



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



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

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

Département de biologie

Laboratoire de recherche

Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition

THESE

Présentée par : **M^{elle} CHIALI Fatima Zohra**

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

En Physiologie et Biochimie de la Nutrition

Thème

***Effets métaboliques d'un régime à base de purée de
pomme de terre contaminée par les pesticides chez le***

Présidente	M^{me} ATIK Fouzia	Professeur, Université TLEMCEN
Directrice de Thèse :	M^{me} MERZOUK Hafida	Professeur, Université TLEMCEN
Examinatrice: Examineur :	M^{me} BOUANANE Samira M^R RIAZI Ali	MCA, Université TLEMCEN Professeur, Université MOSTAGANEM
Examineur :	M^R BABA HAMED Bey	Professeur, Université D'ORAN
Examineur :	M^R BENALI MOHAMED	Professeur, Université SIDI BELABBES

Année Universitaire : 2013-2014

Dédicaces

A ma mère

A la mémoire de mon père

A mes chères sœurs (WASSILA et HIND)

A mes chers frères (SOUFIENE et MOHAMED)

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

Je dédie ce travail.

Remerciements

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

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

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

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

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

Je remercie énormément *Madame BOUJANANE Samira*, Maître de conférences de classe A de l'université de Tlemcen, qui a bien voulu accepter d'examiner mon mémoire de thèse.

Mes remerciements sincères et respectueux vont au *Monsieur RIAZI Ali*, professeur de l'université de Mostaganem, pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme examinateur.

J'adresse mes sincères remerciements à *Monsieur BABA HAMED Bey*, professeur de l'université d'Oran, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail et d'être examinateur.

Je tiens également à remercier *Monsieur BENALI M^d*, professeur de l'université de Sidi Belabbes, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail et de participer à ce jury.

Je remercie également, *Monsieur MERZOUK SA*, Maître de conférences au Département de Physique, Faculté des sciences, université de Tlemcen, pour son aide dans l'étude statistique.

J'aimerais remercier toute l'équipe du laboratoire d'ANAPATH, hôpital de Tlemcen, pour leur accueil très chaleureux et leur aide que leur sympathie et gentillesse, particulièrement Professeur *KALAJIDI Malika*.

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

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

AVANT-PROPOS

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

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

F.Z. Chiali, H. Merzouk, S.A. Merzouk, A. Medjdoub, M. Narce. (2013). **Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats.** *Pesticide Biochemistry and Physiology*.106: 38-44.

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

RÉSUMÉS PUBLIÉS

F.Z. Chiali, H. Merzouk. (2012). Effet de la métribuzine sur quelques paramètres lipidiques chez le rat wistar. *Nutrition clinique et métabolisme*. 26 : S54-S163.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

F.Z. Chiali, H. Merzouk. Effet de la métribuzine sur quelque paramètre lipidique chez le rat wistar. Congrès international, 10^{ème} journées francophones de nutrition, 12-14 Décembre, 2012, Lyon, France.

F.Z. Chiali, H. Merzouk. Effects of metribuzin on the status oxidant/antioxidant wistar rat. Congrès international de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, P2T, 22-24 Avril, 2013, Anger, France.

F.Z. Chiali, H. Merzouk, S.A. Merzouk, A. Medjdoub, F.Z. Baba Ahmed. Effects of pesticide metribuzin on some biochemical parameters in rats wistar. 4^{ème} congrès international atelier sur la biotechnologie industrielle, 10-11 Avril, 2013, Tlemcen, Algérie.

F.Z. Chiali, H. Merzouk, S.A. Merzouk, A. Medjdoub, F.Z. Baba Ahmed. Effet de la métribuzine sur quelques paramètres : Triglycérides et Cholestérol chez le rat wistar. 4^{ème} Congrès de biologie clinique, 5^{ème} journées francophones de médecine de laboratoire, 22-23 Avril, 2013, Alger, Algérie.

F.Z. Chiali, M.A. Bedrane. Etude de l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B lié aux esters d'acide gras sur le globule rouge humain. 1^{er} Congrès international en ingénierie, santé et analyse. SEHA, 5 Mai, 2013, Alger, Algérie.

F.Z. Chiali, M.A. Bedrane. Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B lié à la capsorbine vis-à-vis le globule rouge humain. Forum sur le développement des sciences de la vie et de l'univers, 14-15 Mai, 2013, Tlemcen, Algérie.

A. Medjdoub, H. Merzouk, S.A. Merzouk, **F.Z. Chiali.** Effets d'un pesticide (métribuzine) sur quelques paramètres biochimiques chez le rat mâle wistar. Forum sur le développement des sciences de la vie et de l'univers, 14-15 Mai, 2013, Tlemcen, Algérie.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification des principales familles chimiques de pesticides (données issues de l'ACTA, 1999)	12
Tableau 2: Distribution des pesticides en groupes et en fonction de leur toxicité.....	15
Tableau 3: les différents modes d'action des fongicides	21
Tableau 4 : différentes modes d'action des herbicides.....	22
Tableau 5 : Différentes modes d'action des insecticides.....	23
Tableau 6. Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires.....	42
Tableau 7: Propriétés physicochimiques des deux pesticides utilisés	44
Tableau 8 : la composition du régime pomme de terre témoin.....	46
Tableau 9: Poids corporel et consommation alimentaire chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	56
Tableau 10: Poids corporel et consommation alimentaire chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	58
Tableau 11: Teneurs sériques en glucose, en protéines totales, en urée et en créatinine chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	60
Tableau 12: Teneurs en protéines (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	64
Tableau 13:Teneurs sériques en glucose, protéines totales, urée, créatinine et transaminases chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	66
Tableau 14: Teneurs en protéines (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe	69
Tableau 15: Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine	79
Tableau 16: Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe	80
Tableau 17: Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	81
Tableau 18: Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Produits phytopharmaceutiques mesurés avec les niveaux de sécurité fixés par la réglementation (Source : UIPP).....	18
Figure 2: Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde.	26
Figure 3: Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres.....	27
Figure 4: Principales sources d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au niveau des cellules vasculaires.....	28
Figure 5 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène.....	29
Figure 6 : La mitochondrie est la principale source d'EOR.....	31
Figure 7 : Sources et principales cibles des espèces radicalaires de l'oxygène modulant la croissance, la survie et l'apoptose des cellules endothéliales et musculaires lisses	34
Figure 8: Les trois types de la SOD.....	40
Figure 9: Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	61
Figure 10 : Teneurs en triglycéride (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	63
Figure 11: Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	67
Figure 12 : Teneurs en triglycéride (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	68
Figure 13 : Poids des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	72
Figure 14 : Poids des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	73
Figure 15 : Teneurs en lipides totaux des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	74
Figure 16 : Teneurs en lipides totaux des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	75
Figure 17 : Teneurs en protéines totales des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine	76
Figure 18 : Teneurs en protéines totales des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	77

Figure 19 : Activités des enzymes lipases du foie, muscle et intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	84
Figure 20 : Activités des enzymes lipases du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	85
Figure 21 : Activités des enzymes lipases du foie, muscle et intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozbe.....	86
Figure 22 : Activités des enzymes lipases du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	87
Figure 23 : Activité de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine ou le mancozebe.....	89
Figure 24 : Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	90
Figure 25 : Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	91
Figure 26 : Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	92
Figure 27 : Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	94
Figure 28: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	95
Figure 29: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	96
Figure 30 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	97
Figure 31 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	99
Figure 32: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	100
Figure 33: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	101

Figure 34 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.....	102
Figure 35: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.....	103
Figure 36 : Coupes histologiques de foie de rat témoin et les différents lots de rats recevant la métribuzine	105
Figure 37 : Coupes histologiques du muscle de rat témoin et les différents lots de rats recevant la métribuzine	106
Figure 38 : Coupes histologiques du tissu adipeux de rat témoin et les différents lots de rats recevant la métribuzine	108
Figure 39 : Coupes histologiques de l'intestin de rat témoin et les différents lots de rats recevant la métribuzine	109
Figure 40: Coupes histologiques de foie de rat témoin et les différents lots de rats recevant le mancozebe	110
Figure 41 : Coupes histologiques du muscle de rat témoin et les différents lots de rats recevant le mancozebe	111
Figure 42 : Coupes histologiques du tissu adipeux de rat témoin et les différents lots de rats recevant le mancozebe	112
Figure 43: Coupes histologiques de l'intestin de rat témoin et les différents lots de rats recevant le mancozebe	113

LISTE DES TABLEAUX EN ANNEXE

Tableau A1: Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	159
Tableau A2: Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	160
Tableau A3: Poids des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe	161
Tableau A4: Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	162
Tableau A5: Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	163
Tableau A6: Activités des enzymes lipases des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	164
Tableau A7: Activité de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe	165
Tableau A8: Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	166
Tableau A9: Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe	167
Tableau A10: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe	168
Tableau A11 Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	169
Tableau A12: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	170
Tableau A13: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.....	171

.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

AP-1 : Activator protein- 1.

Arfd : Dose de référence aigue

Ca²⁺ : Calcium.

DL50/100: Dose létale 50/100.

D1: Dose sans effet pour les pesticides utilisés (5mg/kg pour le mancozebe ; 1,3 mg/kg pour la métribuzine).

D2: Dose létale 50/100 (50 mg/kg pour le mancozèbe ; 13 mg/kg pour la métribuzine).

DDE: Dichlorodiphényldichloroéthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DES: Dose sans effet.

DJA: Dose journalière admise

DL50 : Dose létale 50

DL50/100: Dose létale 50/100.

ECH: European commission health (Commission européenne de santé publique).

EDTA: Acide éthylène diamine tetraacétique

EGF-R : Epidermal growth factor receptor.

EOR : Espèces oxygénées réactives

ERDO : Espèces réactives dérivées de l'oxygène.

ERDA : Espèces réactives dérivées de l'azote.

FAO : Food and agriculture organization of the united nations (Organisation d'alimentation et d'agriculture des nations unies).

Fe : Fer.

GSH: Glutathion réduit

GSHPx : Glutathion peroxydase.

HSF-1 : Heat shock factor-1.

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène

HDL: High-density lipoprotein (lipoprotéines de haute densité).

IBS : Inhibiteurs de la synthèse des stérols

INRA : Institut national de la recherche agronomique.

LDL: Low-density Lipoprotéin (lipoprotéine de faible densité).

LMR: Limite maximale de résidus.

LOO : Radical peroxy

LOOH : Hydroperoxyde lipidique

LO : radical alkoxyde

LPL : lipoprotéines lipases

mg/kg : Milligrammes/kilogrammes

MDA: Malondialdéhyde.

NOS : Nitric oxide synthases.

NO : monoxyde d'azote.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NH_4^+ : Ion ammonium

O₂ : Superoxyde.

ONOOH : nitroperoxyde

OMS : Organisation mondiale de santé.

ONAB: Office national d'aliment de bétails

SH : sulfhydryle.

SOD: Superoxyde dismutase.

TBA: Acide ThioBarbiturique.

TBTO: Bis(tri-n-butyltin) oxide.

TNF : Tumor necrosis factor (Facteur de nécrose Tumorale).

TGO : Transaminase glutamo-oxaloacétique.

TGP : Transaminase glutamo-pyruvique.

TrxR : Thiorédoxine réductase

UV : Ultra violet.

TG-HDL: Triglycérides-High density Lipoprotein (triglycerides des lipoprotéins de haute densité).

TG-LDL: Triglycérides-Low density Lipoprotein (triglycerides des lipoprotéins de faible densité).

TG-VLDL:Triglycérides- Very Low density Lipoprotein (triglyceride des lipoprotéins de très faible densité).

VLDL: Very Low-density Lipoprotein (lipoproteins de très faible densité).

XD : Xanthine déshydrogénase.

XO : Xanthine oxydase.

ZNA : Zone non agricole.

TABLES DES MATIERES

AVANT PROPOS

Introduction.....	1
ETAT ACTUELE SUR LE SUJET	
I. Les pesticides.....	7
I.1. Définitions	7
I.2. Histoire des pesticides.....	8
I.3. Classification des pesticides.....	9
I.4. Utilisation des pesticides.....	11
I.4.1 Pesticides en Algérie.....	11
I.5. Pesticides et santé.....	13
I.5.1. Les effets toxiques des pesticides	13
I.5.1.1. Toxicité aigue.....	13
I.5.1.2. Toxicité chronique.....	14
I.6. Toxicité des pesticides.....	17
I.6.1. Dose journalière admise (DJA)	17
I.6.2. Dose sans effet (DES)	17
I.6. 3. Dose de référence aigue.....	17
I.6. 4. La limite maximale de résidus.....	17
I.7. Mécanisme d'action des pesticides	17
I.7.1. classification par mode d'action des pesticides sur la plante.....	17
I.7.1.1. Les fongicides et leur mode d'action.....	17
I.7.1.2. Les herbicides et leur mode d'action.....	19
I.7.2. classification par mode d'action des pesticides sur les parasites.....	20
I.7.2.1. Les fongicides et leur mode d'action.....	20
I.7.2.2. Les herbicides et leur mode d'action.....	20
I.7.2.3. Les insecticides et leur mode d'action.....	20
II. Stress oxydatif.....	24
II.1. Définition et origine.....	24
II.2. Radicaux libres et le système biologique.....	24
II. 2.1. Définition et mode de production.....	24
II.2.1.1. EOR d'origine mitochondriale	25
II.2.1.2. Autre source d'EOR.....	30
II.2.2. Fonctions des radicaux libres.....	32
II.2.3. Substances oxygénées réactives et leurs mécanismes d'action.....	33

II. 3. Antioxydants.....	36
II. 3.1. Système de défense enzymatique.....	37
II. 3 .2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	39
MATERIEL ET METHODES	
I. Protocole expérimental	43
I. 1. Choix des pesticides.....	43
I.2. Préparation des solutions des pesticides.....	43
I.3. préparation des régimes	43
II. Dosage des paramètres biochimiques	47
II.1. Détermination des teneurs en glucose.....	47
II.2. Détermination des protéines totales sériques.....	47
II.3. Détermination des teneurs en urée.....	47
II.4. Détermination des teneurs en créatinine.....	47
II.5. Détermination de l'activité enzymatique des transaminases (TGO ou AST, TGP ou ALT).....	48
II.6. Détermination des paramètres lipidiques et protéiques au niveau du sérum, des lipoprotéines et des organes (foie, muscle gastrocnémien, tissu adipeux et intestin).....	48
II.6.1. Séparation des lipoprotéines.....	48
II.6.2. Détermination des teneurs en cholestérol et en triglycérides	49
II.6.3. Détermination des teneurs en protéines totales	49
II.6.4.Détermination des lipides totaux des organes (foie, muscle gastrocnémien, tissu adipeux et intestin).....	49
III. Activités enzymatiques.....	49
III.1. Détermination de l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT, EC 2.3.1.43).....	49
III.2. Dosage des lipases tissulaires.....	50
III.2.1. Détermination de l'activité de l'enzyme LPL (LPL, EC 3.1.1.34).....	50
III.2.2. Détermination de l'activité de l'enzyme lipase hormono-sensible (LHS ; EC 3.1.1.3).....	50
IV. Détermination du statut oxydant /antioxydant.....	51
IV.1. Dosage de la vitamine C.....	51
IV.2. Détermination des protéines carbonylées.....	51
IV.3. Détermination du Malondialdéhyde (MDA).....	51
IV.4. Dosage du Glutathion érythrocytaire réduit (GSH)	51
IV.5. Dosage de l'activité de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)	52

IV.6.Détermination des diènes conjugués et du taux d'oxydation des lipoprotéines.....	52
V. Etude histologique.....	53
VI. Analyse statistique.....	54
RESULTATS ET INTERPRETATIONS	
I. Effets de la métribuzine et du mancozebe sur le métabolisme.....	55
I.1. Evaluation du poids corporel, consommation alimentaire et apport énergétique.....	55
I.1.1. Poids corporel et apport alimentaire chez les rats témoins et traités par la métribuzine.....	55
I.1.2. Poids corporel et apport alimentaire chez les rats témoins et traités par le mancozebe.....	57
I.2. Variations des paramètres biochimiques.....	57
I.2.1. Effets de la métribuzine	57
I.2.1.1. Teneurs sériques en glucose et en protéines totales.....	57
I.2.1.2. Teneurs sériques en urée et en créatinine	57
I.2.1.3. Teneurs sériques en transaminases	59
I.2.1.4. Teneurs en cholestérol (g/l) sérique et des lipoprotéines.....	59
I.2.1.5. Teneurs en triglycérides (g/l) sériques et des lipoprotéines.....	59
I.2.1.6. Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines.....	62
I.2.2. Effets du mancozebe.....	62
I.2.2.1. Teneurs sériques en glucose et en protéines totales.....	62
I.2.2.2. Teneurs sériques en urée et en créatinine.....	62
I.2.2.3. Teneurs sériques en transaminases.....	65
I.2.2.4. Teneurs en cholestérol (g/l) sérique et des lipoprotéines.....	65
I.2.2.5. Teneurs en triglycérides (g/l) sériques et des lipoprotéines.....	65
I.2.2.6. Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines.....	65
I.3. Poids et composition des organes.....	70
I.3.1. Poids des différents organes.....	70
I.3.1.1. Effets de la métribuzine.....	70
I.3.1.2. Effets du mancozebe.....	70
I.4. Teneurs en lipides totaux des organes.....	70
I.4.1. Effets de la métribuzine.....	70
I.4.2. Effets du mancozebe.....	71
I.5. Teneurs en protéines totales des organes.....	71

I.5.1. Effets de la métribuzine	71
I.5.2. Effets du mancozebe.....	71
I.6. Teneurs en cholestérol total des organes.....	78
I.6.1. Effets de la métribuzine	78
I.6.2. Effets du mancozebe.....	78
I.7. Teneurs en triglycérides des organes.....	78
I.7.1. Effets de la métribuzine.....	78
I.7.2. Effets du mancozebe.....	78
I.8. Activités des enzymes lipases des organes.....	83
I.8.1. Effets de la métribuzine.....	83
I.8.2. Effets du mancozebe.....	83
I.9. Activité de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase plasmatique.....	83
I.9.1. Effets de la métribuzine.....	83
I.9.2. Effets du mancozebe.....	88
II. Effets de la métribuzine et du mancozebe sur le statut oxydant/antioxydant.....	88
II.1. Marqueurs antioxydants sériques et érythrocytaires.....	88
II.1.1. Teneurs en vitamine C sérique, en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase.....	88
II.1.1.1. Effet de la métribuzine.....	88
II.1.1.2. Effets du mancozebe.....	88
II.2. Marqueurs du statut oxydant	88
II.2.1. Effets de la métribuzine.....	88
II.2.2. Effet du mancozebe.....	93
II.3. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant des organes.....	93
II.3.1. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie.....	93
II.3.1.1. Effets de la métribuzine.....	93
II.3.1.2. Effets du mancozebe.....	93
II.3.2. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle	93
II.3.2.1. Effets de la métribuzine.....	93
II.3.2.2. Effets du mancozebe.....	98
II.3.3. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux.....	98
II.3.3.1. Effets de la métribuzine.....	98
II.3.3.2. Effets du mancozebe.....	98
II.3.4. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du l'intestin.....	98
II.3.4.1. Effets de la métribuzine	98

II.3.4.2. Effets du mancozebe.....	98
III. Analyse histologique des organes.....	104
III.1. Effet de la métribuzine.....	104
III.2. Effet de mancozebe.....	107
DISCUSSION.....	114
CONCLUSION.....	135
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	138
ANNEXE.....	159

INTRODUCTION

De tout temps, l'homme s'est trouvé dans l'obligation de défendre ses cultures contre les parasites, les ravageurs et les plantes concurrentes. La lutte physique a d'abord été utilisée à travers le désherbage ou le ramassage des insectes. Quelques produits étaient utilisés, mais c'est vraiment à partir de la seconde guerre mondiale qu'avec l'essor considérable de la chimie organique, la lutte chimique a pris l'importance qu'on lui connaît aujourd'hui par l'introduction des pesticides. Ces derniers sont des substances ou préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables (plantes, animaux, champignons et bactéries) (Vigouroux-Villard, 2006 ; Charbonnel, 2003).

