le Proclaim<sup>®</sup> des différents lots de rats traités entraîne une augmentation significative du taux de créatinémie, et de l'urémie, ce qui est en faveur du début d'une insuffisance rénale.

De même *El Feki (1981)*, *Stengel (1996)*, *Smaoui (2000)* et *Zuhair (2006)*, ont observé que les pesticides induisaient un dysfonctionnement tubulaire ou une néphropathie tubulo-interstitielle évoluant vers une insuffisance rénale. En effet, le rein est un organe particulièrement sensible à l'action des toxiques, en raison de son intense activité métabolique et de ses multiples fonctions, notamment celles d'excrétion et de concentration des xénobiotiques. Des augmentations comparables de l'urémie et de la créatinémie ont été observées par *Arise (2009)* lors d'une étude de toxicité subaiguë de l'ivermectine à la concentration de 0,4 mg/kg chez le rats par voie orale.

La probable survenue d'un dysfonctionnement rénal, évoqué par l'augmentation de ces paramètres biologiques est confirmée par l'examen histologique des reins, qui montre une altération structurale de la zone corticale, des capsules de Bowman adhérent aux glomérules, et ceci aux dépens des espaces des chambres glomérulaires qui diminuent beaucoup au niveau du tube proximal. Une vacuolisation et une hypertrophie des cellules épithéliales sont également notées, et ceci au dépend de l'interstitium rénal et des vaisseaux, qui se trouvent comprimés, entravant ainsi fonctions rénales de filtration et de sécrétion tubulaire. Des résultats similaires ont été obtenus par *Zuhair (2006)* chez des rats traités par insecticide organophosphoré, le Sumithion, pendant 12 jours avec une concentration de 60 mg/kg.

Enfin, pour le lot de rats satellites la concentration en urée sérique reste élevée par rapport au lot témoin avec une différence significative. Néanmoins nous avons constaté une amélioration notable de l'urémie après interruption du traitement et un retour à la normale de la créatinémie. De nombreux auteurs sont en accord avec l'effet réversible sur les fonctions

---

rénales de certains produits phytosanitaires suite à une intoxication aigüe ou chronique (*Russell, 1989 ; Vaziri, 1997 et Bloch-Shilderman, 2007*).

Les transaminases sont considérées comme un bon indicateur de la cytolyse hépatique. Ainsi, des taux élevés des enzymes du foie, notamment la GOT et La GPT, sont fréquemment attribués aux effets métaboliques et/ou toxiques de différents agents polluants (*Michailova, 1998*), l'étude de l'évolution des paramètres sériques des marqueurs hépatiques n'a permis de révéler que de légères variations des transaminases et de la phosphatase alcaline. De plus ces variations transitoires sont revenues à la normale au 28<sup>e</sup> jour du traitement. Ce qui nous a permis de conclure à l'absence de modification particulière de ces paramètres

En effet, la majorité des études dénoncent des effets délétères sur la fonction hépatiques des produits phytosanitaire avec élévation de GOT et GPT à la suite d'une exposition subchronique chez des rats : *Kalender (2005) pour Diazinon ; Dragica (2008) pour Carbofuran*.

Sur le plan hématologique, les numérations-Formules (hémoglobine, globules blancs, globules rouges, et hémocrite) n'ont pas révélé de modifications significatives entre le groupe témoin et les différents groupes traités. Ces résultats sont accord avec les observations de *Gordan (1987)* qui n'a pas mis en évidence de perturbation des paramètres hématologiques lors de l'étude de cancérogénèse chez des rats intoxiqué par une alimentation contenant un insecticide de la famille des avermectines.

Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence une association positive entre l'utilisation des pesticides et l'apparition des cancers, hématopoïétiques (*Lemoal, 2008 et Carozza 2008*).

La mesure de différents biomarqueurs hépatiques du stress oxydant a permis de montrer que l'activité de la catalase après traitement au Proclaim<sup>®</sup> a été très fortement réduite pour le lot faible concentration comparée au témoin, cette baisse tend à diminuer en fonction de la concentration administrée, Les travaux menés par *Banerjee (1999) et Olga Lopez (2007)* ont clairement démontrés que les pesticides avaient une influence sur les enzymes antioxydants, de même le traitement des rats avec du chlorpyrifos (insecticide, OP) conduit à une diminution des activité des enzymes du type catalase dans le foie, le rein et le cerveau.

---

Concernant l'activité des TBARS, on a enregistré une très forte augmentation révélant un contexte oxydant. Proclaim<sup>®</sup> semble aussi induire un stress oxydant dont l'effet délétère serait partiellement contrebalancé par l'induction d'enzymes antioxydants. Il a été montré que le carbofuran entraîne une augmentation des TBARS (Burgeot, 2003)

Cependant, Les taux de protéines carbonylées obtenus montrent clairement qu'il existe une augmentation des concentrations des protéines carbonylées pour le lot à faible concentration (75,65%) et le lot moyenne concentration (253,09%) en comparaison avec le témoin. Pour le lot forte concentration la production est moindre par rapport à celle du témoin (15,27 %). Cette augmentation des protéines carbonylées serait due non seulement à une accumulation d'agressions radicalaires, mais également à une diminution d'activité du protéasome, système permettant la dégradation des protéines modifiées, en particulier oxydées (Petropoulos, 2000), et donc l'élimination de molécules dégradées potentiellement impliquées dans le développement de processus cancérogènes. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Possamai (2006) qui a montré une augmentation des taux de protéines carbonylées hépatiques après une toxicité sub chronique à un insecticide le malathion.

Concernant les résultats de l'étude d'un marqueur cellulaire majeur de l'oxydation : le GSH, on enregistre une diminution significative de la GSH dans le foie en raison de son interaction dans le processus de détoxification des métabolites actifs résultants de l'exposition au Proclaim<sup>®</sup>. Le glutathion réduit (GSH) est alors transformé en sa forme oxydée, ceci entraîne la consommation du GSH et la diminution significative de son niveau hépatique. Les cellules hépatiques jouent un rôle important dans le métabolisme des pyréthroïdes à travers de nombreuses réactions, produisant des métabolites intermédiaires toxiques tels que les peroxydes.

Ces composés entrent dans les réactions d'oxydoréduction ou les réactions de conjugaison nécessitant du glutathion réduit, entraînant sa forte consommation, et donc sa diminution dans les cellules vivantes (Saka, 2002)

Par ailleurs le traitement des rats par les trois concentrations d'émamectine benzoate rapporte des valeurs d'activité enzymatique élevées par rapport aux rats témoins. Cela indique que notre produit administré déclenche le mécanisme de détoxification (Fitzpatrick ; 1993, 1995 et 1997) pour augmenter la défense cellulaire contre les radicaux libres nocifs pour l'organisme.

---

Cependant, les niveaux de saturation enzymatique diffèrent d'un groupe de rats à l'autre, nous avons constaté une saturation précoce du GST chez les rats traités par la concentration moyenne, ensuite les rats traités par la concentration forte, cependant on remarque que l'activité enzymatique est significativement très élevée chez les rats traités par la concentration faible.

Les résultats obtenus montrent clairement que l'exposition des rats au Proclaim<sup>®</sup> induit des changements significatifs des taux de glutathion hépatique, TBARS, catalase, protéines carbonylées chez l'ensemble des lots traités. Ce déséquilibre confronte l'organisme à une exposition intense aux espèces réactives de l'oxygène qui se manifeste toujours par la diminution des teneurs tissulaires en composés piègeurs de radicaux libres (tels que le glutathion), la perturbation de l'activité des enzymes antioxydantes (telles que la glutathion S-transférase) ou encore par les effets typiques de l'attaque radicalaire tels que la peroxydation des lipides et des protéines. Cependant de nombreuses études ont montré que les pesticides affectent différentes cibles qui contrôlent la croissance et la survie des cellules (*Paolicchi, 1977; Malik, 1982; Junqueira, 1986; Lechner, 1986; Chhabra, 1993; Martinez-Cayuela, 1995*).

Enfin, les résultats relatifs à l'étude histologique des reins obtenus suite au traitement des rats par le Proclaim<sup>®</sup> à différentes concentrations ont montré un effet dilatateur au niveau des tubules rénaux et une désorganisation des pelletons capillaires au niveau des glomérules, ce qui est en corrélation par rapport à l'augmentation des taux de l'urémie et de créatinémie. Des résultats similaires sont rapportés par *Zuhair (2006)* chez des rats traités par un insecticide de la famille des organophosphorés (Sumithion) pendant 12 jours avec une concentration de 60 mg/kg. Cet auteur a observé plusieurs altérations : tubules rénaux endommagés, capsule de Bowman érodés et quelques glomérules vides.

Sur le plan hépatique, les résultats obtenus après 28 jours de traitements à différentes concentrations de Proclaim<sup>®</sup> par voie orale, montrent quelques modifications structurales par rapport au témoin. Cependant, aucune altération n'a pu être constatée chez le groupe traité à faible concentration. Ce qui confirme l'hypothèse du stress oxydant. *Gamet-Payraastre, (2008)* indique que, le stress oxydatif joue un rôle physiopathologique important, car il conduit à la lyse hépatocytaire. *Kammemer, (2000)* a rapporté que l'intoxication par certains insecticides,

acaricides et herbicides peuvent être à l'origine d'hémorragies hépatiques, de congestion hépatique, de nécrose et de dégénérescence hépatique.

L'étude histologique au niveau du colon montre que le traitement par le Proclaim® a provoqué des lésions tissulaires, représentés par des infiltrations des lymphocytes au niveau des différentes couches de la paroi colique des rats traités. Les mêmes résultats sont rapportés par *Koner (1998) et Banerjee, (1997)*, ces auteurs signalent que les pesticides sont capables de moduler des réponses immunitaires en affectant les lymphocytes chez des animaux de laboratoire et l'homme après intoxication.

# *Conclusion*

## CONCLUSION

Ce travail a pour objectif principal l'évaluation de la toxicité aiguë et de la toxicité subchronique, chez le rat wistar mâle, d'un produit phytosanitaire : le Proclaim<sup>®</sup>.

Dans un premier temps, cette étude a permis de calculer la DL 50 du Proclaim<sup>®</sup>.

Cette dernière est estimée à 1300 mg/kg. Par ailleurs, l'intoxication aiguë s'est traduite principalement par des effets neurotoxiques (tremblements, convulsions, hyper salivation, prostration).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la toxicité subchronique par le Proclaim<sup>®</sup>, nous avons noté une perturbation de la concentration sérique en glucose reflétée par une hyperglycémie significative chez l'ensemble des lots traités et une augmentation significative de l'urée et de la créatinine sérique témoignant un dysfonctionnement et une atteinte des fonctions rénales.

Les marqueurs du stress oxydatifs ont été étudiés. Ces derniers ont mis en évidence une diminution importante de l'activité de la catalase et de la GSH hépatique, et une augmentation significative des TBARS, des protéines carbonylées, témoignant la mise en place d'un stress oxydatif.

Sur le plan histologique, les altérations observées dans notre étude sont caractérisées par l'apparition des lésions tissulaires au niveau de la paroi colique représentée par des infiltrations lymphocytaires, quelques modifications structurales au niveau du parenchyme hépatique et une atteinte structurale au niveau néphrotique entravant ainsi les fonctions rénales.

Les effets toxiques observés et les altérations tissulaires provoquées par une intoxication subchronique par le Proclaim<sup>®</sup>, disparaissent à l'arrêt du traitement, indiquant ainsi le caractère réversible de ces effets.