Le terme pesticide désigne les produits phytosanitaires (ou phytopharmaceutiques lorsqu'ils sont accompagnés d'un adjuvant) destinés à protéger les végétaux contre tous les organismes nuisibles et les biocides qui sont, d'une manière large, destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles. Ces derniers sont employés pour la protection des matériaux (bois de charpente par exemple), des animaux, des plantes et des hommes (Camard, 2010). Les pesticides sont classés en grandes familles, soit par fonction, soit par groupe chimique, selon la molécule principale utilisée. Il existe plus d'une centaine de familles chimiques, qui ont été toutes mises sur le marché au cours de quelque dizaine d'années passées. Parmi les plus importantes on retrouve les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les organoazotés ainsi que les pyrèthrinoides (Aligon et al., 2010). L'utilisation croissante de ces outils chimiques a permis d'augmenter considérablement la productivité agricole durant ces quarante dernières années et de lutter contre les vecteurs de certaines pathologies (Vigouroux-Villard, 2006).

De plus, certains experts estiment que l'augmentation des rendements des terres agricoles a permis de limiter la déforestation et donc de préserver 50% de la surface de la forêt actuelle.

L'utilisation des produits phytosanitaires a également limité ou éradiqué un certain nombre de maladies parasitaires très meurtrières (Oerke et Dehne, 1997).

L'utilisation des pesticides présente divers avantages (essentiellement économiques), notamment pour les exploitants agricoles. Les pesticides permettent d'améliorer ou de maintenir les rendements et la qualité des produits agricoles. Ils peuvent contribuer à limiter l'érosion en réduisant les interventions au champ, et ils aident aussi à assurer un approvisionnement fiable en produits agricoles abordables et variés. Les produits phytopharmaceutiques sont également importants pour satisfaire aux exigences phytosanitaires et permettre les échanges internationaux de produits agricoles (Alavanja et al., 2004).

L'usage de ces produits a connu un très fort développement au cours des décennies passées, les rendant quasiment indispensables à la plupart des pratiques agricoles, quel que soit le niveau de développement économique des pays. De 1945 à nos jours, la consommation de pesticides a doublé

tous les dix. Si les pesticides ont constitué un énorme progrès dans la maîtrise des ressources alimentaires et l'amélioration de la santé publique (en particulier dans la lutte contre les insectes, vecteurs de maladies), le revers de la médaille est apparu rapidement. Des phénomènes de résistance chez les insectes, puis des troubles de la reproduction chez les oiseaux ont montré de façon spectaculaire les limites et les dangers de ces substances pour l'environnement, pour les écosystèmes mais également pour les êtres humains.

La mauvaise application des pesticides, leur stockage sans précaution, les rejets de résidus sont responsables d'une contamination importante de l'eau, du sol et des récoltes, particulièrement les fruits et légumes. Le régime alimentaire est une source importante d'exposition aux pesticides et à leurs traces, très dangereuses présentes dans les denrées (McCauley et al., 2006 ; INRA, 2005).

Les effets néfastes des pesticides peuvent se manifester immédiatement ou à court terme après l'exposition ou à la suite d'absorption répétée, sur une longue période, de faibles doses de pesticides. Dans le premier cas, on parlera d'intoxication aiguë alors dans le second, on fait une référence à une intoxication chronique (Onil, 2005).

Les produits antiparasitaires à usage agricole peuvent pénétrer dans l'organisme par différentes voies, avant d'être transportés par le sang. Ces voies sont représentées par la voie cutanéomuqueuse, la voie conjonctivale, la voie respiratoire et la voie digestive. Une fois dans l'organisme, les produits phytosanitaires sont ensuite en partie transformés par le foie, puis éliminés par l'expiration, la sueur, la bile, les selles et les urines, ou principalement stockés dans le système nerveux, le foie, la graisse, les os et les muscles.

Les risques liés à des faibles expositions répétées aux pesticides sur une longue période sont parfois mal définis. Cependant, plusieurs études ont montré une association entre ce type d'exposition et certaines formes de cancers, des troubles de la reproduction et du développement et des altérations des systèmes neurologique, immunitaire et endocrinien (Picó et al., 2004).

Depuis les années 1970, certains pesticides largement utilisés ont été interdits après la mise en évidence de leurs propriétés particulièrement dangereuses (ex. : DDT, lindane) (Tellier, 2006).

La toxicité des pesticides dépend de plusieurs facteurs. Quatre éléments peuvent être pris en considération : le climat, le sol, la plante traitée et les techniques d'application. Les principaux indicateurs de toxicité sont les suivants : Le premier indicateur de référence est la dose létale 50 (DL50). C'est la dose administrée à un lot d'animaux et qui provoque la mort de 50% du lot. Elle permet d'estimer la toxicité aiguë du produit. Plus la DL50 est faible, plus le produit est considéré comme toxique. Elle est exprimée en milligramme de substance toxique par kilogrammes de poids corporel (mg. Kg-1). La dose sans effet (DES) correspond à la limite de toxicité chronique pour l'animal (Toxicité à long terme). Elle est exprimée en mg/kg de poids vif par jour. La dose

journalière acceptable (DJA) est la quantité de produit pouvant être quotidiennement absorbée au cours d'une vie humaine sans manifestation d'effets secondaires. Elle est exprimée en $\text{mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$. La limite maximale de résidu (LMR) est la concentration maximale admissible dans une denrée. Elle est établie pour un produit alimentaire en tenant compte de la quantité d'un aliment donné qu'un homme consomme en moyenne chaque jour (Baril et al., 2005). Dans ce contexte, la production de denrées végétales de qualité représente un double enjeu de santé publique. Le ministère de la santé préconise la consommation de 5 à 6 fruits ou légumes, en prévention de différents cancers alors que paradoxalement, ils peuvent être vecteurs de produits supposés cancérigènes (Mathé et Climent, 2004).

L'usage de ces produits est en constante augmentation à travers tous les pays du monde. En Algérie, l'usage des insecticides, des fertilisants, des engrais, des détergents et autres produits phytosanitaires se répand de plus en plus avec le développement de l'agriculture. Actuellement dans notre pays, les analyses des résidus de pesticides pour évaluer le degré de contamination des milieux naturels (les cultures, les eaux superficielles...) ne sont pas faites systématiquement. Le dispositif de déclaration des cas d'intoxications par les pesticides, mis en place par le Ministère de la Santé en Mai 2004, a permis d'enregistrer quelques dizaines de cas de contaminations accidentelles des manipulateurs par les pesticides au cours des opérations de lutte antiacridienne. Il y a quelques années déjà, dans certaines régions du pays, les concentrations en pesticides dans les eaux de source et des nappes souterraines étaient élevées. Des analyses effectuées sur des échantillons d'eau prélevés dans la région de Staoueli (Alger) ont montré que dans plus de 30% des échantillons, la concentration de certaines molécules organochlorées (lindane, H.Chlore, 2,4 et 4,4 DDT, 2,4 et 4,4 DDE) et des organophosphorés (diazinon, parathion) dépasse les valeurs guides préconisées par l'OMS (Bouziანი, 2006). En plus, selon le Cadastre national des déchets dangereux, il existe plus de 2.300 tonnes de pesticides périmés répartis sur 500 sites détenus majoritairement par les anciennes entreprises nationales et usines de produits phytosanitaires (Bouziანი, 2007). Cette sur-utilisation nationale des produits phytosanitaires dans les cultures et dans le cadre de la lutte anti vectorielle fait craindre une pollution massive des sols, des eaux superficielles, des nappes souterraines et de tous les milieux physiques dans toutes les régions du pays. Cela, sans oublier que selon les statistiques des urgences médicales, le nombre de cas d'intoxications aux pesticides (accidentels ou tentatives de suicide) ne cesse d'augmenter (Bouziანი, 2007). Cette sur-utilisation est d'autant plus préoccupante que l'usage des pesticides doit être répété périodiquement. Cette répétition à la longue entraîne nécessairement une accumulation en pesticides et de leurs résidus dans tous nos milieux naturels, mettant en danger ainsi toute notre population par leur toxicité multiforme (Bouziანი, 2007). De plus, notre monde industrialisé nous impose un système de vie (exposition prolongée au soleil, pollution

atmosphérique, ozone, stress au travail, radiations, pesticides, tabac, alcool, absorption de nombreux types de médicaments) qui provoque dans notre organisme des réactions chimiques de type radicalaire dans des proportions non prévues par la nature. Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus de réaction énergétiques ou de défense. Toutefois, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques en engendrant de sérieuses altérations aux cellules pouvant mener à la mort cellulaire. Lorsque cette production est récurrente ou chronique mais reste modérée dans son intensité, la balance entre production de radicaux libres et systèmes de détoxification de la cellule est perturbée de manière continue, et on parle alors de stress oxydatif (Rioux, 2009 ; Favier, 2003).

L'exposition aux pesticides parmi les facteurs chimiques, favorise la production des radicaux libres toxiques et expose l'organisme à un stress oxydatif évident (Hamzaoui, 2009).

Plusieurs auteurs ont utilisé des modèles animaux afin de déterminer les effets toxiques des pesticides. L'évolution de ces modèles expérimentaux contribue à réduire l'incertitude en analyse de risque relative aux faibles doses de pesticides, tant pour les travailleurs que pour la population générale. Des données épidémiologiques et expérimentales ont prouvé que le mancozebe, fongicide de la famille des dithiocarbamètes cause des effets néfastes sur de divers systèmes comprenant le système reproducteur, endocrinien, immunitaire et système nerveux central. Chez les souris, le mancozebe induit la mort des embryons, affecte la morphologie des cellules somatiques des follicules ovariennes et altère le taux de fertilisation même lorsqu'il est utilisé à faible concentration (Tsang et Trombetta, 2007).

Rai et al. (2009) ont testé le cartap et le carbofuran chez les rats. Ces pesticides ont provoqué des changements sériques au niveau des lipides totaux, du glucose et des protéines totales.

Une autre étude sur le diméthoate, le glyphosate et le zinebe administrés aux rats pendant cinq semaines à différentes concentrations (25, 50, 100 mg/kg) montre que ces pesticides provoquent le stress oxydatif dont une diminution du glutathion réduit considéré comme un antioxydant idéal (Astiz et al., 2012). L'administration d'herbicide, altrazine aux rats wistar à une concentration de 300 mg/kg/j pendant 21 jours induit une augmentation de la catalase, de la glutathion peroxydase, de la glutathion transférase et de la superoxyde dismutase (Singh et al., 2011).

A côté de toutes ces altérations métaboliques, l'architecture tissulaire est aussi affectée par de nombreux pesticides. Le foie est l'organe le plus touché, l'intoxication se manifeste par une nécrose hépatique. La thyroïde, les testicules, les ovaires et le rein sont aussi touchés (Jacobsen et al., 2004 ; Mahadevaswami et al., 2000 ; Nebbia et al., 1995 ; Szepvolgyi et al., 1989).

L'utilisation élevée de pesticides doit donc être remise en question par la prise de conscience de leurs impacts négatifs sur la santé et doit se traduire par un renforcement progressif de la

réglementation. De plus, il est nécessaire de bien déterminer leurs effets métaboliques même à faibles doses.

Mon travail de recherche s'inscrit dans le cadre de projets nationaux en collaboration avec l'équipe de l'INRA portant sur l'évaluation du risque de la consommation des légumes contaminés par les pesticides sur l'état de santé. Comme légume, nous avons choisi pour notre étude, la pomme de terre, légume très consommé par la population Algérienne et qui est particulièrement contaminé par les pesticides.

Le but global de notre travail est de démontrer les effets néfastes de la consommation des pommes de terre contaminées par deux types de pesticides, un fongicide et un herbicide, sur le métabolisme en général en utilisant un modèle animal, le rat Wistar élevé au niveau de l'animalerie du département de biologie de l'université de Tlemcen. Les objectifs de ce doctorat sont les suivants :

1-Déterminer quelques paramètres biochimiques (glucose, cholestérol, triglycérides, créatinine, urée, protéines totales et transaminases) chez les rats wistar recevant un régime à base de pomme de terre traitée ou non par les pesticides.

2-Déterminer quelques paramètres du statut oxydant / antioxydant (protéines carbonylées, MDA, oxydation in vitro des lipoprotéines, vitamine C, glutathion, catalase, SOD)

3- Déterminer l'activité de quelques enzymes (Lipases, Lécithine cholestérol acyl transférase).

4- Déterminer la composition de quelques organes (foie, muscle, tissu adipeux, intestin).

5-Effectuer des coupes histologiques des différents organes afin de voir les perturbations structurales induites par les pesticides.

ETAT ACTUEL SUR SUJET

I. Pesticides

I.1. Définition

Le terme pesticide provient du mot « Pest » qui désigne toute espèce végétale ou animale nuisible aux activités humaines. Le terme pesticide est un terme générique utilisé pour désigner toute substance naturelle, ou synthèse, capable de contrôler, de repousser ou de détruire des organismes vivants (microorganisme, animaux ou végétaux) ou de s'opposer à leur développement.

Le vocal pesticide regroupe à la fois les produits phytopharmaceutiques destinés à un usage agricole et les biocides anciennement dénommés pesticides à usage non agricole (Vigourou-Villard, 2006).

Le décret n°94-359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques désigne par produits phytopharmaceutiques, les substances, les préparations contenant une ou plusieurs substances actives et les produits composés en tout ou en partie d'organismes génétiquement modifiés, destinés à :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action ;
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux ;
- assurer la conservation des produits végétaux ;
- détruire les végétaux indésirables ;
- ou détruire des parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

Les termes "pesticide agricole, produit antiparasitaire, produit phytosanitaire ou produit agropharmaceutique" désignent également une substance active ou une préparation commerciale constituée d'une ou plusieurs substances actives.

La substance active (anciennement appelée matière active) est la substance ou le microorganisme qui détruit ou empêche l'agent nuisible pour la culture de s'installer ou de se développer. A cette substance active sont associés dans la formulation ou juste avant le traitement un ou plusieurs formulants ou adjuvants (mouillants, solvants, anti-mousses...) qui en facilitent l'utilisation, en particulier par l'agriculteur (Even et al., 2002).

Les biocides et les produits à usage non agricole sont quant à eux classés en plusieurs groupes. Il s'agit :

- des désinfectants et produits biocides généraux,
- des produits de protection,
- des produits antiparasitaires, des autres produits antiparasitaires (produits antisalissure par exemple) (Camard, 2010).

I.2. Histoire des pesticides

La lutte chimique existe depuis des millénaires. L'usage du soufre remonte à la Grèce antique (1000 ans avant J.-C.) et l'arsenic est recommandé par Pline, naturaliste romain, en tant qu'insecticide. Des plantes connues pour leurs propriétés toxiques ont été utilisées comme pesticides (par exemple les aconits, au Moyen Âge, contre les rongeurs). Des traités sur ces plantes ont été rédigés (Ex : traité des poisons de Maïmonide en 1135). Les produits arsenicaux ou à base de plomb (Arséniate de plomb) étaient utilisés au XVI^e siècle en Chine et en Europe (Gatignol & Étienne, 2010).

La recherche et l'expérimentation de moyen apte à lutter contre les maladies des céréales, de la pomme de terre, et de la vigne, ou à limiter le développement d'insectes ravageurs ont été publiés dans des périodiques de l'agriculture du XVIII^{ème} siècle (Duval, 2009). Les propriétés insecticides du tabac étaient connues dès 1690 (Duval, 2009). En 1763, le premier essai conscient de lutte chimique a été réalisé par des arboriculteurs de Montreuil qui ont aspergé avec succès leurs pêchers envahis de pucerons avec le jus de tabac. En 1807, le sulfate de cuivre a été appliqué contre la carie du blé, et ce chlorure mercurique a été proposé pour protéger le bois. La chimie minérale s'est développée au XIX^e siècle, fournissant de nombreux pesticides minéraux à base de sels de cuivre. Les fongicides à base de sulfate de cuivre se répandent, en particulier, la fameuse bouillie bordelaise (mélange de sulfate de cuivre et de chaux) pour lutter contre les invasions fongiques de la vigne et de la pomme de terre, non sans séquelles de pollution sur les sols (cuivre non dégradable). Des sels mercuriels sont employés au début du XX^e siècle pour le traitement des semences (Duval, 2009). Autour de 1920, les insecticides arsenicaux ont vu une utilisation intense, et on s'aperçut que les fruits et légumes traités recélaient les poisons à des doses qui pouvaient être mortelles pour les consommateurs. Ces données ont poussé les scientifiques à chercher d'autres produits moins dangereux (Duval, 2009). L'ère des pesticides de synthèse débute vraiment dans les années 1930, du pouvoir insecticide des thiocyanates d'alkyle et d'autres produits comme l'anilide salicylique en 1931 et les dithiocarbamates en 1934 (Duval, 2009). En 1874, Zeidler synthétise le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), dont Muller en 1939 établit les propriétés insecticides. Le DDT est commercialisé dès 1943 et ouvre la voie à la famille des organochlorés. Le DDT a dominé le marché des insecticides jusqu'au début des années 1970. En 1944, l'herbicide 2,4 D, copié sur une hormone de croissance des plantes et encore fortement employé de nos jours, est synthétisé. La seconde guerre mondiale a généré, à travers les recherches engagées pour la mise au point de gaz de combat, la famille des organophosphorés qui, depuis 1945, a vu un développement considérable, notamment pour certains comme le malathion.

Durant 1950-1955, aux États-Unis, les herbicides de la famille des urées substituées (linuron, diuron) sont développés, suivis peu après par les herbicides du groupe ammonium quaternaire et triazines.

Les fongicides du type benzimidazole et pyrimides datent de 1966, suivis par les fongicides imidazoliques et triazoliques dits fongicides IBS (inhibiteurs de la synthèse des stéroïdes) qui représentent actuellement le plus gros marché des fongicides.

Dans les années 1970-80, une nouvelle classe d'insecticides, les pyréthrinoïdes apparaît, dominant le marché des insecticides.

A partir des années 90, le grand nombre de produits commercialisés et les exigences réglementaires (homologation, normalisation, etc) rendent la compétition entre les industries phytosanitaires de plus en plus sévères. Les industriels préfèrent axer leurs efforts sur la vente d'un seul produit optimisé pour un usage bien ciblé plutôt que de se lancer dans la fabrication simultanée d'autres produits.

Pour cette raison, les recherches sont actuellement de plus en plus orientées vers le perfectionnement des méthodes d'analyse de résidus pour la surveillance et le contrôle de la qualité des eaux et des aliments, et à la protection de la réhabilitation de l'environnement et des ressources naturelles (Gatignol et Étienne, 2010).

I.3. Classification des pesticides

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité. Leur classification est complexe (Tableau 1).

D'une manière générale, ils peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la principale substance active qui les compose (Bencheikh, 2010). Le premier système de classification repose sur le type de parasite à contrôler. Il existe principalement trois grandes familles chimiques qui sont :

- ✓ **Les herbicides** : représentent les pesticides les plus utilisés dans le monde. Ils sont destinés à éliminer les végétaux entrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance.
- ✓ **Les fongicides** : permettent quant à eux de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou encore des bactéries.
- ✓ **Les insecticides** : sont utilisés par la protection des plantes contre les insectes. Ils interviennent en éliminant ou en empêchant leur reproduction.

Outre ces trois grandes familles de pesticides, différentes familles peuvent être citées comme par exemple :

- les acaricides, contre les acariens
- les nématicides, contre les vers du groupe des nématodes

- les rodenticides, contre les rongeurs
- les taupicides, contre les taupes
- les molluscicides, contre les limaces, et les escargots (Bencheikh, 2010).