Néanmoins, ce travail reste une étape préliminaire quant à l'étude de la toxicité du Proclaim<sup>®</sup>. Les résultats obtenus démontrent la présence d'un dysfonctionnement qui touche particulièrement certains paramètres biologiques et certains organes.

Il nous incite donc à approfondir notre recherche et nous orienté sur les perspectives suivantes :

- Tester notre produit avec des temps d'exposition plus longs, des concentrations administrées plus faibles avec un échantillon d'animaux plus important incluant des femelles.
- Travailler sur les effets endocriniens et neurologiques
- Etudier les interactions entre les différents contaminants
- Etudier la toxicocinétique pour compléter notre étude de toxicité
- Appliquer des tests statistiques approprié, notamment les corrélations, pour déterminer la relation effets/ doses.

# *Références Bibliographique*

---

## Références Bibliographiques

- **ACTA., (2005)** : « Index phytosanitaire ACTA ». 41ème édition. Paris 821 p.
- **Aebi H., (1984)**: «Catalase in vitro», Meth, Enzymol, 105, 121–126.
- **Air Breizh, (2003)** : « Mesure des pesticides dans l’air ambiant en milieu urbain ».
- **Alavanja M. C. and Bonner M. R., (2005)**: «Pesticides and human cancers». Cancer Invest, 23(8), 700-711.
- **Apurva -Kumar .J et Rajini P. S. (2008)** : « Hyperglycémie réversible chez le rat après exposition aigue à l’acéphate, un insecticide organophosphoré : rôle de la néoglucogenèse », Toxicology ISSN 0300-483X CODEN TXICDD.
- **Arise R.O. and Malomo S. O., (2009)** : «Effects of ivermectin and albendazole on some liver and kidney function indices in rats», African Journal of Biochemistry Research ,Vol.3 (5), pp. 190-197, : <http://www.academicjournals.org/AJBR> ISSN 1996-0778 © 2007 Academic Journals
- **Baldi I. and Lebailly P., (2007)**: «Cancers and pesticides». Rev Prat, 57(11 Suppl), 40-44.
- **Baldi I.; Cantagrel. and Lebailly A., (2003)**: «Association between Parkinson’s disease and exposure to pesticides in south western France». Neuroepidemiology, 22: 305-10.
- **Banerjee B.D.; Seth V.; Bhattacharya A.; Pasha S.T. and Chakraborty A.K. (1999)**: «Biochemical effects of some pesticides on lipid-peroxidation and free-radical scavengers».Toxicol.Lett.107, 33–47
- **Banerjee B.D.; Koner B.C. and Ray A., (1997)**: «Influence of stress on DOT-induced humoral Immune responsiveness in mice». Environ Res;74:43-7.
- **Bassil K L.; Vakil C. and Sanborn, (2007)**: «Cancer health effects of pesticides» : systematic review, Can Fam Physician, 53(10); 1704- 1711.
- **Bernard S., (1989)**: « Biochimie clinique. Instrument et techniques. Diagnostics médico- chirurgicaux », Edition moloine (2ème édition).
- **Bergmeyer H., (1978)** : « Biochimie clinique ».

- **Beugnet F. ; Gevrey J. et Kerboeuf D., (1997):** « Les endectocides: mode d'action et d'utilisation », Point.vet.28, p.1915-1919.
- **Bidleman T. ; Walla M. D.; Roura R.; Carr E. and Schmidt S., (1993):** «Organochlorines pesticides and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere of the Ocean Antarctica», Marine Pollution Bulletin, 26: 258-262.
- **Bliefert C. and Perraud R., (2001):** «Chimie de l'environnement : air, eau, sols, déchets» - Paris, De Boeck Université.
- **Bloch-Shilderman E. and Levy A., (2007):** «Transient and reversible nephrotoxicity of sarin in rats». Department of Pharmacology, Israel Institute for Biological Research, Ness Ziona P.O. Box 19, 74100, ISRAEL Journal of applied toxicology , vol. 27, no2, pp. 189-194 [6 page(s) (article)] (3/4 p).
- **Bloomquist J., (2003):** «Chloride channels as tools for developing selective insecticides ». Arch. Insect. Biochem, Physiol, 54 :145-156.
- **Boissay H ., (2007) :** « Les avermectines et leur utilisation chez les lagomorphes » : p 84.
- **Boussinesq M., (2005):** « IVERMECTINE, Médecine Tropicale », 65 : 69-79.
- **Bowers G.N. and Mc Comb R.B., (1966):** «A Continuous Spectrophotometric Method for Measuring The Activity of Serum Alkaline Phosphatase», Clin.Chem.,12:70.
- **Bouziani M., (2007):** «L'usage immodéré des pesticides : de graves conséquences sanitaires», Epidémiologie, faculté de médecine d'Oran, Point de vue.
- **Bradford M. M., (1976):** «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding», Anal Biochem 72 :248-254.
- **Brown T. P.; Rumsby P. C.; Capleton A. C.; Rushton L. and Levy L. S., (2006):** «Pesticides and Parkinson's disease--is there a link» Environ Health Perspect, Vol. 114, n°2, pp: 156-164.
- **Buege J A. and Aust S D., (1978):** «Microsomal lipid peroxidation», Methods Enzymol 52 : 302-310.
- **Burgeot T. ; G ret F. et M nard D., (2003):** « Ecophysiologie et bio-marqueurs de stress – Etude interdisciplinaire "in situ" DYNAMOR », S minaire MOREST La Rochelle 26-28.

- **Calvet R E. ; Barriuso C. ; Bedos P. ; Benoit M P. et Charnay Y., (2005):** « Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales », coquet, Edition France agricole.
- **Campbell W C.,(1989) :** «Ivermectin and abamectin. New York » : Springer-Verlag , 361 p.
- **Capkin E.; Altinok I. and Karahan S., (2006):** «Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout», *Chemosphere* 64, 1793–1800.
- **Carozza S.E.; Li B. and Elgethun K., (2008):** «Risk of childhood cancers associated with residence in agriculturally intense areas in the United States», *Environ, Health Perspect*, 116(4):559-65. United States, *Environ, Health Perspect*. 2008, 116(4):559-65.
- **Chaney A.L. and Marbach E.P., (1962):** «Modified reagents for determination of urea and ammonia». *Clin Chem*;8:130-132.
- **Chapman A M.,(2001):** «Ivermectin, in "Handbook of poisoning in dogs and cats"», Blackwell Science, p 167-173. *Journal de Pharmacie Clinique*. Volume 20, Number 2, 97-101.
- **Chhabra S.K.; Hashim S. and Rao A.R., (1993):** «Modulation of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed translocationally to malathion, *J. Appl, Toxicol*, 13, 411–416.
- **Chevreuil M. and Garmouma M., (1993):** «Occurrence of triazines in the atmospheric allout on the catchment basin of the river Marne (France), *Chemosphere* 27, 1605–1608.
- **Codru N., (2007) :** «Diabetes in relation to serum levels of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in adult native Americans», *Environ Health Perspect* ; 115 : 1442-7.
- **Derlon A .L. M., (2006):** «Étude pharmacocinétique de l'influence du sexe sur le profil plasmatique de la sélamectine chez le chien».
- **Duramad P.; Tager I.B. and Holland N.T., (2007):** «Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies», *Toxicology (Letters)*, 30, No 172(1-2), pp. 48-49.
- **Dodd N., (2008) :** «Emamectine benzoate: Human health risk assessment for proposed uses on tree nuts and pistachios and as on injection treatment for ornamental/ non-bearing trees». Pages: 5, 9, 12, 13.

- **Dragica V. and Brkić A., (2008):** «Carbofuran in water: Subchronic toxicity to rats». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25 334–341.
- **Ejaz S.; Akram W.; Lim C.W.; Lee J.J. and Hussain I. (2004):** «Endocrine disrupting pesticides : a leading cause of cancer among rural people in Pakistan», *Experimental Oncology*, 26, (2), 98-105
- **El Feki. A. ; Gribaa S. ; Gharbi Lasseram N. et Kammoun A ., (1981):** « Taux de catabolisme hépatique de la corticostérone chez les rats soumis à diverses agressions », *J. Physiol. (Paris)* 77 17A.
- **Elbaz A. and Tranchant C., (2007):** «Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease». *J. Neurol. Sci.*, Vol. 262, n°1-2, pp: 37-44.
- **Ellman G.L., (1959):** «Tissue sulfhydryl groups». *Arch Biochem Biophys*, 82: 214-226
- **Engel L. S.; O'Meara E. S. and Schwartz S M., (2000):** «Maternal occupation in agriculture and risk of limb defects in Washington State». *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, No 26, pp. 193-198.
- **Environmental Protection Agency (E.P.A), 2006:** « Emamectin; Pesticide Tolerance».
- **Federal Register, (2003):** «Emamectin; Pesticide Tolerance, Rules and Regulations» Volume 68, Number 131, 40791-40803.
- **Filipov N. M.; Pinchuk L. M.; Boyd B. L. and Crittenden P. L., (2005):** «Immunotoxic effects of short-term atrazine exposure in young male C57BL/6 mice». *Toxicol Sci*, 86(2); 324- 332.
- **Final Report, (2007):** «Evaluation of the potential risks to consumers from indirect exposure to veterinary medicines».
- **Fitzpatrick P. J. and Sheehan D., (1993):** «Séparation de multiple forms of glutathion-S-transférase from the bleu mussel, *Mytilus edulis*». *Xenobiotica*.23, 851-861.
- **Fitzpatrick P. J.; Krag.; Hojrup P.; Sheehan D., (1995):** «Caractérisation of a Glutathion-S-transférase, and a related glutathione-binding protéine from gill of the bleu mussel, *Mytilus edulis*». *Biochem J.* 305, 145-150.
- **Fitzpatrick P J .; Ohalloran J.; Sheehan D.; Walsh A R.; (1997):** «Assesment of a glutathion-S-transférase and related protéins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L), as potential organic pollution Biomarkers». *Biomarkers*.2, 51-56.
- **Fossati P. and Principe L, (1982) :** *Clin. Chem.*, 28,p. 2077-2080