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires. On distingue comme principales familles :

- ✓ **les organochlorés** : dont le DDT, sont efficaces contre de nombreux insectes. Un certain nombre d'organochlorés, dont l'hexachlorobenzène et le pentachlorophénol, a été utilisé principalement comme fongicide et antimicrobien. Tous les chlorophénols ont été employés comme biocides et certains d'entre eux pour la production de produits phytosanitaires. Ces produits chimiques ont été introduits dans les années 1940 et beaucoup de leurs utilisations ont été limitées en raison de leur persistance dans l'environnement (Fréry et al., 2011).
- ✓ **organophosphorés** : Le développement des organophosphorés en tant que pesticides date du début des années 1970 comme alternative aux composés organochlorés comme le DDT, persistant dans l'environnement et l'organisme humain. Les organophosphorés se sont imposés rapidement par leur grande efficacité notamment contre les insectes (Fréry et al., 2011).
- ✓ **les organoazotés** : principalement utilisés comme herbicides (Exemple : atrazine, simazine, etc...).
- ✓ **les pyréthrinoides de synthèse ou encore de carbamate**

Se sont les propriétés chimiques de ces molécules et de leurs formulations en spécialités qui leur apportent une capacité de lutte contre les ennemis des cultures (Momas et al., 2004).

I.4. Utilisation des pesticides

Les pesticides sont devenus omniprésents dans notre société moderne. Actuellement, leur application se généralise de plus en plus, ils sont utilisés principalement en agriculture pour la protection des cultures. Leur emploi est massif, ce qui génère des pollutions généralisées des écosystèmes. L'homme peut également être exposé aux pesticides, soit directement lors de l'utilisation, soit indirectement, par la présence de résidus dans les différents milieux (air, eau et sol) et dans l'alimentation (Camard, 2010 ; Bouziani, 2007).

Toutefois, les pesticides sont aussi utilisés pour des usages non agricoles, dans des zones dites non agricoles (ZNA), afin de lutter notamment contre des espèces végétales jugées envahissantes pour des raisons de sécurité (infrastructures de transport) ou d'aménagements paysagers (parcs et jardins) (Camard, 2010).

Les pesticides peuvent aussi servir à la protection des animaux d'élevage contre certains organismes nuisibles (Tellier, 2006).

L'usage de ces produits est en constante augmentation à travers tous les pays du monde. Selon les constations des experts mondiaux, la demande en pesticides est telle que leur quantité de production double pratiquement tous les dix ans depuis 1945 (Bouziani, 2007).

Il faut reconnaître que l'augmentation de la production est très prioritaire pour une majorité des régions du monde et cela ne peut pas être satisfait sans l'usage de pesticides. L'étude de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture indiquait que la production mondiale des nourritures devra être doublée au début de l'année 2000, si on veut satisfaire à la population mondiale croissant surtout dans les pays en voie de développement (FAO, 1992). Au niveau mondial, la valeur marchande des pesticides est de l'ordre de 32 milliards dollars, dont 3 milliards pour les pays en voie de développement (FAO).

Au Québec, le secteur de la production végétale agricole occupe la plus grande part du marché des pesticides vendus au Québec, soit 79,1% des ventes totales en 2001, ce qui correspond à 2591716kg d'ingrédients actifs vendus. Parmi les pesticides agricoles vendus en 2001, 59% étaient des herbicides, 17% des fongicides et 12,6% des insecticides (Gorse, 2005).

I.4.1. Pesticides en Algérie

L'Algérie est classée parmi les pays qui utilisent les plus grandes quantités de pesticides. Récemment dans notre pays, l'usage des pesticides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités. Ainsi environ 400 produits phytosanitaires sont homologués en Algérie dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs (Bordjiba et Kétif, 2009).

Tableau 1. Classification des principales familles chimiques de pesticides (données issues de l'ACTA, 1999) (Even et al., 2002).

INSECTICIDES	FONGICIDES	HERBICIDES	PRODUITS DIVERS
organophosphorés	carbamates	phénols nitrés	nématicides
organochlorés	dérivés du benzène	benzonitriles	rodenticides
carbamates	dérivés du phénol	diphényl éther	taupicides
pyréthrinoïdes de synthèse	phénylurées	phythormones	corvifuges-
carbinols	quinones	carbamates	corvicides
sulfones et sulfonates	dicarboximides	dérivés de l'urée	molluscicides
amidinohydrazones	amines, amides	diazines et triazines	répulsifs d'oiseaux et de gibiers
carbamyl triazoles	diazines	triazinones	substances de croissance
chloronicotiniles	sulfamides et dérivés soufrés	imidazolinones	divers
formamidines	guanidines	amides	
norpyréthrates	hétérocycles	ammonium quaternaires	
phénylpyrazoles	soufrés	toluidines	
thiadiazines	triazoles	triazoles	
insecticides	fongicides divers	amino phosphonates	
perturbateurs de mue	produits d'origine minérale	dérivés de l'acide benzoïque	
acaricides divers	soufre et cuivre	dérivés phtaliques	
produits d'origine biologique		dérivés picoliniques	
		dérivés de l'oxadiazole	
		dérivés du benzofuranne	
		cyclohexane diones	
		oximes	
		sulfonylurées	
		benzimidés	
		aryloxyphenoxypropionates	
		herbicides divers	

L'utilisation des pesticides fournit des avantages incontestables en augmentant la production agricole. Cependant des résidus de pesticides peuvent être retrouvés dans les aliments et constituent un risque potentiel pour les consommateurs.

L'association Algérienne pour la protection de l'environnement tire la sonnette d'alarme « L'Algérie est un grand consommateur de pesticides : 30000 tonnes sont épandues chaque année (Amine, 2009)

I.5. Pesticides et santé

Les pesticides sont conçus pour tuer les organismes nuisibles, mais certains pesticides peuvent également avoir des effets néfastes sur la santé des humains.

La probabilité de subir des effets néfastes sur la santé dépend du type de pesticide et des autres produits chimiques qu'il contient, de la quantité administrée, de la durée et de la fréquence de l'exposition (Jakubowski et Trzcinka-Ochocka, 2005).

En plus, les pesticides validés sont composés d'un ingrédient actif et d'adjuvants inactifs qui vont servir essentiellement à augmenter la quantité et la rapidité de pénétration du pesticide dans les feuilles, donc à augmenter sa rapidité d'action, à élargir ses fonctions et à lui offrir une meilleure adhérence. Mais, l'efficacité de ces pesticides n'est pas tout à fait sécuritaire, car même si un adjuvant est considéré comme inactif, il peut devenir toxique selon la façon de son application (Zeljezic et al., 2006). Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme par :

- Contact cutané (contact dermique)
- Inhalation
- Ingestion (Gatignol et Etienne, 2010).

I.5.1. Les effets toxiques des pesticides

Plusieurs études de santé ont démontré les risques d'effets aigus et chroniques pour les agriculteurs exposés aux pesticides.

I.5.1.1. Toxicité aigue

Les effets liés à une intoxication aigue se produisent généralement tout de suite ou peu de temps (exposition à court terme) après une exposition significative à des pesticides (Tellier, 2006).

L'évaluation de la toxicité aigue d'une matière active sur l'homme se fait par le calcul de la DL50 sur un animal de laboratoire : rat, souris, lapin (dose létale 50%) qui est une estimation statistique du nombre de milligrammes de la substance toxique par kilogramme de poids qui va tuer 50% d'une population expérimentale. Dans ce système, l'OMS considère un pesticides extrêmement dangereux (classe Ia) ou très dangereux (classe Ib) si elle a une valeur DL50 faible.

D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), les pesticides sont classés en cinq groupes selon la valeur de leur DL50 pour les rats. Le Tableau 2 représente la distribution des pesticides en groupes et en fonction de leur toxicité pour 165 insecticides, 129 fongicides et 207 herbicides. A ce

titre d'exemple, entre les différents types des pesticides apparaît une grande différence de toxicité, il existe des produits très toxiques comme Endrin, Sistoix et parathion de DL50 entre 3 et 6 mg/kg, et des produits peu toxiques comme Captan et Salam de DL50 supérieure à 10000 mg/kg. Cette différence de toxicité existe même entre les pesticides de structure chimique proche comme le cas du parathion de DL50 de 4 mg/kg et le Sumithion dont la DL50 est de 400 mg/kg (Momas et al., 2004).

I.5.1.2. Toxicité chronique

Les intoxications chroniques constituent un véritable facteur de risque sanitaire, il s'agit d'un risque à long terme difficile à estimer car lié à la consommation répétée de doses très faibles (Multigner, 2005).

Si les effets des intoxications aiguës sont assez bien connus, les conséquences à long terme suite à des expositions chroniques le sont beaucoup moins.

D'une manière générale, l'OMS retient comme facteur influant sur la toxicité des pesticides pour l'homme, la dose, la modalité de l'exposition, le degré d'absorption, la nature des effets de la matière active et de ses métabolites, l'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme (Tron et al., 2001).

L'OMS et la FAO estiment que le nombre annuel d'intoxication par les pesticides se situe entre 1 et 5 millions (Chubilleau et al., 2011).

En plus, l'OMS estime en 1989 qu'il y'avait chaque année dans le monde un million d'empoisonnement grave par les pesticides avec 220000 décès (Gatignol et Etienne, 2010).

L'exposition chronique serait la cause de l'augmentation de certains cancers (leucémie, lymphomes non hodgkinien, sarcome et tumeurs cérébrales), de troubles de la reproduction (avortement, stérilité, infertilité masculine, malformation congénitale de l'appareil génital masculin), de troubles du système nerveux et du comportement et d'effets endocriniens (Perturbation du système hormonal, etc). Un dysfonctionnement du système immunitaire est également rapporté (Multigner, 2005).

Tableau 2. Distribution des pesticides en groupes et en fonction de leur toxicité (Momas et al., 2004).

	Groupe des DL50				
	Classe I < 5 mg/kg	Classe II < 5 mg/kg	Classe III 50-500 mg/kg	Classe IV 500- 2000mg/kg	Classe V >2000mg/kg
Insecticides	26	51	62	13	13
Fongicides	6	5	21	30	67
Herbicides	0	5	26	57	119

La toxicité de ces produits peut cependant varier beaucoup entre les groupes chimiques et à l'intérieur d'un même groupe également.

L'utilisation massive des pesticides peut comporter des risques de contamination de l'environnement, ainsi qu'un danger potentiel pour la santé des utilisateurs et pour celle de la population en général.

Des études toxicologiques ont démontré le pouvoir cancérigène chez les animaux, de pesticides tels que le dinosébe, un herbicide homologué en 1947 et retiré du marché en 1989.

Du côté épidémiologique, plusieurs études cas témoins effectuées par les Américains et les Suédois, ont souligné les liens statistiquement significatifs entre l'utilisation des pesticides et principalement les cancers du cerveau, des tissus lymphatiques et la leucémie (Godon et al., 1989).

En plus, les pesticides semblent avoir des effets sur la reproduction et sur le développement humain via la toxicité testiculaire. Plusieurs études indiquent que certains pesticides (le chlordécone, le carbaryl, le 1,2-dibromoéthylène et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) ont des effets délétères sur la fertilité masculine. Cette forme de toxicité se traduit par une baisse de la concentration des spermatozoïdes dans le sperme et par conséquent une diminution de la fertilité (Rodvall et al., 2003). Il a été effectivement mis en évidence qu'une exposition à certaines substances pouvait entraîner un dérèglement du système immunitaire (Cravedi et al., 2007 ; Anway et al., 2005).

Certains pesticides sont aussi considérés comme étant des perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire qu'ils interfèrent avec les hormones en stimulant leur action (Cravedi et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que certains pesticides ont des effets neurologiques, comme les organophosphorés et les carbamates qui sont des toxiques létaux, à action systémiques prédominante. Le mécanisme d'action principale est de bloquer la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques par inhibition des cholinestérases (Moser, 2007 ; Baldi et al., 2003; Cole et al., 1998).

Repetto et Boligo (1996) ont effectué une recherche sur les effets des pesticides sur les fonctions du système immunitaire. Ils ont noté que plusieurs pesticides communément utilisés en milieu résidentiel et agricole pourraient supprimer la réponse normale du système immunitaire humain suite à l'invasion de virus, de bactéries, de parasites et de tumeurs.

I.6. Toxicité des pesticides

Les pesticides sont des produits conçus pour lutter contre des organismes vivants, nuisibles aux productions agricoles. Leur utilisation peut conduire à la présence de résidus dans les aliments, source de risque potentiel pour l'Homme en cas d'exposition à des teneurs trop élevées (Figure 1). C'est pourquoi, les pouvoirs publics fixent pour chaque substance active une dose journalière admissible.

I.6.1. Dose journalière admise (DJA) : La DJA d'un produit chimique est une estimation de la dose de substance active présente dans les aliments ou l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée tous les jours pendant la vie entière, sans risque appréciable pour la santé du consommateur, compte tenu de tous les facteurs connus au moment de l'évaluation. Elle est exprimée en milligrammes de produit chimique par kilogramme de poids corporel (OMS, 1997).

I.6.2. Dose sans effet (DES) : Elle correspond dans les études à long terme, à la dose la plus élevée d'un produit dont l'absorption quotidienne ne provoque aucun effet décelable chez les animaux soumis à l'expérimentation.

La DSE est également exprimée en milligramme par kilogramme de poids corporel (Derache, 1986).

I.6.3. Dose de référence aigue (Arfd), établie pour les molécules présentant une toxicité à court terme qu'un individu ne doit pas dépasser au cours d'un repas ou d'une journée (Cluzeau et al., 2000).

I.6.4. La limite maximale de résidus (LMR) est fixée pour chaque substance et chaque culture, et correspond aux quantités maximales attendues, lorsque le produit phytosanitaire est utilisé selon les conditions d'emploi préconisées par la réglementation et les bonnes pratiques agricoles. C'est la concentration en résidus la plus élevée légalement acceptable pour que les denrées restent commercialisables. La LMR est généralement exprimée en mg/kg et assortie d'un délai d'emploi avant récolte (Cluzeau et al., 2000).

I.7. Mécanisme d'action des pesticides

I.7.1. classification par mode d'action des pesticides sur la plante

I.7.1.1. Les fongicides et leur mode d'action

En se basant sur leur comportement vis à vis de la plante, deux groupes principaux peuvent être distingués : les fongicides systémiques et les fongicides de contact.

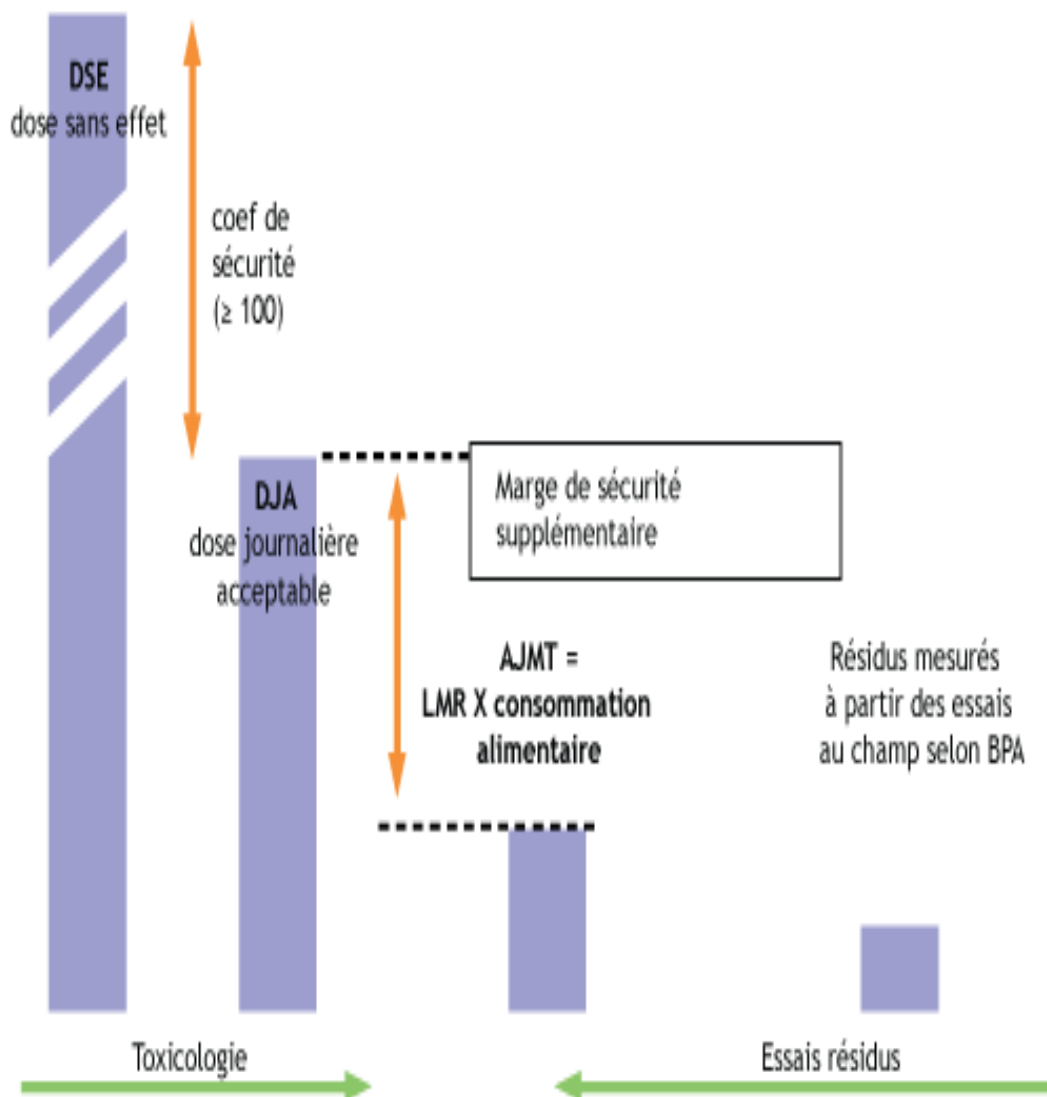


Figure 1 : Produits phytopharmaceutiques mesurés avec les niveaux de sécurité fixés par la réglementation (Source : UIPP) (Cluzeau et al., 2000).

AJMT : Apport journalier maximal toléré ; **LMR** : Limite maximale de résidus ;

BPA : Bisphénol A.

✓ **Fongicides de contact**

Un fongicide de contact lorsqu'il est appliqué à la surface de la plante forme une barrière protectrice qui est toxique pour la germination des spores ou pour le mycélium du champignon responsable de la maladie. Les composés chimiques ne pénètrent pas dans les tissus de la plante (Carisse, 2013).

✓ **Fongicides systémiques**

Les fongicides systémiques sont ceux qui pénètrent et se déplacent dans la plante par les vaisseaux du xylème et du phloème. La plupart des nouveaux fongicides sont dans cette catégorie. Trois variations sont cependant à signaler

✓ **Les fongicides systémiques partiels** ou locaux, appelés aussi fongicides pénétrants, entrent dans la plante, mais ne peuvent pas se déplacer très loin. La plupart sont limités à des mouvements translaminaires lorsqu'ils se déplacent de la face supérieure d'une feuille vers la face inférieure. Ils peuvent aussi se diffuser vers le bord des feuilles.

✓ **Les fongicides à systémie ascendante** peuvent pénétrer dans la plante et se déplacer considérablement de façon ascendante dans les vaisseaux du xylème. S'ils sont appliqués au niveau des racines, ils se déplaceront vers le haut à travers toute la plante. S'ils sont appliqués sur le feuillage, ils se déplaceront vers les marges des feuilles.

✓ **Les fongicides à systémie descendante** peuvent être appliqués sur les feuilles et ils descendront vers les racines. Cependant certaines molécules à systémie descendante, comme le metalaxyl ne se déplacent que légèrement vers les racines (Carisse, 2013).

I.7.1.2. Les herbicides et leur mode d'action

✓ **Les herbicides de contact foliaires** : ils agissent à la surface de la plante par destruction des parties aériennes et brûlures " chimiques " de celles-ci. Leur action est curative sur les plantes levées. La repousse est possible à partir des racines non détruites par le produit.

✓ **Les herbicides systémiques foliaires** : ils pénètrent dans la plante par les feuilles, sont transportés par la sève à toute la plante. Ils ont une action curative sur les plantes levées lors du traitement. Ils détruisent l'ensemble de la plante (INRA – Cemagref, 2005).

✓ **Les herbicides systémiques à pénétration racinaire** : ils sont absorbés par les racines à partir du sol et migrent dans toute la plante. Ils ont une action à la fois curative sur les plantes en place lors du traitement et préventive puisque le produit reste actif dans le sol, empêchant la repousse de nouvelles plantes (INRA – Cemagref, 2005).

✓ **Les herbicides antigerminatifs** : ils sont absorbés par les graines et leurs radicules et empêchent la croissance des plantules par action préventive avant la levée.

I.7.2. classification par mode d'action des pesticides sur les parasites

I.7.2.1. Les fongicides et leur mode d'action

Les fongicides ont des modes d'action très diversifiés, et agissent selon deux voies principales. L'une est à action directe sur les parasites et l'autre nécessite l'intermédiaire des plantes-hôtes pour transformer les fongicides en composés phytotoxiques.

✓ **Fongicides à action directe**

Les fongicides à action directe possèdent un (uni-site) ou plusieurs sites d'action biochimique (multi-sites), et perturbent directement le métabolisme (respiration, biosynthèses) ou la structure du cytosquelette cellulaire. Si les fongicides uni-sites inhibent la croissance mycélienne et/ou la germination des spores de champignon, les fongicides multi-sites sont cependant plus actifs sur la germination des spores que sur la croissance mycélienne. le Tableau 3 montre le mode d'action de ces fongicides (INRA – Cemagref, 2005).

✓ **Fongicides actifs par l'intermédiaire de la plante hôte : stimulateurs des défenses naturelles**

Ces fongicides ont pour propriété de stimuler les défenses de la plante à traiter.

Au cours d'un cycle d'infection, les champignons sécrètent des protéines phytopathogènes telles les éliciteurs. En réponse à cette agression, la plante déclenche plusieurs mécanismes de défense, dont l'induction de phytoalexines, lesquelles inhibent la croissance de ces pathogènes (INRA – Cemagref, 2005).

I.7.2.2. Les herbicides et leur mode d'action

On distingue la aussi un très grand nombre de mécanismes d'action, plus d'une vingtaine, détaillés par le WSSA (Weed Science Society of América) ou par le HRAC (Herbicide Resistance Action Committee's) et que nous avons synthétisé dans le Tableau 4.

I.7.2.3. Les insecticides et leur mode d'action

Les mécanismes d'action des insecticides sont donnés dans le Tableau 5.

Tableau 3 : les différents modes d'action des fongicides (INRA – Cemagref (2005).

Mécanisme d'action	Familles	Exemples de Substances
Action sur les mitoses et la division cellulaire		
inhibition des microtubules	Benzimidazoles	Carbendazime Thiabendazole
Action sur les biosynthèses cellulaires		
des lipides membranaires	Dicarboximides	Iprodione Folpel
des stérols membranaires	Triazoles	Epoxiconazole Tebuconazole
des ARN	Phénylamides	Fenpropimorphe
de la mélanine	Triazines	Anilasine
Action sur la respiration cellulaire	Strobilurines	Azoxystrobine Kresoxim-met
Actions multiples	Dithiocarbamètes	Mancozèbe Manèbe

Tableau 4 : différentes modes d'action des herbicides (INRA – Cemagref, 2005).

Mécanismes d'action	Familles	Exemples de Substances
Inhibition de la synthèse des lipides par inhibition enz ACCase	Aryloxy-ac.	Diclofop
Inhibition de la synthèse des ac.aminés des chloroplastes aa Aromatiques aa Ramifiés	Dériv. Glycine Imidazolinones Sulfonyl-urées	Glyphosate Imazapyr Nicosulfuron
Perturbation de la régulation de l'Auxine	Phénoxy Benzonitriles Ac. Pyridiniques	2,4D Dicamba Chlorpyralide
Inhibition de la photosynthèse Photosystème IIA Photosystème IIB Photosystème I	Triazines Uraciles Pyridazinones Dériv. Urée Benzothiadiazinone Dipyridyles	Atrazine Bromacile Pyrazone Diuron Bentazone Paraquat
Inhibition de la division cellulaire par blocage de la tubuline "arrêt croissance des racines" par conjugaison de l'ACoA "arrêt de croissance des pousses"	Dinitroaniline Pyridines Carbamates Thiocarbamates Chloroacétamides Acétamides	Trifluraline Dithiopyr Carbetamide Butilate Métolachlore Napropamide
Inhibition de la synthèse des pigments caroténoïdes " herbicides décolorants"	Triazoles Oxazolidines Tricétones Isoxazoles	Amitrole Clomazone Mésotrione Isoxaflutole
Perturbation des membranes cellulaires Inhibition de la Glutamine synthétase Inhibition de PPO	Ac Phosphorés Oxadiazoles Diphenyl ether	Gluphosinate Oxydiazon Aclonifen
Perturbateurs de croissance Inhibition du transport de l'Auxine Inhibition de la synthèse de la cellulose inconnu	Ac. Phtlaliques Nitriles Pyrazoliums	Naptalane Dichlobenil Difenzoquat

Tableau 5 : Différentes modes d'action des insecticides (INRA – Cemagref, 2005).

Mécanisme d'action	Familles	Exemples de substances
Action sur le système nerveux		
Récepteur Glutamate	Avermectines	Ivermectine Milbemectine
Synapses GABA	OC, Pyrazolés	Fipronil Ethiprole
Synapses Cholinergiques agonistes de l'ACH	Néonicotinoïdes	Imidaclopride Nytempyram
inhibiteur de l'ACHé	OP, Carbamates	Carbofuran Carbaryl Aldicarbe Carbosulfan
sur la transmission axonale		
ouverture du canal Na	Pyréthrines	Delthamethrine Permethrine Cypermethrine Fenvalerate
Action sur la respiration		
Inhibition du transport d'électrons dans les mitochondries		
Inhibition de la phosphorylation oxydative		
Action sur la cuticule		
Inhibition de la Chitine	Benzoylurees	Lufénuron Flufenoxuron
Perturbateurs hormonaux de la mue		
Action sur l'Ecdysone	Diacylhydrazines	Tebufenozide
Action sur l'hormone juvénile	Modif. Hormonaux	Methoprène Pyriproxifène

II. Stress oxydatif

II.1. Définition et origine

Le stress oxydant, déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense antioxydants (Dominique et al., 2002).

En effet, le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives (EOR), en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ».

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, dans l'irradiation, dans les ischémies/reperfusions suivant des thromboses. La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée (Favier, 2003).

II.2. Radicaux libres et système biologique

II. 2.1. Définition et mode de production

Un radical libre se définit comme un atome ou une molécule qui contient un (ou plusieurs) électron(s) non pairé(s), comme conséquence de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi-liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électron(s) (Berger, 2006). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les radicaux libres réagissent avec les tissus voisins causant des lésions oxydatives par extension de proche en proche, lésant les acides nucléiques, les lipides, les protéines et les hydrates de carbone (Berger, 2006). Se sont des espèces chimiques instables très réactives et possèdent un temps de demi-vie dextrement court (10^{-9} , 10^{-6}) (Tessier et Marconnet, 1995).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui joue un rôle particulier en physiologie. On distingue :

- **Radicaux primaires** dérivés de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle OH, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO).
- **Radicaux secondaires**, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

D'autres espèces dérivées de l'oxygène singlet O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives oxygénées (ERO). La formation des ERO requiert la présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre qui agissent comme des catalyseurs incontournables dans toute la chimie des radicaux libres (Figure 2).

Le métabolisme cellulaire produit, à l'état physiologique, plusieurs variétés d'ERO (Figure 3). Dans certaines conditions pathologiques, ces ERO peuvent être modulés qualitativement et quantitativement (Halliwell et Gutteridge, 1990). Tous les ERO ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l' $O_2^{\bullet-}$ constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles (Afonso et al., 2007).

La production et le métabolisme des ERO apparaissent très compartimentés et indépendants dans les différents compartiments cellulaires (Figure 4) mais le transport des ERO d'un compartiment à l'autre est possible lorsque les capacités de neutralisation de ces ERO sont dépassées. Les sources métaboliques produisant les ERO sont nombreuses : chaîne respiratoire mitochondriale, cytochromes P-450, activité de la NADPH oxydase, myéloperoxydase, NO synthase, xanthine oxydase (Figure 5) (Afonso et al., 2007).

II.2.1.1. ERO d'origine mitochondriale (Figure 6)

Lors du métabolisme oxydatif, 2 à 5 % de l'oxygène consommé est converti en radical superoxyde. Ceci est dû à des électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire et se fixent directement sur l'oxygène moléculaire (O_2).

Le radical superoxyde est peu réactif, il ne traverse pas les membranes cellulaires et il est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène lors de la réaction, catalysée par un des membres de la famille des superoxydes dismutases (SOD).

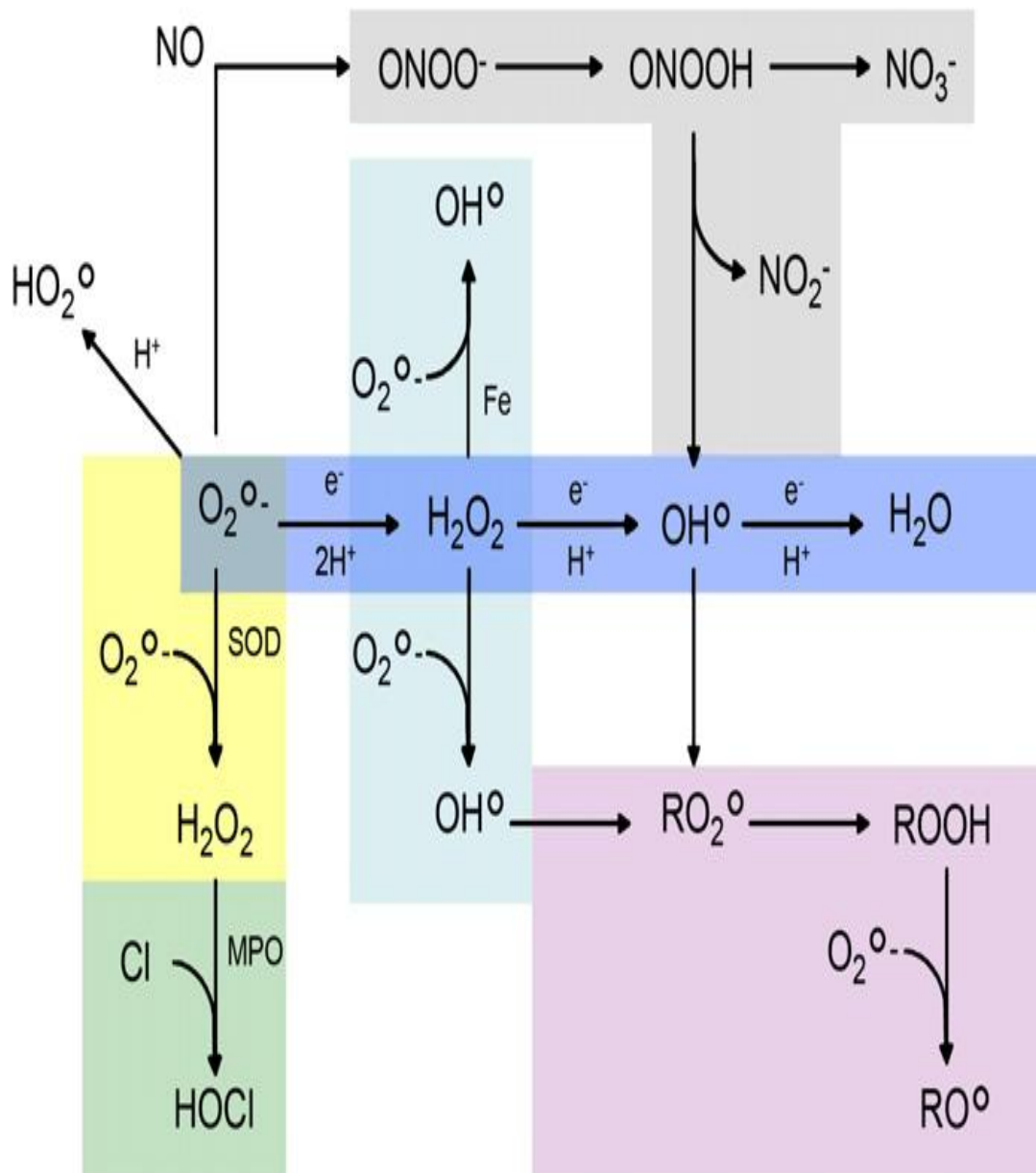


Figure 2. Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde (Kœchlin-Ramonatxo, 2006).

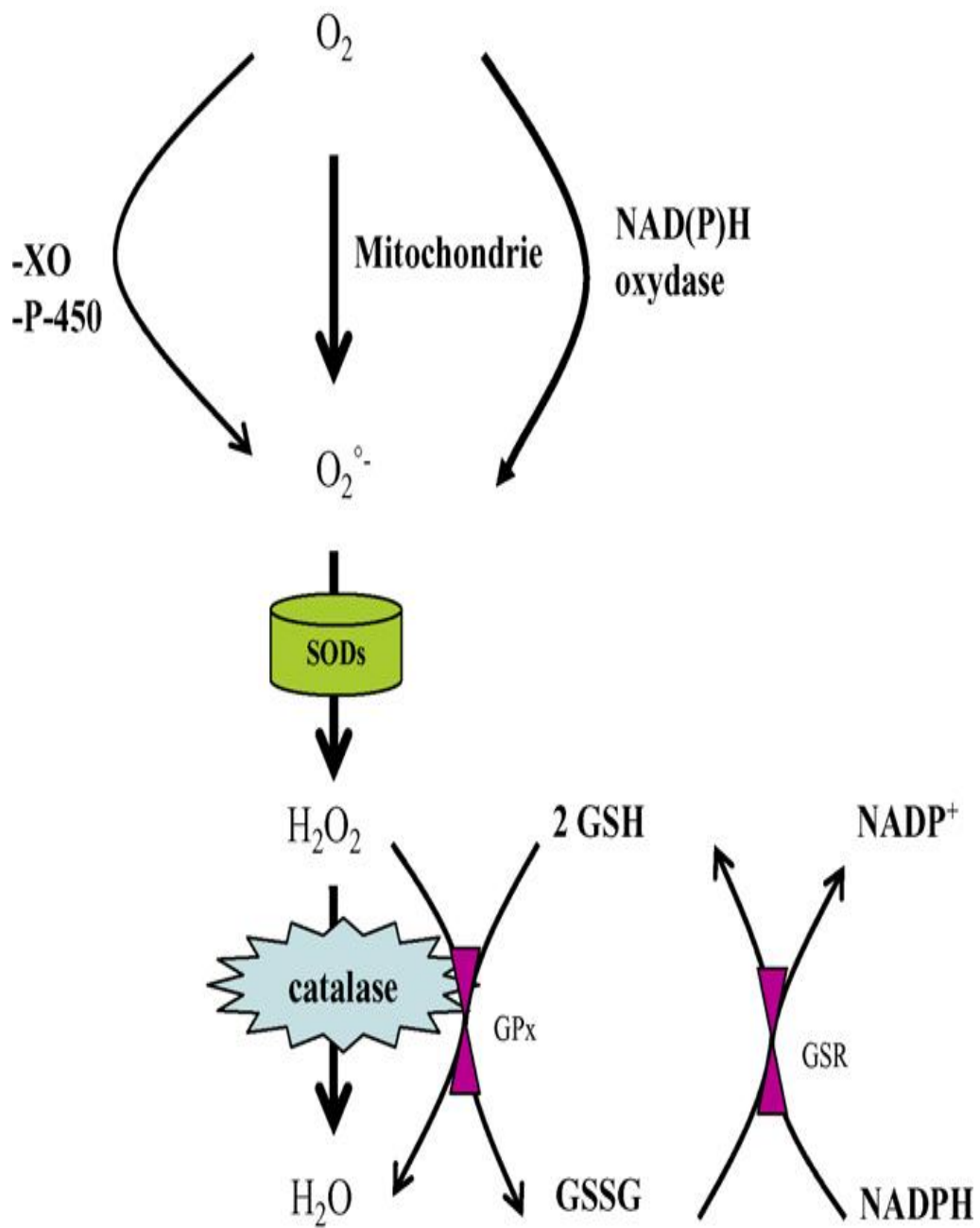


Figure 3. Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres (Afonso et al., 2007).

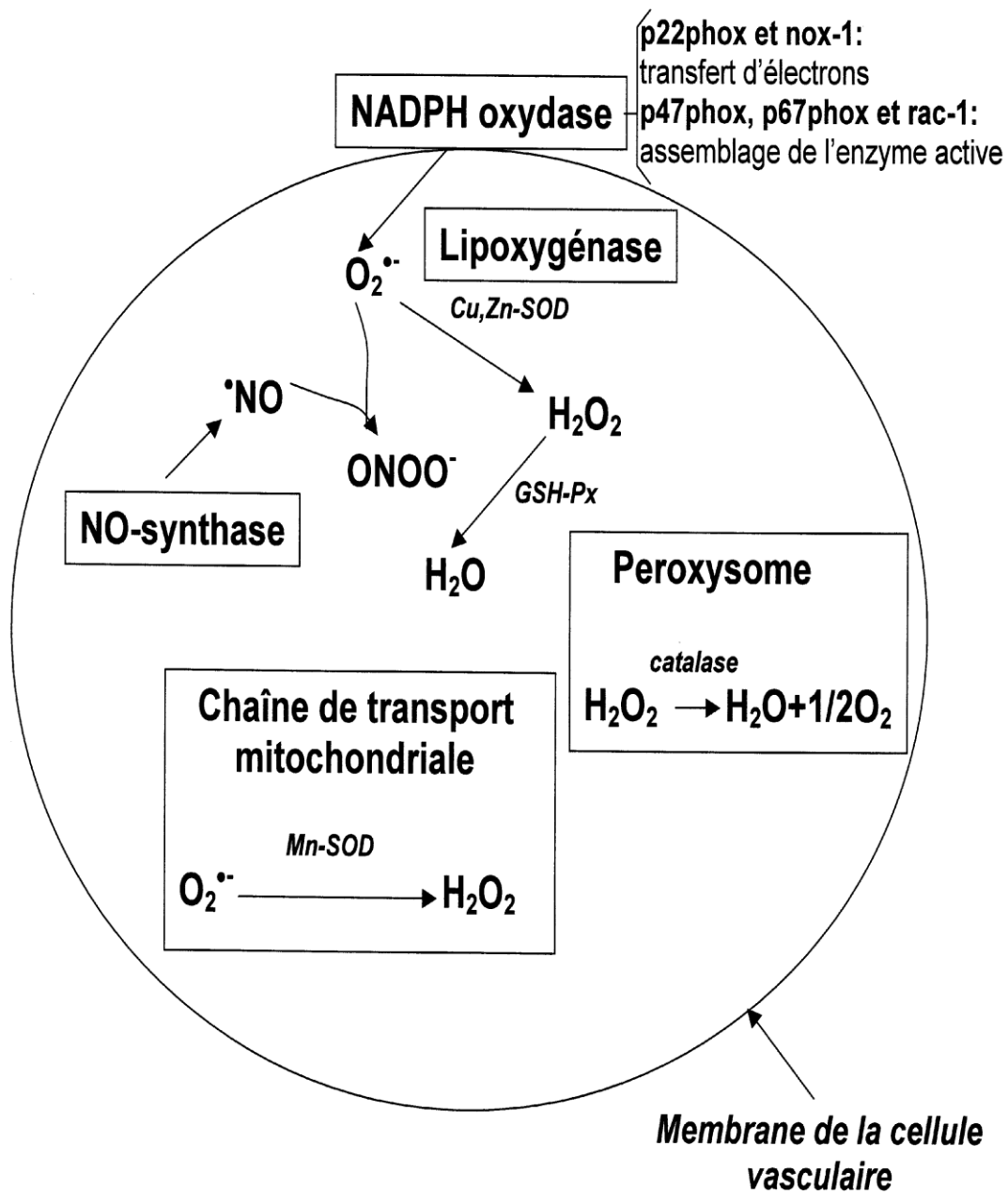


Figure 4. Principales sources d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au niveau des cellules vasculaires (Dominique et al., 2002).