- **Fournier J., (1988):** «Chimie des Pesticides», Paris.
- **Fournier M.; Friborg J.; Girard D.; Mansour S. and Krzystyniak K., (1992):** «Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine (AAtrex) in mice», Toxicol, Lett., Vol, 60, n°3, pp: 263-274.
- **Friedewald Q. L. R. and Fredrikson D. , (1972):** «Estimation of the concentration of LDL-cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge». Clin Chem ; 18 : 499-502.
- **Gonzalez , (2005):** «Lipid peroxides and antioxidant enzymes and cisplatin induced chronic nephrotoxicity in rats, Mediators of inflammation», 3,139-143.
- **Gordon L.R.; Wise L.D. and Vonderfecht S.L. , (1987):** «Single generation study in rats with the Delta-8,9-isomer of abamectin (avermectin B 1 ) ». No. 87-716-0. Étude n ° 87-716-0, Unpublished report prepared, West Point, Pennsylvanie, États-Unis, Soumis à l'OMS par MSDRL, Three Bridges, NJ, Etats-Unis.
- **Grange D. Camard J.P. Host S. Grémy I ., (2008):** Les pesticides : considérations sanitaires. Environnement et Santé ; ISBN : 978-2-7371-1621-6
- **Grove T. H., (1979):** «Effect of reagent pH on Determination of HDL Cholesterol by precipitation with Sodium Phosphotungstate-magnesium» Clin Chem 25:560.
- **Hare R.S., (1950):** «Endogenous creatinine in serum and urine». Proc Soc Exp Biol Med. 74:pp148
- **Hancock D. B.; Martin E. R.; Mayhew G. M.; Stajich J. M.; Jewett R.; Stacy M. A.; Scott B. L.; Vance J. M.; and Scott W. K., (2008):** - «Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study», BMC Neurol., Vol. 8, n°6.
- **Heassok K ; Boa A.; Louis S.; Crouch Peter G.; Wislocki; Robert A. ; Robinson and Jinn W., (2004):** « Tissu, Distribution, Metabolism and Residue depletion study in Atlantic Salmon following oral administration of [3H] Emamectine benzoate ». J. Agric. Food. Chem, 52, 2108-2118.
- **Hoerner G., (1995):** « Contribution à l'étude de la qualité du lait : objectifs, stratégies, importance de la traite, impact de l'opération M.I.L.L.Q. », Thèse de doctorat vétérinaire, université Claude Bernard Lyon I, 143p.
- **Hotchkiss A. K.; Rider C. V.; Blyston C. R.; Wilson V. S.; Hartig P. C.; Ankley G. T.; Foster P. M.; Gray C. L. and Gray L. E., (2008):** « Fifteen years after Wingsprea environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go», Toxicological Sciences, No 105(2), pp. 235-259.

- **Ishaaya I.; D.degheele (Eds.), (1998):** « Insecticides with Novel Modes of Action; mechanism and application», 153-157.
- **Jaga K. and Dharmani C., (2005):** «The epidemiology of pesticide exposure and cancer :a review», Rev. Environ. Health, 20, (1), 15-38
- **Junqueira V. B. C.; Simizu K.; Videla L. A. and Barros S. B. M., (1986):** «Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production».
- **Jurewicz J.; et Hanke W., (2006) :** «Exposure to pesticides and childhood cancer risk : has there been any progress in epidemiological studies, » Int. J. Occup. Med. Environ. Health, 19, (3), 152-169
- **Kalender S. and Ogutcu A.; (2005):** «Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of Vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes», Toxicology 211, 197–206.
- **Kamel F. and Hoppin J. A., (2004):** «Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease», Environ Health Perspect, 112(9): 950-958.
- **Kammerer M., ( 2000) :** «Intoxications par les herbicides», 1ère éd, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, 16 p.
- **Kammerer M., (2000):** «Intoxications animales par les insecticides et les acaricides», 1 éd, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Nantes, 22 p.
- **Kim I.Y. , (2004):** «Assessing estrogenic activity of pyrethroid insecticides using in vitro combination assays», Journal of Reproduction and Development, 50, (2), 245-255
- **Koner B.C.; Banerjee B.D. and Ray A., (1998):** «Organochlorine pesticide, induced oxidative stress and immune suppression in rats». Indian J Exp Biol;36:395-8.
- **Kovecses J. et David J., (2005):** «Risque et impacte environnementaux potentiels des avermectines pour les écosystèmes d'eau du Quebec».
- **Landrigan P. J. and Kimmel C. A., (2004):** «Children's health and the environment : public health issues and challenges for risk assessment», Environmental Health Perspectives, 112, (2), 257-265
- **Gamet-Payraastre L., (2008):** «Contaminants alimentaires et cibles cellulaires, Exemple des pesticides», pages 41.

- **Lemoal J., (2008):** «Cancers de l'enfant et environnement (agents chimiques, physiques ou microbiologiques) Hémopathies de l'enfant et exposition prénatale aux pesticides domestiques» - InVS - Département santé environnement - Saint-Maurice.
- **Lechner W. D. and Rehman Abdel M.S., (1986):** «The effect of carbamyl and malathion in combination of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione-S-alkyl transferase activity in vitro». Arch, Environ, Contam, Toxicol, 15, 647–651.
- **Lee W. J., (2004):** «Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the agricultural health study», J. Nat. Cancer Inst., 96, (23), 1781-1789
- **Lee W. J., (2005):** «Cancer incidence among pesticide applicators exposed to alachlor in the agricultural health study», Am. J. Epidemiol., 161, (1), 101-102
- **Levine R. L.; Garland D.; Lenz A. G.; Ahn B. W.; Shaltiel S. and Stadtman E R., (1990):** «Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins», Meth, Enzymol, 186, 464–478.
- **López O., (2007):** «Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides», Toxicology Letters, Volume 171, Issue 3, Pages 146-153.
- **Malik J.K. and Summer K. M., (1982):** «Toxicity and metabolism of malathion and its impurities in isolated rat hepatocytes: role of glutathione», Toxicol, Appl, Pharmacology, 66, 69–76.
- **Marigny K.; Lohezic F.; Bertin S. et Javaudin L., (2001):** «Place de l'ivermectine dans le traitement de la gale humaine», journal de pharmacie clinique, 20, n°2, 97-101.
- **Laurin M.C., (2007) :** «Etudes biologiques et toxicologiques des pesticides utilisés en pomiculture québécoise sur le prédateur acarien Anystis Baccarum (L) et analyse critique des dispositifs d'évaluation canadien et américain de la toxicité des pesticides, université du Québec à Montréal».
- **Maroni M.; Colosio C .; Ferioli A. and Fait A., (2000) :** «Biological monitoring of pesticide exposure»: a review, Introduction, Toxicology 7 1–118.
- **Martoja R. et Martoja-Pierson M., (1967):** «Initiation aux Techniques de l'Histologie animale», Paris: Masson 345 p.
- **Martinez -Cayuela, M. (1995). ;** «Oxygen free radicals and human disease». Biochimie 77: 147– 161.
- **Meissonnier E.; Devisme P. et Join-Lambert P., (1997):** «Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires», 9<sup>o</sup> Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort, 1548.