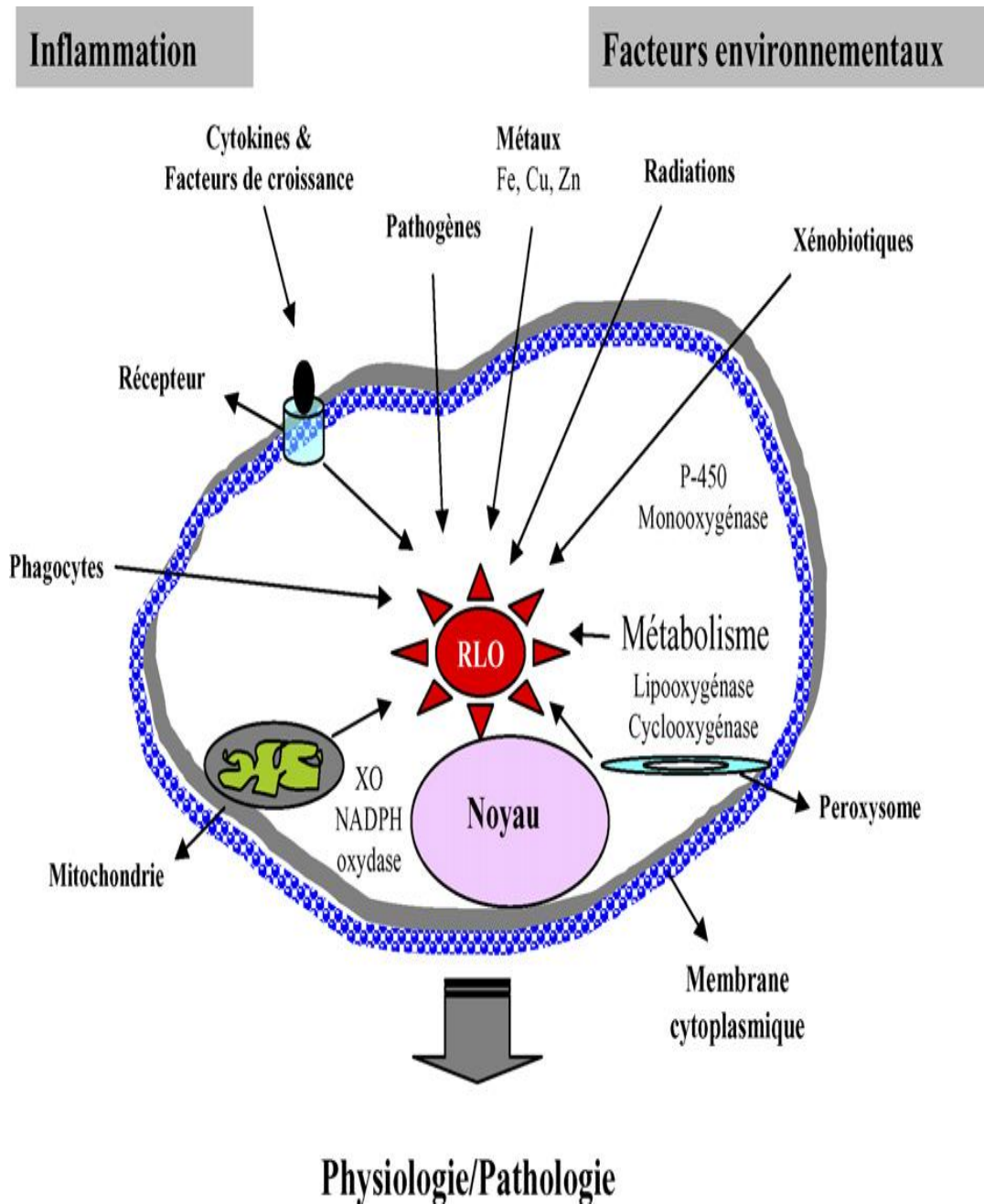


Figure 5. Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l’oxygène (Afonso et al., 2007).

Le peroxyde d'hydrogène est également peu réactif mais il a la capacité de traverser les membranes cellulaires et, en présence de métaux de transition tel que le Fe^{2+} , de se transformer en un puissant oxydant, le radical hydroxyle, selon la réaction de Fenton (Ré et al., 2005).

II.2.1.2. Autres sources d'EOR

La cessation de la fourniture d'ATP par les mitochondries entraîne une paralysie des pompes calciques (Ca^{2+} ATPase) et autorise une entrée massive de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule qui a comme conséquence l'activation d'une protéase Ca^{2+} dépendante qui assure la conversion de la xanthine déshydrogénase (XD) en xanthine oxydase (XO). Contrairement à la XD, la XO utilise l' O_2 au lieu du FAD ou du NAD^+ comme accepteur d'électrons pour former O_2 et H_2O_2 (Eschwège, 2005).

D'autres études montrent que les NADPH oxydases des cellules vasculaires constituent une source majeure d'EOR. Ces enzymes sont exprimées dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes de l'adventice et les cellules mésangiales. Leur activité peut être régulée par de multiples facteurs dont l'angiotensine II (Griendling et al., 2000), la thrombine, l'acide arachidonique et ses métabolites, des facteurs de croissance, le tumor necrosis factor (TNF α), ainsi que par des forces hémodynamiques (Dominique et al., 2002).

Les EOR pourraient donc eux-mêmes activer la NADPH oxydase par un rétrocontrôle positif, en agissant par l'intermédiaire de la libération d'acide arachidonique (Meyer et Schmitt, 2000).

Il est intéressant de souligner que les LDL, lorsqu'elles sont présentes en grande concentration, peuvent déclencher un signal de transduction responsable d'une activation directe de la NADPH oxydase, toujours via la libération d'acide arachidonique. Ce dernier est en effet capable de stimuler le recrutement et l'assemblage des sous-unités p47phox et p67phox, étape nécessaire à l'activation de la NADPH oxydase (Dominique et al., 2002).

Une étude réalisée sur des cultures de cellules épithéliales montre que l'addition d'adrénaline dans le milieu de culture s'accompagne d'une production d' O_2 après et 24 heures d'incubation (Groussard, 2006).

Proton couplé à la synthèse d'ATP

Proton non couplé

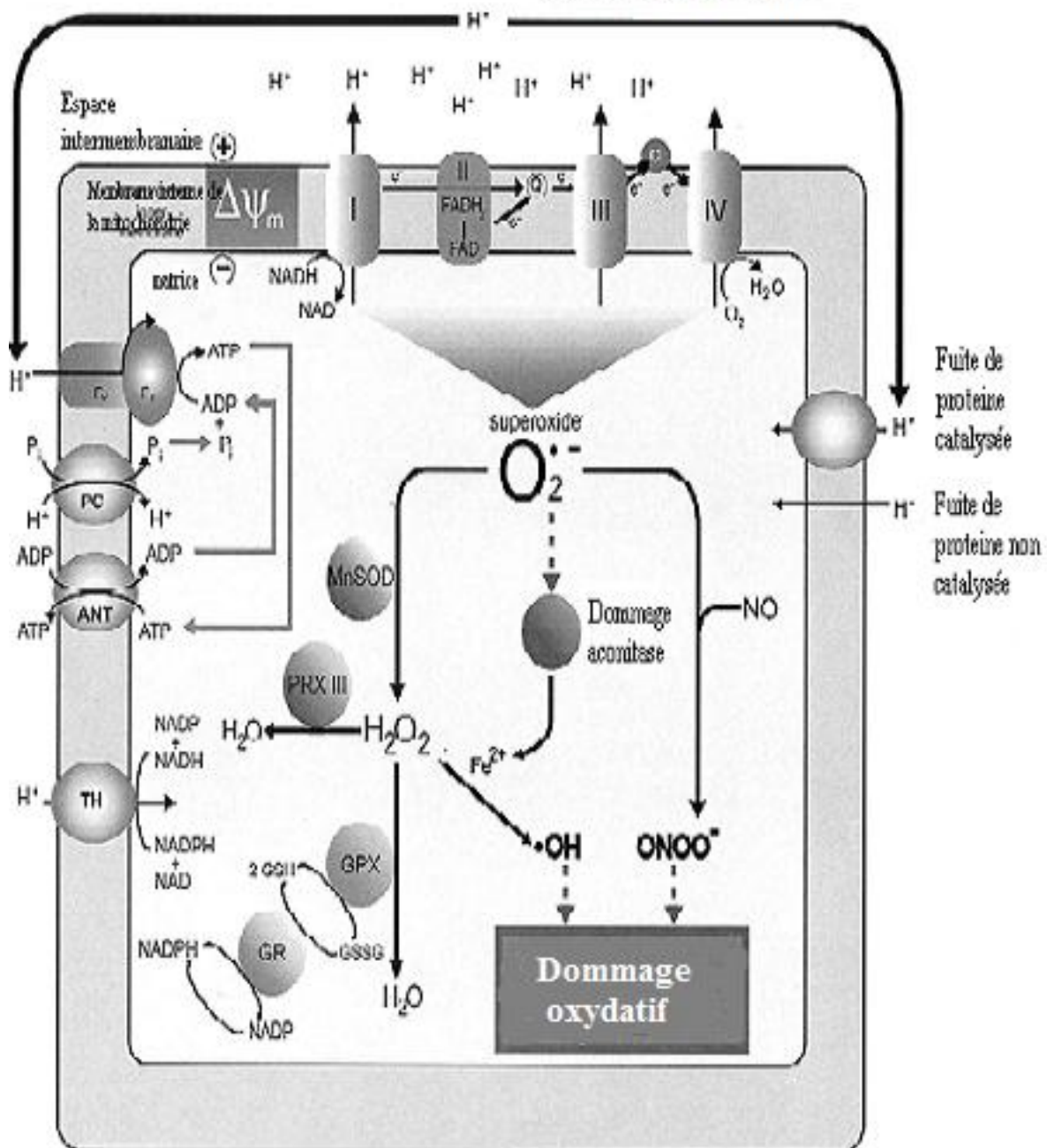


Figure 6 : La mitochondrie est la principale source d'EOR

(Ré et al., 2005).

Une autre étude in vitro montre que l'acidose est bien connue pour produire des radicaux libres par trois mécanismes. Les protons augmentent la dismutation de l' O_2 en H_2O_2 , augmentent la conversion de l' O_2 en H_2O , augmentent la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERDO) et d'espèces réactives dérivées de l'azote (ERDA) en accélérant la libération du fer par les protéines.

Les radicaux libres peuvent être d'origine exogène : produits des radiations (rayons, et lumière UV), polluants de l'air (N , NO_2), solvants organiques anesthésiques, pesticides, drogues, et xénobiotiques (Tessier et Marconnet, 1995).

Certaines cellules peuvent aussi produire le radical NO. Il est synthétisé lors de l'oxydation de l'arginine en citrulline, réaction catalysée par les NO synthétases (NOS ou nitric oxide synthases) en présence de NADPH et d'oxygène (Ré et al., 2005).

Les ions métalliques comme le fer et le cuivre sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire in vitro : ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyle ($\cdot OH$), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique (Fontaine et al., 2002).

II.2.2. Fonctions des radicaux libres

Les EOR de part leur réactivité participent à de nombreuses fonctions : phagocytose, bactéricide, signalisation cellulaire. L'exposition de fibres musculaires au H_2O_2 augmente toutes les caractéristiques de la contraction musculaire.

Les EOR participeraient également à l'amélioration du captage musculaire du glucose, et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire.

Les EOR régulent de nombreux facteurs de transcription tels que l'activator protein-1 (AP-1) et l'heat shock factor-1 (HSF-1) qui activent des gènes dits « protecteurs » pour la cellule.

En effet, ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les antioxydants ou les heat shock protein (HSP) contribuant aux processus de réparation et régénération cellulaire (Kœchlin-Ramonatxo, 2006).

En plus, les EOR participent à l'apoptose, qui physiologiquement représente un processus bénéfique qui protège contre le cancer et diverses maladies immunitaires.

Les EOR, lorsqu'elles sont formées en faibles concentrations, sont des régulateurs des voies de signalisation et de l'expression des gènes au niveau des cellules vasculaires et qu'elles jouent ainsi un rôle important dans les processus physiologiques et pathologiques de ces cellules. En effet, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et son métabolite, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sont capables d'induire des modifications fonctionnelles de multiples protéines

impliquées dans l'homéostasie vasculaire, incluant des tyrosine-kinases telles le epidermal growth factor receptor (EGF-R) (Dominique et al., 2002).

En intervenant comme seconds messagers, les EOR jouent un rôle dans le contrôle de processus cellulaires physiologiques tels que la croissance, la migration, la sénescence, l'apoptose ou la survie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses ou le développement de processus pathologiques conduisant à l'augmentation de la perméabilité et l'activation endothéliale, la réponse inflammatoire et la prolifération des cellules musculaires lisses (Figure 7) (Dominique et al., 2002).

II.2.3. Substances oxygénées réactives et leurs mécanismes d'action

Les radicaux libres sont capables d'entraîner des modifications chimiques altérant gravement les structures protéiques, lipidiques, glucidiques ainsi que les nucléotides (Tessier et Marconnet, 1995) mais aussi des lésions secondaires dues aux caractères cytotoxiques et mutagènes des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

❖ Effet sur les protéines

Les effets des EOR sur les protéines sont complexes, allant de l'oxydation du squelette protéique, c'est-à-dire de la chaîne polypeptidique conduisant à son clivage, à celle des chaînes latérales de différents acides aminés (Ré et al., 2005).

En effet, les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydrile (SH).

C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées (Favier, 2003).

Certaines protéines voient leur activité augmenter suite à une oxydation, mais la plupart deviennent inactives (Ré et al., 2005). Par exemple, les protéines sont sensibles à l'action du radical OH : celui-ci peut, en effet réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, les plus sensibles à son action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine ou celui ayant un noyau imidazole comme l'histidine, sur lesquels le radical OH s'additionne et provoque un changement de conformation de la molécule de protéine (Favier, 2003).

La molécule de lysozyme par exemple soumise à l'action du radical OH- subit une fragmentation et une agrégation.

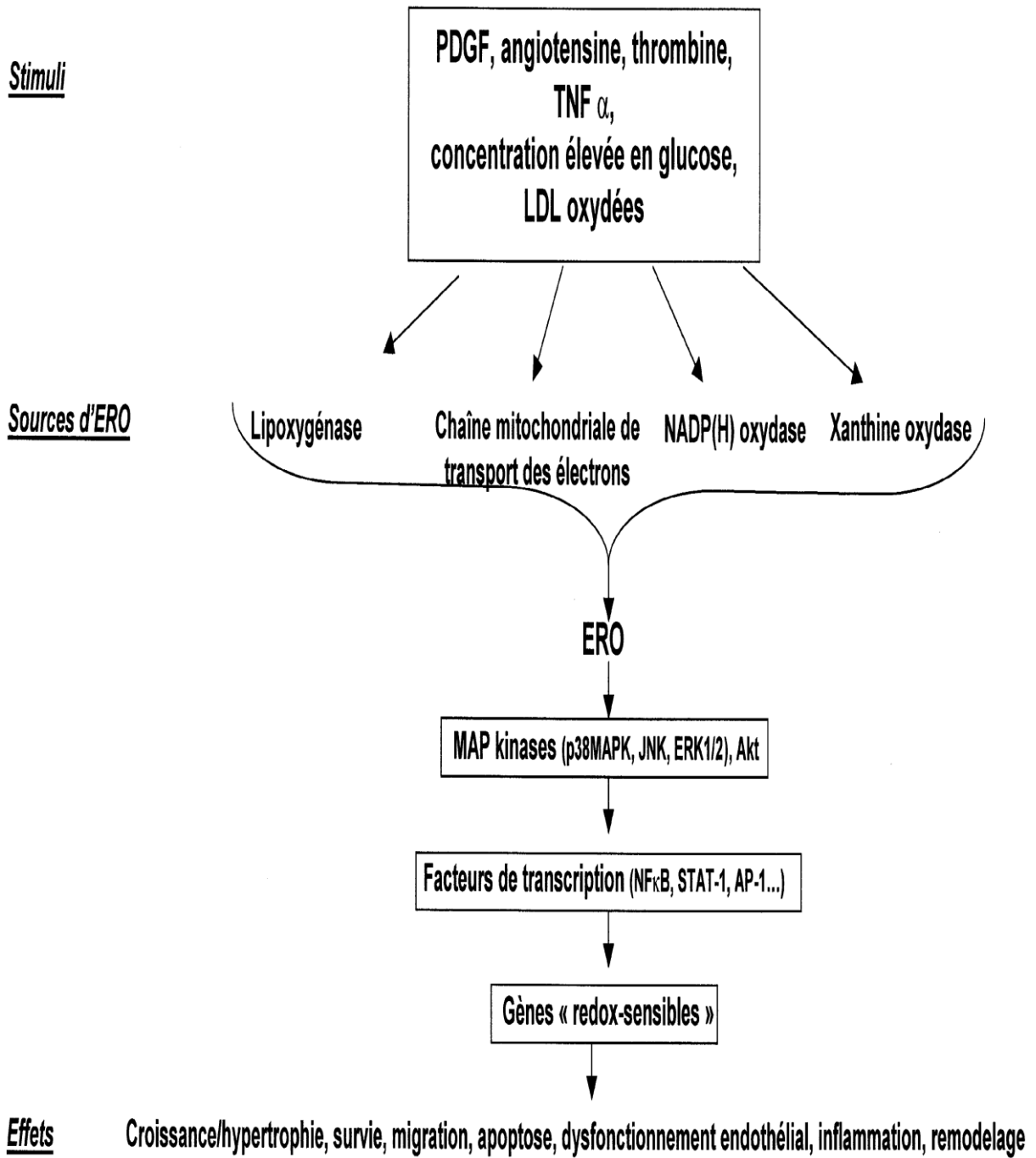


Figure 7. Sources et principales cibles des espèces radicalaires de l'oxygène modulant la croissance, la survie et l'apoptose des cellules endothéliales et musculaires lisses (Bonfont-Rousselot et al., 2002)

PDGF : Facteur de croissance plaquette dérivé.

TNF α : Facteur de nécrose tumorale.

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tel que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par OH^\cdot conduit à la formation de ponts dissulfures et donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines.

Le radical OH^\cdot est aussi capable de couper les liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques.

Le radical OH^\cdot attaque ces mêmes structures protéiques ou lipidiques dans le milieu extra ou intracellulaire entraînant la formation et le dépôt de complexe d'immunoglobulines ou de lipoprotéines oxydées.

L'anion super oxyde O_2^- s'attaque aux protéines des tissus de soutien comme le tissu conjonctif constitué de collagène (Pasquier, 1995).