- **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 ».
- **Michailova., (1998):** «A comparative assessment of liver function in workers in the petroleum industry», *Int. Arch.Occup. Environ. Health* 71 (Suppl.) S46–S49.
- **Miller L.C et Tainter M.T., 1994:** «Estimation of the ED50 and Its Error by means of logarithmic-probit graph paper». *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, Vol. 57, pp: 261-264.
- **Muhammad G.; Jabbar A.; Khan M Z. and Saib M., (2004):** «Use of neostigmine in massive ivermectin toxicity in cats», *Vet Human Toxicol*, 46: 28-9.
- **Mukherjee S.; Koner B. C., Ray S. and Ray A., (2006):** «Environmental contaminants in pathogenesis of breast cancer», *Indian J. Exp. Biol.*, 44, (8), 597-617
- **Multigner L., (2005):** «Effets retardés des pesticides sur la santé humaine». *Environnement, risques & santé*, vol. 4,n°3,, p187-194.
- **Muniz J. F.; McCauley L.; Scherer J.; Lasarev M.; Koshy M.; Kow Y. W.; Nazar-Stewart V. and Kisby G. E., (2008):** «Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study», *Toxicol Appl Pharmacol*, 227(1), 97-107.
- **Mushtaq M. et Syntasckos L. R., (1996):** *J. Agric. Chem*, 44, 3342-3349.
- **Nasterlack M., (2007):** «Pesticides and childhood cancer: an update», *Int J Hyg Environ Health*. 210(5): 645-657."
- **OEPP, 2004** Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes : «Evaluation biologique des produits phytosanitaires Définition d'un produit phytosanitaire Approuvé en tant que Norme OEPP en 2004-09».
- **OMS, (1999):** «Evaluation des résidus de certains médicaments vétérinaires dans les aliments : cinquantième rapport du comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires».
- **OMS, (2005):** «Organisation mondiale de la santé, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification»
- **ORS, (2001):** «Effets chroniques des pesticides sur la santé: état actuel des connaissances», Observatoire régional de la santé, Bretagne.
- **Paolicchi A.; Tongiani R.; Tonarelli P.; Comforti M.; Pompella A., (1977):** «Gamma-glutamyl transpeptidase dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and Hep G2 hepatoma cells». *Free Radic, Biol, Med*, 22, 853–860.

- **Pedigo L. P., (2002):** «Entomology and pest management», Fourth edition, Prentice Hall, 742 p.
- **Periquet A.,** «Toxicité des résidus de pesticides». In : **DERACHE R.; et al., (1986):** «Toxicologie et sécurité des aliments», 1er<sup>®</sup> éd, Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 594 p, 299-352.
- **Petropoulos I.; Conconi M.; Wang X.; Hoemel B.; Bregegere F.; Milner Y. and Friguet B., (2000):** «Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells», J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci., , 55, B220-B227.
- **Possamai F. P.; Fortunato J. J.; Feir G.; Agostinho F. R. ; Quevedo J.; Wilhelm Filho D. and Dal-Pizzol F., (2006):** « Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in wistar rats », *environment toxicology and pharmacology*, 198-204.
- **Provost D.; Cantagrel A.; Lebailly P.; Jaffre A.; Loyant V.; Loiseau H.; Vital A.; Brochard P.; and Baldi I., (2007):** «Brain tumours and exposure to pesticides: a casecontrol study in southwestern France», *Occup Environ Med*, 64(8), 509-514.
- **Purvine J., (2005):** « Biological evaluation and assessment of endangered threatened candidate and forest service sensitive plants and terrestrial animal species».
- **Queiroze K. R. and Waissmann W., (2006):** «Occupational exposure and effects on the male reproductive system, » *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 22, (3), 485-493
- **Rezg R., (2007):** «Effect of subchronic exposure to MALATHION on metabolic parameters». *C. R. Biologies* 330 .
- **Robert E. T. and Hutson D., (1998):** « Metabolic pathways of agrochemicals: Insecticides and fungicides». Publié par: Royal Society of Chemistry (Great Britain). ISBN D85
- **Rogan W. J. and Ragan N. B., (2007):** «Some evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children», *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, No 210(5), pp.659-667.
- **Rowe A. M.; Brundage K. M. and Barnett J. B., (2007):** «In vitro atrazine-exposure inhibits human natural killer cell lytic granule release», *Toxicol Appl Pharmacol*, 221(2), 179-188.
- **Russell L. A., (1989):** «Etude de la réversibilité des lésions rénales induites par une dose unique sublétales de DBCP à des rats», *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*, vol. 9, no2, pp. 145-157 (3 p).