❖ Effet sur les lipides

Les milieux biologiques contenant une variété d'acides gras polyinsaturés qui sont localisés préférentiellement dans leurs lipides membranaires, assurent la fluidité, mais sont particulièrement sensibles à l'attaque radicalaire par leur localisation (Pasquier, 1995). Ils sont facilement oxydables, ceci conduit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique, qui modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane et peut aussi altérer le fonctionnement des protéines membranaires (Ré et al., 2005).

La peroxydation lipidique est généralement initiée par un radical particulièrement réactif.

Le radical lipidique formé lors de cette réaction réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxy capable de transformer un autre acide gras polyinsaturé en radical lipidique, propageant ainsi la réaction de peroxydation (Ré et al., 2005).

Le radical peroxy (LOO^\cdot) peut réagir lui-même sur une autre molécule d'acide gras polyinsaturé produisant de poche en poche une peroxydation de tous les lipides membranaires (Pasquier, 1995).

L'hydroperoxyde lipidique (LOOH) formé lors de la phase de propagation de la réaction de peroxydation est relativement stable. Cependant, en présence de métaux de transition, il peut reformer de nouveaux radicaux lipidiques (LO^\cdot , radical alkoxy ou LOO^\cdot , radical peroxy).

Par ailleurs, il peut aussi se transformer en endoperoxyde, qui, en présence d'oxygène, va conduire à la formation de divers produits, dont notamment des aldéhydes, (4 hydroxynonéal, malondialdéhyde...), qui peuvent aller endommager les protéines et les acides nucléiques et dont le dosage permet de déterminer l'étendue de la peroxydation.

La réaction de peroxydation se termine lorsque deux radicaux lipidiques se rencontrent ou lorsque le radical lipidique interagit avec un antioxydant liposoluble tel que la vitamine E (Abuja et Albertini, 2001).

❖ Effets sur les glucides

En présence de métaux, l'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et des anions superoxydes (OH), et entraîner la coupure de protéines et leur glycation par attachement du céto-aldéhyde formant un dérivé de produit de glycation avancé (Wolff et al., 1989).

Par ailleurs, le glucose réagit facilement avec les groupements amines libres des protéines pour former des «produits d'Amadori». Ces derniers sont relativement instables et se dégradent en produits avancés de la glycation (AGE). Ces AGE ont un rôle essentiel dans le développement des complications du diabète.

En effet, les AGE plasmatiques se lient à des récepteurs (RAGE) présents sur les cellules endothéliales, sur les cellules glomérulaires et sur les macrophages. L'activation de ces récepteurs enclenche une production d'EOR et active le facteur de transcription NFκB. Parmi les AGE, figure la pentosidine qui résulte de la réaction de pentoses avec les protéines. Sa concentration s'élève avec l'âge, dans le diabète et dans les maladies rénales au stade terminal (Defraigne et Pincemail, 2008).

❖ Effets sur les acides nucléiques

Comme les protéines, les lipides et les glucides, l'ADN est vulnérable aux dégâts oxydatifs (Rehman et al., 1999). L'oxydation des différents constituants de l'ADN induit la formation de quatre grandes classes de lésions : les modifications des bases nucléiques, les sites abasiques, les pontages et les cassures des chaînes (simple et double brins).

Les EOR peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN, pour la transformer en 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH2DG) qui est capable d'induire des mutations spécifiques pouvant conduire au développement du cancer.

Une des lésions les plus étudiées est le 8-oxo-7,8 dihydroguanine (8-oxoGua) et son équivalent désoxyribonucléoside, le (8-oxodg), qui est capable d'induire des mutations spécifiques pouvant conduire au développement du cancer (Pincemail et al., 1998).

II. 3. Antioxydants

L'organisme dispose de système naturel de protection, mis en jeu pour lutter contre les actions agressives des radicaux libres dans des conditions métaboliques normales (Tessier et Marconnet, 1995).

Dès le début du XX^{ème} siècle, l'industrie s'est intéressée de près aux antioxydants (ou «antioxygène»), molécules capables par exemple de réduire les effets de l'oxygène sur la corrosion des métaux (Defraigne et Pincemail, 2008).

En biologie les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient

endommagées. Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources anti-oxydantes. L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques (Morena et al., 2002).

II. 3.1. Système de défense enzymatique

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces puisque les enzymes ont la propriété de savoir réaliser un travail (élimination des radicaux libres primaires) de façon permanente. Cette ligne de défense est constituée de la superoxyde dismutase, catalase et peroxydase (glutathion). Ces enzymes agissent sur les radicaux libres primaires puisqu'elles permettent la transformation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en produits non toxiques (Lacan Bionov, 2001).

❖ superoxyde dismutase

C'est une enzyme (EC 1.15.1.1) clé dans la lutte contre les radicaux libres puisqu'elle permet l'élimination de l'ion superoxyde qui est le radical libre le plus abondant (Lacan Bionov, 2001).

Les SOD transforment l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) moins réactif. La superoxyde dismutase (SOD), est une métalloprotéine présente presque tous les organismes aérobies.

Il existe quatre types de superoxyde dismutase selon les ions cofacteurs : Cuivr et Zinc, manganèse, fer et Nickel.

Chez l'être humain, il ya coexistence de trois formes de SOD. Un type de CuZn-SOD (SOD1) se trouve dans le cytoplasme, la Mn-SOD (SOD2) dans les mitochondries et un deuxième type de CuZn-SOD (SOD3) est extracellulaire (Figure 8) (Halliwell et Gutteridge, 1990).

La SOD permet d'éliminer les radicaux superoxydes mais provoque l'apparition de peroxyde d'hydrogène diffusible et dangereux à distance. La synthèse des SOD subit un rétrocontrôle négatif par les fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène. L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à moindre degré en zinc.

❖ Catalase

La catalase est une enzyme (EC 1-11-1.6) catalysant la dismutation de l'eau oxygénée : $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$.

Le peroxyde d'hydrogène est un sous produit de nombreuses réactions métaboliques. La cellule doit absolument l'éliminer au fur et à mesure qu'il se forme. Ce produit deviendrait rapidement mortel s'il s'accumulait dans la cellule. La catalase permet de le transformer rapidement en composés inoffensifs, de l'eau et l'oxygène. La catalase est une grosse protéine formée de quatre chaînes

polypeptidiques d'environ 500 acides aminés, comportant chacune un groupe hème (Delattre et al., 2005).

Ces hèmes et leur environnement protéique sont les sites actifs de cette enzyme.

Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème de la catalase réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement Fe =O hautement oxydant. Ce dernier peut ensuite oxyder une autre molécule de peroxyde d'hydrogène Pour donner du dioxygène.

Les catalases sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier. Elles sont quantitativement moins efficaces que les glutathion peroxydases (Delattre et al., 2005).

❖ **Glutathion peroxydase (GSHPx)**

Les GSHPx, enzymes antioxydants (EC 1.11.1.9) constituent une des principales lignes de défense contre les agressions produites par les radicaux libres de l'oxygène (Ducros et Favier, 2004).

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide formé de glutamate, de cystéine et de glycine.

La glutathion peroxydase est une sélénoprotéine, qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le GSH. Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Haleng et al., 2007). Cinq isoformes existent dont la localisation dans l'organisme varie. À l'intérieur des cellules, on distingue une forme cytosolique et mitochondriale (GSHPx cellulaire ou GSHPx 1) de la forme membranaire (phospholipide hydro peroxyde GSHPx ou GSHPx 4). Il existe également une forme extracellulaire, la GSHPx plasmatique (GSHPx 3) et une forme spécifique d'organe, la GSHPx gastro-intestinale (GSHPx 2). Les glutathions peroxydases sont chimiquement différentes mais partagent le même rôle détoxifiant des espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène et hydroperoxydes organiques). Elles inhibent donc la production des radicaux libres très oxydants comme le radical hydroxyle dérivé du peroxyde d'hydrogène et le radical alkoxy dérivé des hydroperoxydes organiques.

Leur activité enzymatique est directement proportionnelle à l'apport en sélénium et il existe donc un lien étroit entre carence en sélénium et stress oxydant (Ducros et Favier, 2004).

Tout comme la SOD, la glutathion peroxydase séléno-dépendante se comportera de deux façons différentes face au stress oxydant : surexpression de l'enzyme dans un premier temps puis destruction si le stress oxydant perdure de manière permanente. Une diminution de l'activité de la GSHPx peut également provenir d'un apport alimentaire trop faible en sélénium (Nève et al., 1989).

Les glutathions peroxydases assurent, en synergie avec d'autres molécules de nature enzymatique (superoxyde dismutase, catalase) ou non (vitamine E, C, caroténoïdes, groupements thiols), l'équilibre intra- et extracellulaire de la balance oxydants-antioxydants (Ducros et Favier, 2004).

❖ **Le système thiorédoxine**

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares.

L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Haleng et al., 2007).

II. 3 .2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

❖ **Vitamine C**

La vitamine C ou ascorbate est un piègeur d'ERO à spectre large, efficace contre les radicaux peroxydes, hydroxyle et superoxyde ainsi que contre le peroxinitrite. Bien que l'ascorbate soit hydrosoluble, il est capable de régénérer la vitamine E, ce qui permet de déplacer les ERO de la membrane vers le cytosol et de prévenir la peroxydation lipidique. Les formes oxydées de l'ascorbate, le semi déhydroascorbate et le déhydroascorbate, peuvent être régénérées par le GSH ou par d'autres thiols intracellulaires. L'ascorbate est également capable de réduire les métaux de transition et donc d'avoir des effets pro oxydants, notamment en favorisant la réaction de Fenton (Ré et al., 2005).

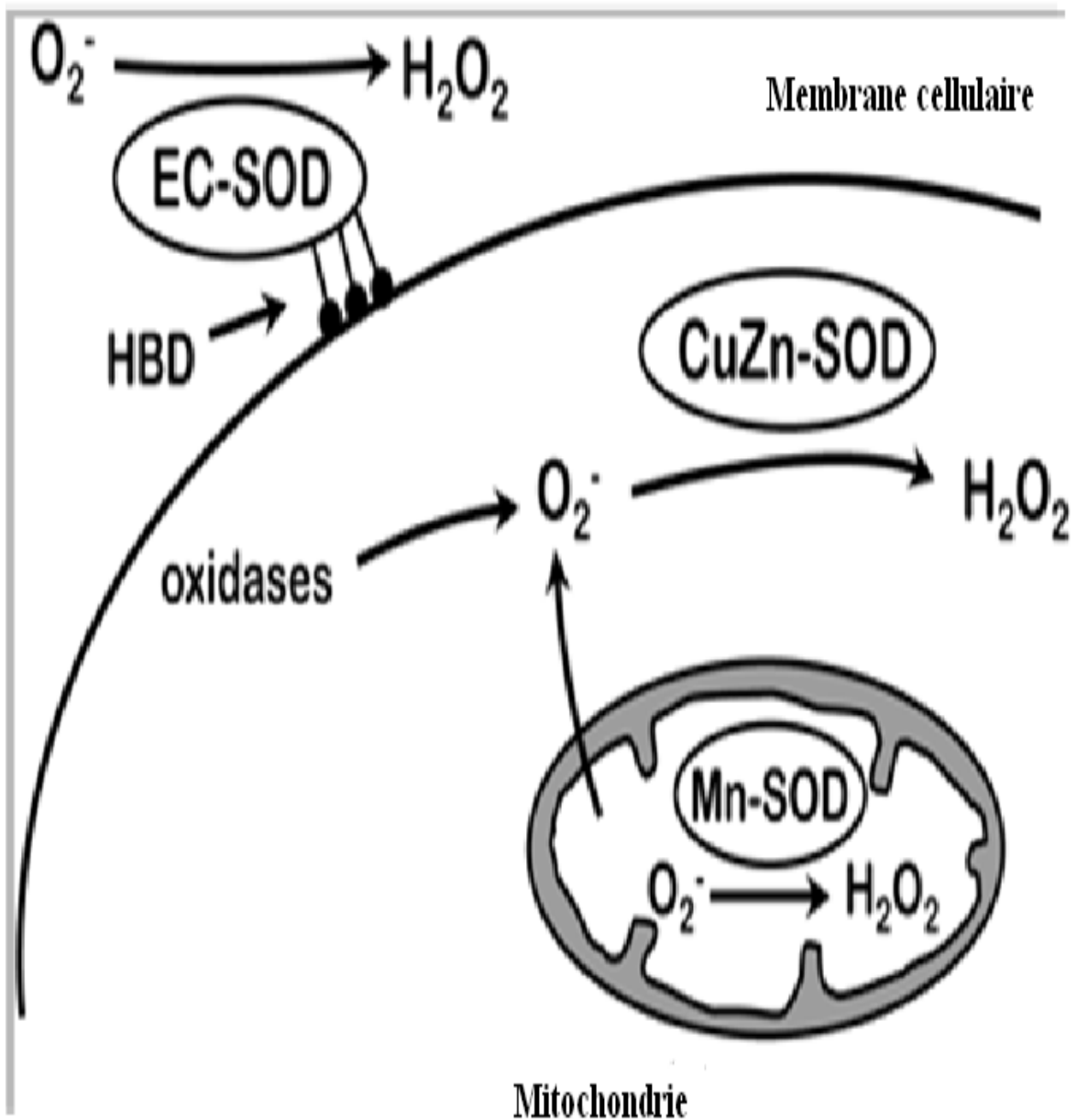


Figure 8 : Les trois types de la SOD (Faraci et Didion, 2004).

SOD : enzyme superoxyde dismutase.

EC-SOD : extracellulaire superoxyde dismutase.

HBD : domaine liant l'héparine.

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène, elle est un cofacteur indispensable à la proline et à la lysine oxydase qui interviennent dans la biosynthèse du pro collagène et sont responsables de la formation d'hélices de collagène stables. La vitamine C a un rôle de cofacteur dans la synthèse des catécholamines, notamment dans la transformation de la dopamine en norépinephrine.

La vitamine C est un des quatre antioxydants de l'alimentation avec la vitamine E, le bêta carotène et le sélénium, et participe à la dégradation des radicaux libres oxygénés, ce qui assure une protection contre les agents toxiques pour la cellule (Fain, 2004).

❖ **Vitamine E**

La vitamine E est le principal antioxydant liposoluble. Le terme vitamine E englobe différents isomères, l' α -tocophérol étant l'antioxydant le plus efficace, notamment dans la détoxification des radicaux peroxydes et alkoxydes et donc dans la prévention des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique.

Le radical tocophéroxyle formé doit être réduit pour régénérer le tocophérol et cette réduction est réalisée par d'autres antioxydants, dont la vitamine C et le GSH. En l'absence de systèmes de régénération appropriés, la vitamine E peut avoir des effets pro-oxydants. Comme autres antioxydants liposolubles, on peut citer l'ubiquinol (coenzyme Q), les caroténoïdes, la vitamine A et les flavonoïdes (Ré et al., 2005).

❖ **Vitamine A**

Appelée aussi Rétinol. C'est un aliment essentiel indispensable à de nombreuses fonctions physiologiques. Le carotène est le précurseur de la vitamine A (une molécule de carotène donne deux molécules de rétinol). Les recherches sur le mécanisme d'action de la vitamine A ont montré une similitude avec les hormones stéroïdes (Salle et al., 2002).

Le reste des antioxydants non enzymatiques est résumé dans le Tableau 6.

Tableau 6. Propriétés antioxydantes de certains composés à faibles poids moléculaires

Antioxydant	Activité antioxydante
l'acide lipoïque :	Inhibiteur de la glycooxydation [Cillard, 2006], prévention de la lipodystrophie et la neuropathie mendiée par les ERO (Schmitt et al., 2006).
L'acide urique :	Piégeur puissant des radiaux (Durackova et al., 2008): $O_2^{\circ -}$, $^{\circ}OH$, RO_2°
Le sélénium :	Nécessaire à l'activité de nombreuses sélénoenzymes antioxydantes : GPx, TRX...etc (Baskin et Salem, 1994).
Co enzyme Q :	Piégeur puissant des radiaux superoxyde et inhibiteur de la peroxydation lipidique (Kehrer, 1993).
Le glutathion :	Participant à l'activité des enzymes antioxydantes. Capture des espèces radicalaires (Durackova et al., 2008 ; Beaudeau et Dominique, 2005). $GSH + R^{\circ} \rightarrow GS^{\circ} + RH$
Le zinc :	La prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. Le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes (Baskin et Salem, 1994).
La bilirubine :	Protection des acides gras libres et de l'albumine contre l'attaque radicalaire (Beaudeau et Dominique, 2005).

MATERIEL & METHODES

I. Protocole expérimental

L'étude est réalisée sur des rats de type Wistar provenant de l'animalerie de l'université de Tlemcen (Département de biologie). L'élevage est réalisé dans une pièce éclairée 12 h par jour, et dont la température est de 25°C à 30°C et un taux d'humidité compris entre 60% et 70 %. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture.

Les rats wistar du sexe mâle et femelle âgés de 3 mois, d'un poids corporel compris entre 200-250 g ont été choisis pour notre étude. Tous les rats reçoivent leur régime standard et l'eau potable à satiété.

I. 1. Choix des pesticides

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

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

Afin de mimer l'exposition des consommateurs aux pesticides, nous avons choisi de tester des doses faibles correspondant à la dose sans effet (DES) et à la dose létale 50 divisée par 100 (DL50/100) (ECH, 2006; 2009).

I.2. Préparation des solutions des pesticides

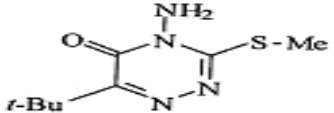
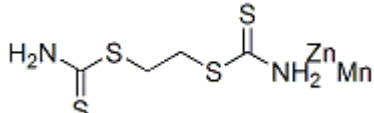
Les deux pesticides, mancozebe et métribuzine, ont été obtenus de l'Institut National d'Agronomie Algérien (INRA) qui se trouve à Sidi Bel Abess. La structure chimique et le poids moléculaire de chacun des deux pesticides sont donnés dans le Tableau 7.

Les pesticides (métribuzine, mancozebe) sont solubilisés dans 1 ml de l'huile de tournesol et sont incorporés au régime selon le poids corporel du rat à deux doses différentes : dose 1 (D1) qui correspond à la dose sans effet (DES) et la dose (D2) qui correspond à la dose létale 50 divisée par 100 (DL50/100) (ECH, 2006 ; 2009).

I.3. préparation des régimes

La pomme de terre utilisée, non contaminée par les pesticides, provient d'une petite ferme de la région de Ghazaouet.

Tableau 7 : Propriétés physicochimiques des deux pesticides utilisés (ECH, 2006 ; 2009)

	Métribuzine	Mancozebe
Fonction	herbicide	Fongicide
Numéro CAS	21087-64-9	8018-01-7
Formule brute	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	(C ₄ H ₆ MnN ₂ S ₄) x(Zn) y
Nom chimique	4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-méthylthio-1,2,4-triazin-5-one	Ethylenbis (dithiocarbamate) de manganèse (polymérisé), complexe avec le se du zinc
Famille chimique	Triazine	Dithiocarbamate
Structure chimique		
Etat physique	Poudre	Poudre
Couleur	Blanc	Gris jaune
Matière active	métribuzine	moncozebe
poids moléculaire (g/mol)	214,3	271.3
solubilité dans l'eau à 20°C (g/l)	1.05	Insoluble

Les pommes de terre sont bouillies dans l'eau à une température de 100°C pendant 15 minutes. Après cuisson, la pomme de terre est écrasée afin d'obtenir une purée. Cette purée est mélangée au régime ONAB standard additionné d'huile de tournesol (1 ml pour 7g purée et 7g ONAB). Ce mélange constitue le régime Pomme de terre Témoin. Le Tableau 8 montre la composition du régime pomme de terre témoin. Concernant les régimes expérimentaux, contaminés par les pesticides, 7 g de purée de pomme de terre sont mélangés à 7 g de régime ONAB et 1 ml d'huile contenant les pesticides testée aux doses DES et DL50/100.