- **Saka S.; Aouacheri W. and Abdennour C., (2002):** «The capacity of glutathione reductase in cell protection from the toxic effect of heated oils», *Biochim*, 84: 661-665.
- **Salameh P.; Waked M.; Baldi I.; Brochard P. and Saleh B. A., (2006):** «Respiratory diseases and pesticide exposure: a case-control study in Lebanon», *J Epidemiol Community Health*, 60(3), 256-261.
- **Saleh A. T.; Sakr Z. Y.; Al-Sahaf O. M.; Bahareth O. M. and Sarhan , (1998):** «Toxicity of pyrethroid insecticide Tetramethrine in albino rats: Hematological and biochemical effects». *J. Egypt Germ., Soc, Zool, Vol, 25*, pp: 35-52.
- **Samuel O., (2001):** «Réflexion sur l'utilisation des pesticides en milieu urbain, Mémoire présenté au groupe de réflexion sur les pesticides en milieu urbain, Institut national de la santé publique du Québec».
- **Samuel O. et Michaud L., (2000):** «Utilisation de pesticides en milieu urbain: risques à la santé et alternatives, Bulletin d'information toxicologique», Institut national de la santé publique du Québec, vol.6,no.2, p.5-11.
- **Sanborn M.; Cole D.; Kerr K.; Vakil C.; Sanin L. H. and Basil K., (2004):** «Systematic Review of Pesticides Human Health Effects», The Ontario College of Family Physicians.
- **Sanusi A. A., (1996):** «Comportement physico-chimique et transport des pesticides particuliers et gazeux dans l'atmosphère, » Thèse de doctorat de 3ème cycle, Université Louis Pasteur de Strasbourg, 22-72.
- **Shoop W. and Soll M., (2002):** « Ivermectin, abamectin and eprinomectin », Dans J. Vercruysse et R.S. Rew (éd.), *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing, New York, pp: 1-29.
- **Schrack D. X. et Coquil., (2009):** « Rémanence des pesticides dans les eaux issues de parcelles agricoles récemment converties à l'Agriculture Biologique ». *Innovations Agronomiques* 4, 259-268.
- **Smaoui M.; Gorbel F.; Bougelben M.; Makni-Ayadi F. et El Feki A., (2000) :** « Impact de l'exposition chronique aux gaz d'échappement d'origine automobile sur certains biomarqueurs touchant la fonction hormonale sexuelle male, la fonction rénale et l'hémogramme chez le rat », *Pollut. Atmos*, (Paris) 167, 439– 449.
- **Stengel B., (1996):** « Maladies Rénales d'origine toxique professionnelle », in: *Encyclopédie Medico-Chirurgicale*, Elsevier, Paris, (Toxicology, Pathologie professionnelle, 16-530-H-10; Nephrology-Urologie, 18-067-a-10,8p.

- **Syngenta., (2005):** «Proclaim product sheet», Available.http, // www.Syngentacropprotection-us.com/ online.
- **Terry-Roberts D.; Hutson H.; Philip J. and Jewes S., (1998):** «Metabolic pathways of agrochemicals, Insecticides and Fungicides», PART TWO, 89-93.
- **Theus S. A.; Lau K. A.; Tabor D. R.; Soderberg L. S. and Barnett J. B., (1992):** «In vivo prenatal chlordane exposure induces development of endogenous inflammatory macrophages», J Leukoc Biol, 51(4), 366-372.
- **Trevisan M., (1993):** « Pesticides in rainfall and air in Italy », Environmental Pollution (80): 31-39.
- **Trinder P., (1969) :**Ann. Clin.,Chem.,p.27-29
- **Tzung-Hai Y. and Ja-Liang L., (2004) :** Clinical Toxicology, Volume 42, pages 657 – 661.
- **UIPP (2009), :** (Union des Industries de la Protection des Plantes) Site de l'Union des Industries de la Protection des Plantes, : <http://www.uipp.org> Page consultée
- **Van Balen E., (2006):** «Exposure to non-arsenic pesticides is associated with lymphoma among farmers in Spain», Occup. Environ. Med., 63, (10), 663-668
- **Van Maele-Fabry G.; Libotte V.; Willems J. and Lison D., (2006):** «Review and metaanalysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers», Cancer Causes Control, 17(4), 353-373.
- **Vaziril N. D.; Ding Y. and Niz Gonick H.C., (1997):** «Altered nitric oxide and increased Kidney Intern», 52: 1042-1046.
- **Veillerette F., (2005):** «Le piège se referme », Etude publiée dans une revue mensuelle du monde rural et de l'environnement, Terre et Vie, n° 94. ISSN 113-0237.
- **Vos J. G.; Dybing E.; Greim H. A.; Ladefoged O.; Lambré C.; Tarazona J. V.; Brandt I. and Vethaak A. D., (2000):** «Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation», Critical Reviews in Toxicology, No 30(1), pp 71-133.
- **Wendt-Rasch L.; Van den Brink P. J.; Crum S. J. H. and Woin P., (2004):** «The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community», Ecotox Environ, Safe 57, 383–398.

- **Weselak M.; Arbuckle T. E.; Wigle D. T.; and Krewski D., (2007):** «In utero pesticide exposure and childhood morbidity», *Environmental Research*, Volume 103, No 1, pp 79-86.
- **Whalen M. M.; Bommanna G.; Loganathan; Yamashita N. and Saito T., (2003):** «Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides», *Chemico-Biological Interactions*, Volume 145, Issue 3, 15 June 2003, pp. 311-319
- **Wigle D. T.; Arbuckle T. E.; Turner M. C.; Brub A.; Yang O.; Liu S. and Krewski D., (2008):** «Epidemiologic Evidence of Relationships Between Reproductive and Child Health Outcomes and Environmental Chemical Contaminants», *Journal of Toxicology and Environmental Health*, May, Part B, Volume 11, Issue 5 & 6, pp. 373-517.
- **Wise L. D.; Allen H. L.; Hoe C. L.; Verbeke D. R. and Gerson R. J., (1997):** «Developmental neurotoxicity evaluation of the avermectin pesticide, emamectin benzoate, in Sprague-Dawley rats», *Neurotoxicology and Teratology* 19 (4), 315-326.
- **Xue N., Xu X. and Jin Z. (2005):** «Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir», *Chemosphere*, vol.61, 1594-1606
- **Zuhair Y Al. and Sahnaf., (2006):** «Toxicity of Sumithion in albino Rats: Hematological and Biochemical studies», 6: 2959-2962.