Les différents lots de rats sont ainsi répartis comme suit :

- un lot témoins de rats qui consomment le régime purée de pomme de terre témoin.
- Deux lots expérimentaux de rats qui consomment le régime purée de pommes de terre traitée par la métribuzine, à deux doses, la DES: 1,3 mg/kg/j et la DL50/100: 13 mg/kg/j.
- Deux lots expérimentaux de rats qui consomment le régime purée de pommes de terre traitée par le mancozebe, à deux doses, la DES: 5 mg/kg/j et la DL50/100: 50 mg/kg/j.

Chaque matin, chaque rat reçoit 14 g de régime témoin ou expérimental. Après contrôle de la consommation de la totalité d'aliment, les rats reçoivent 20 à 30 g de régime témoin jusqu'au lendemain matin. Cette opération permet d'éviter les pertes d'aliment et de contrôler la quantité de pesticides consommés par les rats.

Ces régimes sont donnés aux rats pendant trois mois. Le poids corporel, la quantité de nourriture consommée et la quantité d'eau bue sont notés quotidiennement.

À la fin de l'expérimentation, les rats sont pesés puis anesthésiés au pentoborborital sodique 6% (0,3 ml par 300 g de poids corporel), après 12 h de jeûne. Le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale. Une quantité de sang prélevé est récupérée dans des tubes à EDTA.

Après centrifugation, le plasma est utilisé pour doser les marqueurs Redox. Le culot est récupéré, lysé avec l'eau distillée glacée et centrifugé pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant constitue le lysat érythrocytaire pour le dosage du glutathion réduit et des enzymes antioxydantes. Une autre partie est recueillie dans des tubes secs. Après centrifugation, le sérum est utilisé pour les tests biochimiques. Les organes (le foie, le muscle gastrocnémien, une partie de l'intestin et le tissu adipeux viscéral) sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 9‰, ensuite pesés. Les homogénats sont préparés par broyage des organes dans le tampon PBS (pH=7,4) et passage aux ultrasons.

Les restes des différents organes sont conservés au formol à 10% pour effectuer les coupes histologiques

Tableau 8 : la composition du régime pomme de terre témoin

	Régime témoin
Source d'énergie (g/100g)	
Protéines	14
Sucres	52
Acides gras	4
Cellulose	5
Vitamines mixtes	2
Minéraux mixtes	3
Humidité	20
Poly phénols totales (mg/100g)	64
β carotènes (mg/100g)	1
α Tocophérol (mg/100g)	5
Vitamine C (mg/100g)	303
Composition en acides gras (% acide gras)	
AGS	30
C18:1 n-9	12
C18:2 n-6	45
C18:3 n-3	8
C20:4 n-6	4

AGS : Acides gras saturé. La composition du régime pomme de terre témoins est analysée au niveau d'un laboratoire privé (GETALAB, Tlemcen, Algérie). Les acides gras polyinsaturés dont la teneur est faible, ne sont pas présentés (<0,5%).

II. Dosage des paramètres biochimiques

II.1. Détermination des teneurs en glucose

Le dosage du glucose sérique est réalisé par méthode enzymatique colorimétrique (Kit SIGMA). En présence de la glucose-oxydase, le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de la peroxydase et du phénol, oxyde un chromogène (4-aminoantipyrine) incolore en un colorant rouge à structure quinoneimine. L'absorption est mesurée à 505 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose.

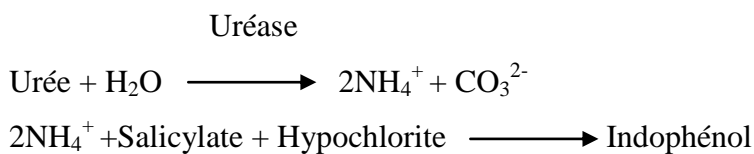
II.2. Détermination des protéines totales sériques

Les protéines totales sériques sont dosées par la méthode colorimétrique de Biuret (Kit BIOLABO S.A, France). Les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec Cu^{2+} en solution alcaline pour former un complexe coloré dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration en protéines. L'absorption est mesurée à 550 nm.

Le réactif Biuret contient du sodium potassium tartrate qui complexe les ions cuivriques et maintient leur solubilité en solution alcaline

II.3. Détermination des teneurs en urée

L'urée sérique est dosée par méthode colorimétrique et enzymatique (Kit BIOASSAY System, CA). La réaction consiste en une réaction enzymatique couplée à une réaction colorée



L'uréase hydrolyse l'urée en produisant de l'ammonium (NH_4^+). Les ions ammonium réagissent en milieu alcalin avec du salicylate et de l'hypochlorite pour former un indophénol coloré en bleu. La coloration est catalysée par le nitroprusiate, et la lecture se fait à 600 nm.

II.4. Détermination des teneurs en créatinine

La créatinine sérique est dosée par méthode cinétique (Kit BIOASSAY System, CA). Le dosage se fait par une réaction colorimétrique (Méthode de Jaffé) de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcalin dont la cinétique de développement est mesurée à 490 nm.

II.5. Détermination de l'activité enzymatique des transaminases (TGO ou AST, TGP ou ALT)

Les transaminases permettent le transfert du groupement aminé d'un acide aminé sur un acide α cétonique. L'acide aminé est alors transformé en acide cétonique correspondant et l'acide α cétonique en acide aminé. Les deux principales réactions de transamination sont catalysées par les

transaminases glutamo-oxaloacétique (TGO) et glutamo-pyruvique (TGP). La détermination des activités enzymatiques des transaminases au niveau sanguin permet d'apprécier l'atteinte tissulaire et la cytolysse, notamment au niveau hépatique.

La méthode utilisée pour déterminer ces activités enzymatiques repose sur la réaction enzyme – substrat couplée au NADH/H⁺, selon le kit RANDOX Diagnostic (RANDOX Laboratories Ltd, Co Antrim, UK). L'enzyme transaminase catalyse le transfert du groupe amine de l'aspartate (pour la TGO) ou de l'alanine (pour la TGP) vers l'oxaloglutarate avec formation de glutamate et d'oxaloacétate (pour la TGO) ou du pyruvate (pour la TGP). Les mesures sont effectuées à l'aide de réactions couplées pour permettre l'utilisation du coenzyme NADH/H⁺ dont on mesure la diminution d'absorbance. Ainsi, l'oxaloacétate est réduit en malate ou le pyruvate en lactate grâce à des déshydrogénases (MDH ou LDH) couplées à NADH/H⁺. La vitesse d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité enzymatique des transaminases. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

II.6. Détermination des paramètres lipidiques et protéiques au niveau du sérum, des lipoprotéines et des organes (foie, muscle gastrocnémien, tissu adipeux et intestin)

II.6.1. Séparation des lipoprotéines

Les lipoprotéines totales sont isolées à partir du sérum par précipitation selon la méthode de Burstein et al. (1970,1989). A pH neutre, les poly anions, en présence de cations divalents, peuvent former des complexes insolubles avec les lipoprotéines (lipopolyanions-cations) donc la précipitation se fait grâce aux poly anions qui se combinent aux lipides des lipoprotéines. Généralement, les poly anions utilisés sont les sulfates (SO³⁻), les polysaccharides (héparine) et l'acide phosphotungstique, alors que les cations sont les Ca²⁺, Mn²⁺ et Mg²⁺. L'utilisation du même réactif de précipitation à différentes concentrations, permet de précipiter sélectivement les fractions des lipoprotéines ; et ainsi à concentration de plus en plus élevée, ce réactif permet la séparation à partir du sérum, d'abord des VLDL ensuite des LDL et en dernier des HDL. Ce principe est analogue à celui de l'ultracentrifugation en gradient de densité des lipoprotéines. En effet, lorsque la concentration varie, la densité du milieu varie aussi et permet une précipitation sélective. Les lipoprotéines, précipitées par l'acide phosphotungstique et le MgCl₂ à différentes concentrations, sont par la suite solubilisées grâce à une solution de solubilisation contenant du tampon citrate trisodique et NaCl.

II.6.2. Détermination des teneurs en cholestérol et en triglycérides

Le cholestérol total et les triglycérides sont dosés par des méthodes enzymatiques (Kit ROCHE diagnostics), sur le sérum total, les différentes fractions lipoprotéiques, et les homogénats des organes. Ces techniques sont basées sur l'utilisation d'enzymes estérases ou lipases, oxydases ou

kinases et peroxydases aboutissant à un chromogène coloré dont l'intensité de la coloration est mesurée à 500 nm.

II.6.3. Détermination des teneurs en protéines totales

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

II.6.4. Détermination des lipides totaux des organes (foie, muscle gastrocnémien, tissu adipeux et intestin).

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

III. Activités enzymatiques

III.1. Détermination de l'activité de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT, EC 2.3.1.43)

L'activité de la LCAT est déterminée sur du sérum frais, par estimation de la conversion du cholestérol sérique en cholestérol estérifié, selon la méthode de Albers et al. (1986). Le cholestérol estérifié est dosé avant et après une incubation du sérum frais à 37°C pendant 1 heure. Le cholestérol estérifié est dosé après précipitation du cholestérol libre par la digitonine (Sperry et Webb, 1950). L'augmentation des taux de cholestérol estérifié correspond à l'activité enzymatique de la LCAT qui est exprimée en nmoles de cholestérol estérifié/h/ml de sérum.

III.2. Dosage des lipases tissulaires

III.2.1. Détermination de l'activité de l'enzyme LPL (LPL, EC 3.1.1.34)

L'activité lipase est déterminée à partir du niveau d'hydrolyse des triglycérides d'un substrat synthétique en mesurant la quantité d'acides gras libérés par titrimétrie selon la technique PH – STAT (Taylor, 1985 ; Tietz et al., 1989). Une émulsion d'huile d'olive (20 mL) et de gomme arabique (16,5 g) solubilisées dans H₂O (165 mL) est préparée par sonication (3 fois 45 minutes). Le substrat synthétique contient 2,4 mL d'émulsion, 300 µl d'une solution de sérum albumine bovine (à 4% dans du tampon tris/HCl) et 300 µl de sérum humain chauffé à 56°C. 100 µL de substrat synthétique sont incubés avec 100 µL de surnageant (source enzymatique) dans 3 mL de tampon NaCl 100 mmol/L, CaCl₂ 5 mmol/L ; PH 8, à température ambiante et sous agitation pendant 5 min. Après incubation le PH du milieu (devenu acide suite à la libération des AGL) est ramené à sa valeur initiale par addition de NaOH 0,05 mol/L. Le volume de NaOH versé est alors

noté et correspond après conversion au nombre d'acides gras libérés (mol). Une unité lipase est la quantité d'enzyme qui permet la libération d'une micromole d'acide gras en une minute.

III.2.2. Détermination de l'activité de l'enzyme lipase hormono-sensible (LHS ; EC 3.1.1.3)

L'activité lipolytique est mesurée quantitativement selon la méthode décrite par Kabbaj et al. (2003). Cette activité est dosée avec l'ester *p*-nitrophényle-butyrates (PNPB), hydrolysé en présence de la lipase en *p*-nitrophénol et l'acide butyrique. La libération du *p*-nitrophénol se traduit par l'apparition d'une coloration jaune détectée à 400 nm. Les homogénats de tissu adipeux sont incubés avec le PNPB dans le tampon (0,1 M NaH₂PO₄, pH 7,25, 0,9% NaCl, 1 mM dithiothreitol) à 37°C pendant 10 minutes. La réaction est stoppée par addition d'un mélange méthanol / chloroforme / heptane (10/9/7). Après centrifugation à 800 g pendant 20 minutes, les solutions sont incubées pendant 3 minutes à 42°C. L'absorbance lue à 400 nm permet de calculer la concentration en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $12,75 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pour le *p*-nitrophénol. Une unité enzymatique est la quantité d'enzyme capable de libérer une μmole de *p*-nitrophénol par minute et par mg de protéines.

IV. Détermination du statut oxydant /antioxydant

IV.1. Dosage de la vitamine C (Jacota et Dani, 1982)

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

IV.2. Détermination des protéines carbonylées

Les protéines carbonylées du plasma et du lysat érythrocytaire (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) selon la méthode de Levine et al. (1990). La réaction aboutit à la formation de la dinitrophénylhydrazone colorée. Les concentrations des groupements carbonylés sont déterminées par lecture à 350 nm et 375 nm et calculées selon un coefficient d'extinction ($\epsilon = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$).

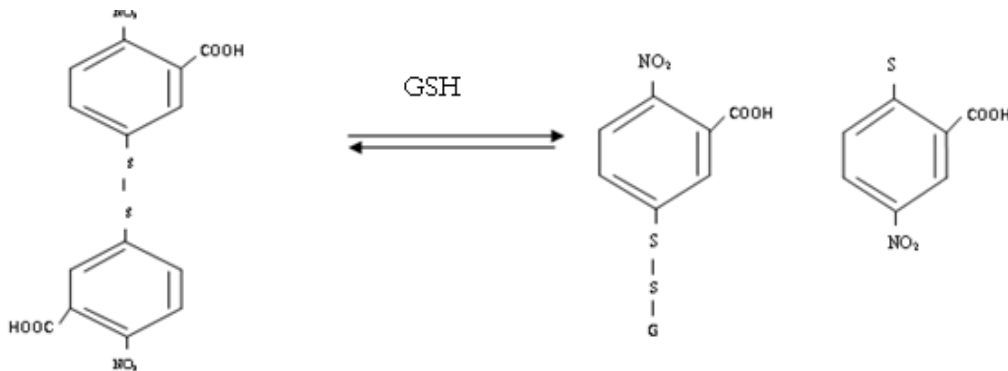
IV.3. Détermination du Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) plasmatique et érythrocytaire est mesuré selon la méthode de Draper et Hadley (1990). Il représente le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Après traitement par l'acide à chaud, les

aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en deux (2) molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à une longueur d'onde de 532 nm. La concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$ à 532 nm).

IV.4. Dosage du Glutathion érythrocytaire réduit (GSH)

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé dans le lysat érythrocytaire et les homogénats d'organes par la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB) (Ellman, 1959). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante :



DTNB

Acide thionitrobenzoïque (TNB)

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

IV.5. Dosage de l'activité de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)

Cette activité enzymatique est mesurée dans le lysat érythrocytaire par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Aerbi, 1974). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H_2O_2 en fonction du temps. La lecture se fait à 420 nm. Les concentrations du H_2O_2 restant sont déterminées à partir d'une gamme étalon de H_2O_2 avec le tampon phosphate et le réactif TiOSO_4 de façon à obtenir dans le milieu réactionnel des concentrations de 0,5 à 2 mmol/l.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique est :

$$A = \log A_1 - \log A_2.$$

A1 est la concentration de H_2O_2 de départ

A2 est la concentration de H_2O_2 après incubation (au bout de 5 min)

L'activité spécifique est exprimée en U/g Hb ou en U/ml.

IV.6. Détermination des diènes conjugués et du taux d'oxydation des lipoprotéines

L'oxydation in vitro des lipoprotéines sériques, induite par les métaux (cuivre), est déterminée par le suivi au cours du temps de la formation des diènes conjugués selon la méthode Esterbauer et al. (1989). Les diènes sont considérés comme les produits primaires de l'oxydation lipidique et présentent une absorption dans l'ultraviolet à 234 nm. L'addition du CuSO_4 (100 μM) au sérum provoque l'oxydation des lipoprotéines sériques qui se traduit par l'augmentation progressive de la densité optique à 234 nm, après une phase de latence. Cette augmentation de l'absorbance marque la formation de plus en plus importante des diènes conjugués dont la concentration est estimée en utilisant le coefficient d'extinction ($E = 29,50 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$; à 234 nm). Les variations de l'absorbance des diènes conjugués en fonction du temps permettent de tracer la courbe cinétique où trois phases consécutives sont déterminées : phase de latence, phase de propagation et phase de décomposition. A partir de cette courbe cinétique, plusieurs marqueurs de l'oxydation in vitro des lipoprotéines plasmatiques sont déterminés :

- $t(\text{lag})_{\text{min}}$ correspond à la durée de la phase de latence et marque le début de l'augmentation de la densité optique par rapport à la valeur initiale. Le $t(\text{lag})$ permet d'estimer la résistance des lipoprotéines à l'oxydation in vitro.

- Taux initial des diènes conjugués ($\mu\text{mol/l}$)

- Taux maximum des diènes conjugués ($\mu\text{mol/l}$)

- $t(\text{max})_{\text{min}}$ correspond au temps nécessaire pour obtenir l'oxydation maximale. Il marque la fin de la phase de propagation et le début de la phase de décomposition. Il se calcule sur la courbe cinétique en projetant la valeur de densité optique maximale sur l'axe des X (temps exprimé en minutes).

Le taux d'oxydation des lipoprotéines est calculé par :

$(\text{Taux maximal des diènes conjugués} - \text{Taux initial des diènes conjugués}) / (t(\text{max}) - t(\text{lag}))$.

V. Etude histologique

Après sacrifice des rats et prélèvement sanguin, le foie, le muscle gastrocnémien, le tissu adipeux, l'intestin grêle sont soigneusement prélevés, rincés avec du NaCl à 9‰, ensuite pesés. Une partie aliquote des différents organes est immédiatement introduite pendant 12 heures dans le formol à 10% permettant l'immobilisation et la fixation des structures et constituants cellulaires.

L'organe creux (intestin) est préalablement ouvert et lavé, Le foie, le muscle gastrocnémien, le tissu adipeux, sont coupés en tranches.

Les différents prélèvements effectués sont mis dans des cassettes. Le passage de chaque prélèvement dans une série de solvants organiques permet la déshydratation et la dissolution des graisses figurées intra-tissulaires. La déshydratation est une étape cruciale pour une bonne coupe

histologique par immersion dans des bains d'alcool de degrés croissants avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage, qui infiltre le tissu.

L'inclusion consiste à confectionner un bloc de paraffine pour chaque prélèvement en orientant convenablement le fragment dans le sens de la coupe.

La coupe du bloc de paraffine se fait au microtome et permet de réaliser une coupe très fine de 3 à 5 microns d'épaisseur pour chaque prélèvement. Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser le prélèvement et d'éviter les superpositions cellulaires.

La coupe est déposée et collée sur une lame en verre. De multiples coupes successives sont faites dans un même bloc. Les coupes sont déparaffinées et réhydratées. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (xylène) puis dans des alcools de titre décroissant colorés.

La coloration permet de mettre en évidence spécifiquement les différentes structures tissulaires et cellulaires. La coloration utilisée est l'hématoxyline-eosine ; qui colore le noyau en bleu et le cytoplasme en rose. Les lames sont montées et observées au microscope optique (Laboratoire anatomie histopathologie, CHU de Tlemcen).

VI. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 4.1, Statsoft, Paris, France). La vérification de la distribution normale des variables est réalisée par le test Shapiro-Wilk. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. Effets de la métribuzine et du mancozebe sur le métabolisme

I.1. Evaluation du poids corporel, consommation alimentaire et apport énergétique

I.1.1. Poids corporel et apport alimentaire chez les rats témoins et traités par la métribuzine (Tableau 9)

Au cours de la période d'expérimentation (3 mois), le poids des rats (mâles et femelles) est noté quotidiennement le matin à la même heure. Au début de l'expérimentation (J0), les différents lots de rats mâles et femelles ont des poids homogènes, variant de 180 à 220 g. Quelque soit la dose de la métribuzine testée (D1 = 1,30 mg/kg/j et D2= 13 mg/kg/j), les poids corporels chez les rats mâles et femelles sont significativement différents à J90. En effet, les rats expérimentaux mâles et femelles présentent une diminution hautement significative ($p < 0,0001$) du poids corporel comparé à celui des rats témoins. La diminution du poids corporel est d'autant plus importante que la dose de métribuzine augmente et ceci quelque soit le sexe.