*Annexe*

## fiche technique N° 1

- **Préparation des solutions pour le dosage de la glycémie**

	<u>BLANC</u>	<u>STANDARD</u>	<u>ECHANTILLON</u>
<u>Réactif de travail (ml)</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>
<u>Standard (µl)</u>	-	<u>10</u>	-
<u>Echantillon (µl)</u>	-	-	<u>10</u>

- **Préparation des solutions pour le dosage de l'urée**

	<u>BLANC</u>	<u>STANDARD</u>	<u>ECHANTILLON</u>
<u>Réactif de travail (ml)</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>
<u>Standard (µl)</u>	-	<u>10</u>	-
<u>Echantillon (µl)</u>	-	-	<u>10</u>

- **Préparation des solutions pour le dosage de la créatinine :**

	<u>BLANC</u>	<u>STANDARD</u>	<u>ECHANTILLON</u>
<u>Réactif de travail (ml)</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>
<u>Standard (µl)</u>	-	<u>100</u>	-
<u>Echantillon (µl)</u>	-	-	<u>100</u>

- Préparation des solutions pour le dosage de la cholestérolémie

	<u>BLANC</u>	<u>STANDARD</u>	<u>ECHANTILLON</u>
<u>Réactif de travail (ml)</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>
<u>Standard (µl)</u>	-	<u>10</u>	-
<u>Echantillon (µl)</u>	-	-	<u>10</u>

- Préparation des solutions pour le dosage de triglycérides.

	<u>BLANC</u>	<u>STANDARD</u>	<u>ECHANTILLON</u>
<u>Réactif de travail (ml)</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>
<u>Standard (µl)</u>	-	<u>10</u>	-
<u>Echantillon (µl)</u>	-	-	<u>10</u>

- Préparation des solutions pour le dosage de l'HDL

Réactif µl	100
Echantillon ml	1

– **Composition du réactif du dosage de la phosphatase alcaline (PAL):**

R <sub>A</sub> (Buffer) 15ml	Diethanolamine (DEA) pH=10,4	1 mmol/l
	Chlorure de magnésium	1 mmol/l
R <sub>B</sub> (substrat)	p-nitrophenyl phosphate (pNPP)	10mmol/l

– **Composition du réactif du dosage de la transaminase oxaloacétique (GOT) :**

R <sub>A</sub>	Tris (Buffer) pH=7,8	80 mM
	L-aspartate	240 mM
	Malate déshydrogénase	≥ 500 U/l
	Lactate déshydrogénase	≥ 1200 U/l
R <sub>B</sub>	NADH	0,18 ml
	α-Cetoglutarate	12 mM

– **Composition du réactif du dosage de la transaminase glutamo pyruvique (GPT) :**

R <sub>A</sub> (Buffer)	Tris Hcl buffer pH=7,8	100 mM
	L-alanine	500 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
	Lactate déshydrogénase	≥1428 U/l
R <sub>B</sub> (Substrat)	α-Cetoglutarate	15 mM
	NADH	0,18 mM

## fiche technique N° 2

– **Acide trichloroacétique 20%:**

TCA.....20g  
Eau distillée.....qsp100ml

– **Solution de NaOH 0.2M:**

NaOH.....8g  
Eau distillée.....1000ml

– **Solution d'Hcl 2M:**

Hcl.....61.34ml  
Eau distillé.....1000ml

– **Solution de DNPH 10mM:**

DNPH.....1.98g  
Hcl.....1000ml

– **Solution d'éthanol éthyle acétate (50ml) v/v:**

Ethanol.....25ml  
Ethyle acétate.....25ml

– **Acide trichloroacétique 30%:**

TCA.....30g  
Eau distillée.....100ml

– **Acide thiobarbiturique 0.74%:**

TBA.....0.74g  
Eau distillée.....100ml

## fiche technique N° 3

– **Préparation du tampon PBS pH 7,5:**

KCl.....	0.192 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2.9 g
NaCl.....	8 g
Eau distillée.....	100 ml

– **Préparation du tampon phosphate PO<sub>4</sub> (0.2M) : pH=7**

**La solution acide:**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O.....	31.4 g
Eau distillée.....	1000 ml

**La solution basique:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O.....	35.59 g
Eau distillée.....	1000 ml

\*les deux solutions sont mélangées pour avoir un pH 6 et pH 5.4 respectivement, en utilisant un pH mètre.

– **Préparation de tampon phosphate KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20mM) pH=3.2:**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2.74 g
Eau distillée.....	1000 ml

– **Préparation de tampon phosphate KPB pH=7:**

**Solution A:**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	870 mg
---------------------------------------	--------

---

Eau distillée..... 64 ml

**Solution B:**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....1.74 g

Eau distillée..... 100 ml

\*Mélanger les deux solutions, ajouter 164ml d'eau distillée, contrôler le pH et ajouter 61mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Conserver à 4 °C.

**– Préparation de BSA 0.1%:**

BSA.....0.1 g

Eau distillée.....100 ml

**– Réactif de Bradford:**

Bleu de coomassieG250..... 100 mg

Ethanol 95°.....50 ml

Acide Phosphorique.....100 ml

Compléter avec de l'eau distillée à 1000ml, puis filtrer et conserver à l'abri de la lumière à 4°C pendant 1 mois.

## fiche technique N°4

– **Préparation de formol tamponné 10%:**

Formol.....10 ml

Compléter à 200ml de PBS.

– **Préparation de tampon phosphate PO<sub>4</sub>:**

CTABE.....1 g

Tampon phosphate PO<sub>4</sub> .....200 ml

– **Préparation de tampon phosphate PO<sub>4</sub> 50mM0:pH= 8**

**La solution acide:**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O..... 7.8 g

Eau distillée.....1000 ml

**La solution basique:**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O.....8.89 g

Eau distillée..... 1000 ml

– **Préparation de tampon phosphate KPB pH=7:**

**Solution A:**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....870 mg

Eau distillée..... 64 ml

**Solution B:**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1.74 g

Eau distillée..... 100 ml

\*Mélanger les deux solutions, ajouter 164ml d'eau distillée, contrôler le pH et ajouter 61mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Conserver à 4 °C.