Le gain pondéral (g) chez les différents lots de rats mâles et femelles est significativement différent. Quelque soit la dose de métribuzine testée (D1 = 1,30 mg/kg/j et D2= 13 mg/kg/j), le gain pondéral est significativement diminué chez les lots de rats expérimentaux mâles et femelles par rapport à leurs témoins respectifs. Les rats expérimentaux ont donc présenté une croissance moindre que leurs témoins respectifs. La réduction du gain pondéral est dose dépendante.

Au cours de la période d'expérimentation (3 mois), les variations de l'ingestion alimentaire (g/j/rat) sont notées quotidiennement le matin à la même heure.

Quelque soit la dose de métribuzine testée (D1 et D2), l'ingestion d'aliment est significativement différente chez les différents lots de rats mâles et femelles. En effet, chez les rats expérimentaux mâles, la nourriture ingérée est significativement diminuée par rapport aux témoins mâles quelque soit la dose de métribuzine testée (D1 et D2) durant la période d'expérimentation. Les mêmes variations sont notées chez les rats expérimentaux femelles comparés à leurs témoins. Cette réduction est plus importante pour la dose 2 (13 mg/kg/j) de métribuzine et ceci quelque soit le sexe. La diminution de la nourriture ingérée s'accompagne d'une diminution très significative de l'apport énergétique chez les rats expérimentaux mâles et femelles par rapport à leur témoins respectifs quelque soit la dose de métribuzine testée.

Tableau 9: Poids corporel et consommation alimentaire chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine

	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Poids corporel (g)	421±27,39 ^a	343±16,92 ^b	285±14,9 ^c	303±12,98 ^c	273,66±8,62 ^d	228,66±1 ^f	0,0001
Gain pondéral (g)	139±13,69 ^a	85,66±4,10 ^c	60,66±3,66 ^e	95,66±5,58 ^b	68,33±3,80 ^d	46,33±4,62 ^f	0,0001
Nourriture ingérée (g/j/rat)	43,99±1,94 ^a	33,25±1,15 ^b	26,34±1,62 ^d	30,80±1,00 ^c	25,05±1,60 ^d	20,84±1,06 ^e	0,001
Apport énergétique (Kcal/j/rat)	132±7,20 ^a	99,97±2,85 ^b	79,06±3,51 ^d	92,43±2,36 ^c	75,15±2,90 ^d	62,46±1,08 ^e	0,001

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

I.1.2. Poids corporel et apport alimentaire chez les rats témoins et traités par le mancozebe (Tableau 10)

Quelque soit la dose de mancozebe testée (D1= 5 mg/kg/j et D2= 50 mg/kg/j), les poids corporels chez les rats mâles et femelles sont significativement différents. En effet, chez les rats expérimentaux mâles et femelles, une diminution hautement significative ($p < 0,0001$) du poids corporel est notée par comparaison aux rats témoins. La diminution du poids corporel est d'autant plus importante que la dose du mancozebe augmente et ceci quelque soit le sexe.

Le gain pondéral est significativement diminué chez les rats expérimentaux mâles et femelles par rapport à leurs témoins respectifs. L'effet est dose dépendant.

Chez les rats expérimentaux mâles, la nourriture ingérée est significativement diminuée par rapport à leurs témoins mâles, quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2) durant la période d'expérimentation. Les mêmes variations sont notées chez les rats expérimentaux femelles comparées à leurs témoins. Cette réduction est plus importante pour la dose 2 (50 mg/kg/j) de mancozebe comparée à la dose D1 et ceci quelque soit le sexe.

Une diminution très significative de l'apport énergétique est aussi notée chez les rats expérimentaux mâles et femelles par rapport à leurs témoins respectifs quelque soit la dose de mancozebe testée.

I.2. Variations des paramètres biochimiques

I.2.1. Effets de la métribuzine

I.2.1.1. Teneurs sériques en glucose et en protéines totales (Tableau 11)

Les teneurs sériques en glucose sont significativement différentes chez les rats mâles et femelles.

Chez les rats expérimentaux mâles et femelles, les résultats montrent une augmentation très significative des teneurs sériques en glucose pour les doses D1 et D2 de métribuzine testées comparées aux valeurs des témoins mâles et femelles. Cette augmentation est plus importante avec la dose D2 que la dose D1.

Quelque soit la dose de la métribuzine testée, les différents lots de rats expérimentaux mâles et femelles montrent des teneurs en protéines totales similaires à celles des témoins.

I.2.1.2. Teneurs sériques en urée et en créatinine (Tableau 11)

Quelque soit la dose de la métribuzine testée (1,3 mg/kg/j et 13 mg/kg/j), les teneurs sériques en urée et en créatinine chez les différents lots de rats expérimentaux mâles et femelles

Tableau 10: Poids corporel et consommation alimentaire chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe

	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Poids corporel (g)	421±27,3 ^a	364±17,19 ^b	338,33±16,74 ^c	303±12,98 ^d	242,33±16,14 ^e	214,66±16,31 ^f	0,0001
Gain pondéral (g/jour)	139±13,6 ^a	117,33±8,99 ^b	92,66±6,29 ^c	95,66±5,58 ^c	69±4,12 ^d	54,33±5,26 ^e	0,0001
Nourriture ingérée (g/j/rat)	43,99±1,94 ^a	28,49±1,55 ^b	20,71±1,19 ^c	30,80±1,00 ^b	20,90±0,50 ^c	16,32±1,26 ^d	0,001
Apport énergétique (Kcal/j/rat)	132±7,20 ^a	79,83±1,91 ^c	61,20±1,26 ^d	92,43±2,36 ^b	62,50±1,80 ^d	56,22±1,49 ^e	0,001

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

présentent une augmentation significative comparés à leurs témoins respectifs. Cet effet est dose dépendant.

Les teneurs en urée sont plus importantes chez le groupe femelle recevant la dose D2 de métribuzine par rapport au groupe mâle recevant la même dose.

I.2.1.3. Teneurs sériques en transaminases (Tableau 11)

Une augmentation significative des teneurs sériques en transaminases (ALT, AST) chez différents lots de rats expérimentaux est notée pour les deux doses de la métribuzine testée D1 et D2 comparées aux valeurs des rats témoins pour les deux sexes. Cette augmentation est dose dépendante.

I.2.1.4. Teneurs en cholestérol (g/l) sérique et des lipoprotéines (Figure 9 et Tableau A1 en annexe)

Les teneurs sériques en cholestérol chez les rats expérimentaux mâles et femelles ayant reçus la dose 1 de métribuzine (1.3 mg/kg/j) sont similaires à celles de leurs témoins respectifs. Par contre, à la dose 2 de métribuzine (13 mg/kg/j), les rats expérimentaux mâles et femelles présentent une diminution significative du taux de cholestérol sérique comparés à leurs témoins respectifs. Au niveau des fractions lipoprotéiques, les teneurs en cholestérol chez les rats mâles et femelles sont significativement différentes au niveau des VLDL et LDL.

En effet, au niveau des VLDL et LDL, une diminution significative du taux de cholestérol est notée chez les rats expérimentaux mâles et femelles traités à la dose 2 de métribuzine. La diminution du taux de cholestérol est donc plus importante pour la dose D2 par rapport à la dose D1 de métribuzine testée.

Les teneurs en cholestérol des HDL ne varient pas significativement entre les lots.

I.2.1.5. Teneurs en triglycérides (g/l) sériques et des lipoprotéines (Figure 10 et Tableau A2 en annexe)

Quelque soit la dose de métribuzine testée D1 et D2, les rats expérimentaux mâles montrent une augmentation très significative des teneurs sériques en triglycérides comparés aux rats témoins mâles. Cette augmentation est plus accentuée avec la dose D2 de métribuzine.

Les teneurs sériques en triglycérides sont similaires chez les rats expérimentaux femelles à la dose 1 de métribuzine par rapport aux témoins femelles. Par contre, à la dose 2 de métribuzine, les rats expérimentaux femelles présentent une augmentation significative des teneurs sériques en triglycérides comparés aux rats témoins femelles.

Tableau 11: Teneurs sériques en glucose, en protéines totales, en urée et en créatinine chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine

	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Glucose (g/L)	1,14±0,05 ^d	2,41±0,14 ^c	2,86±0,12 ^a	0,98±0,06 ^e	2,37±0,16 ^c	2,67±0,12 ^b	0,001
Protéines totales (g/L)	64,55±3,11	65,03±3,64	62,25±2,12	62,55±4,03	62,83±3,76	63,44±4,08	0,213
Urée (g/L)	0,23±0,03 ^d	0,50±0,04 ^c	0,65±0,03 ^b	0,25±0,04 ^d	0,52±0,04 ^c	0,75±0,06 ^a	0,01
Créatinine (mg/L)	10,23±1,12 ^c	17,03±1,33 ^b	28,21±1,42 ^a	10,27±1,31 ^c	18,44±1,26 ^b	27,04±1,55 ^a	0,01
ALT (UI/L)	28±1,23 ^c	30,24±1,68 ^b	46,12±2,26 ^a	26,36±2,15 ^c	32,22±2,42 ^b	44,12±1,88 ^a	0,01
AST (UI/L)	34,53±1,35 ^b	35,28±2,03 ^b	57,38±2,02 ^a	32,82±1,38 ^c	36,14±2,08 ^b	61,02±2,19 ^a	0,01

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

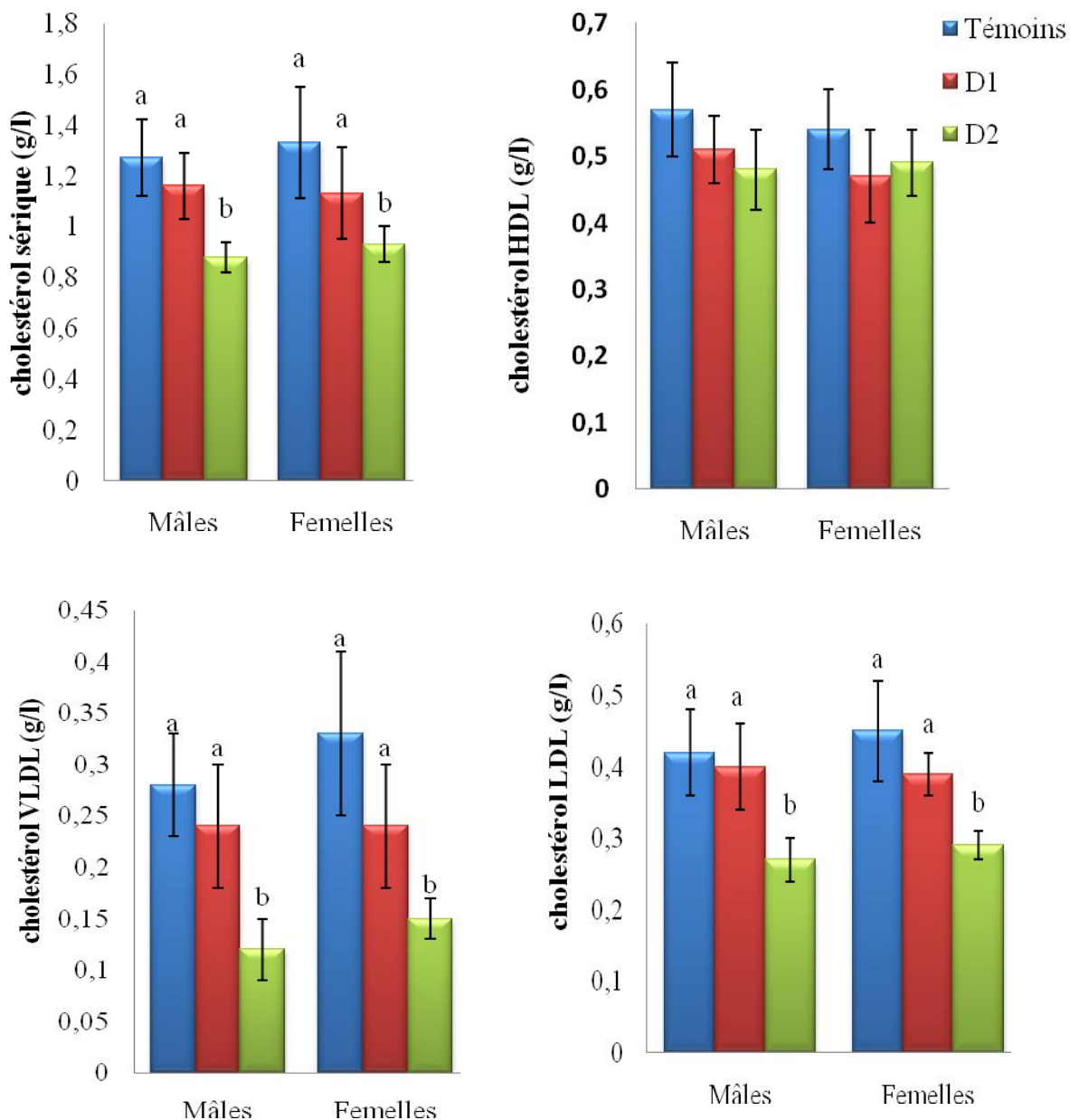


Figure 9 : Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Au niveau des fractions lipoprotéiques, quelque soit la dose de métribuzine testée, les rats expérimentaux mâles montrent une augmentation significative des teneurs en triglycérides au niveau des VLDL comparés aux rats témoins mâles. Cette augmentation est dose dépendante.

Cependant, les rats expérimentaux femelles montrent une augmentation significative des teneurs en triglycérides au niveau des VLDL seulement à la dose D2.

Au niveau des LDL et HDL, aucune variation significative n'est notée.

I.2.1.6. Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines (Tableau 12)

Quelque soit la dose de metribuzine testée D1 et D2, les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation significative des teneurs en protéines des VLDL par rapport à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est dose dépendante.

Au niveau des LDL, les rats expérimentaux mâles et femelles présentent une augmentation significative des teneurs en protéines seulement avec la dose D2, comparés aux valeurs témoins.

Une diminution significative des teneurs en protéines des HDL est notée chez les rats expérimentaux mâles et femelles comparés aux rats témoins. Cette diminution est accentuée avec la dose D2.

I.2.2. Effets du mancozebe

I.2.2.1. Teneurs sériques en glucose et en protéines totales (Tableau 13)

Chez les rats expérimentaux mâles et femelles, les résultats montrent une augmentation très significative des teneurs sériques en glucose pour les deux doses D1 et D 2 de mancozebe comparées aux valeurs des témoins mâles et femelles. Cette augmentation est plus importante à la dose D2 (50 mg/kg/j) que la dose D1 (5 mg/kg/j).

Quelque soit la dose de mancozebe testée, les différents lots de rats expérimentaux mâles et femelles ne présentent aucune variation significative des teneurs en protéines totales comparés aux témoins.

I.2.2.2. Teneurs sériques en urée et en créatinine (Tableau 13)

Les teneurs sériques en urée et en créatinine sont variables chez les rats mâles et femelles. Quelque soit la dose de mancozebe testée (5 mg/kg/j et 50 mg/kg/j), les teneurs sériques en urée et en créatinine chez les différents lots de rats expérimentaux mâles et femelles présentent une augmentation significative comparés à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est d'autant plus importante que la dose de mancozebe augmente.

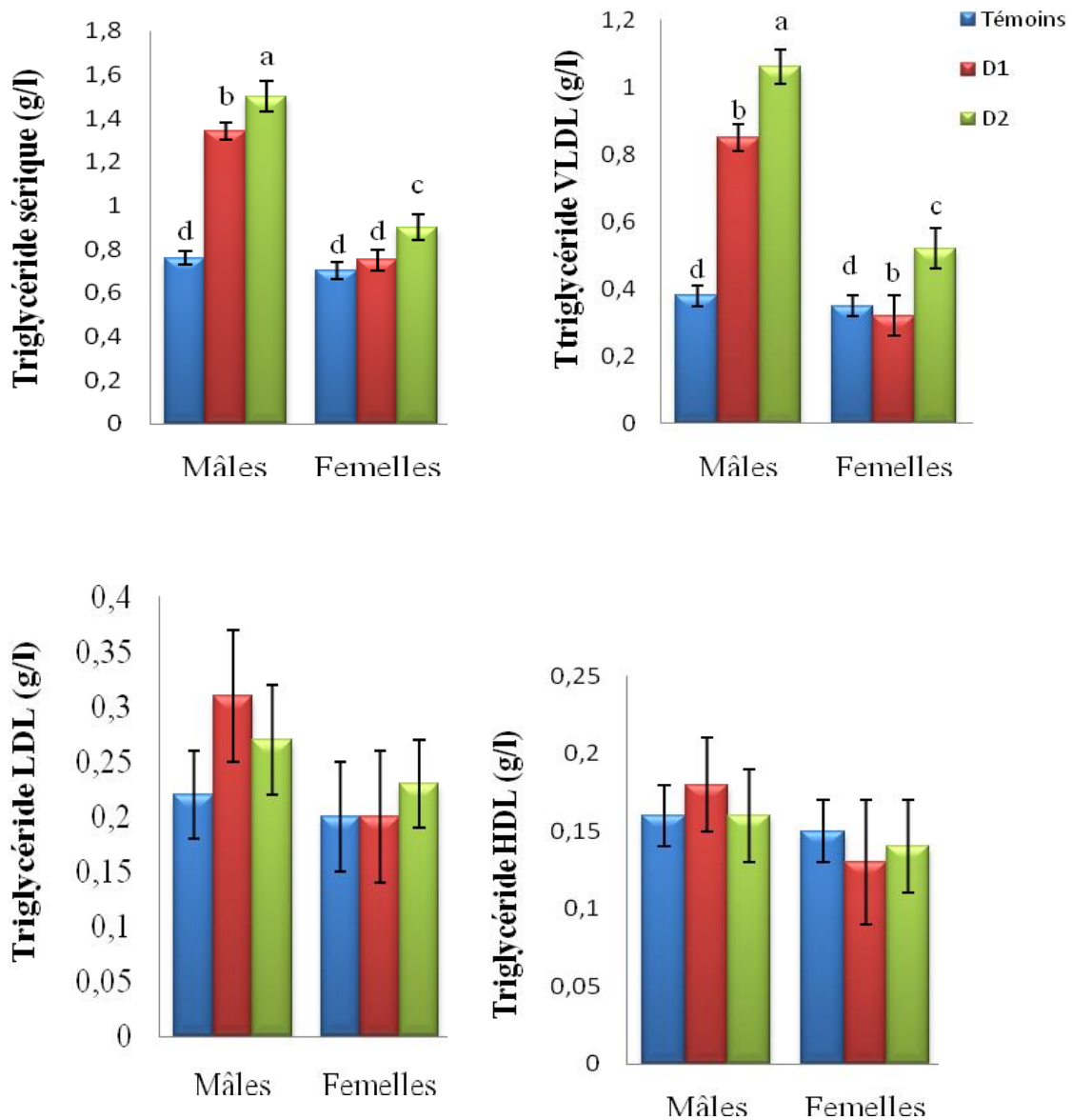


Figure 10 : Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

Tableau 12: Teneurs en protéines (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine

	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
VLDL (g/L)	0,42±0,04 ^c	1,04±0,15 ^b	1,21±0,09 ^a	0,39±0,06 ^e	0,64±0,04 ^d	0,79±0,05 ^c	0,001
LDL (g/L)	0,29±0,03 ^b	0,33±0,04 ^b	0,56±0,06 ^a	0,26±0,05 ^b	0,28±0,04 ^b	0,65±0,05 ^a	0,01
HDL (g/L)	0,85±0,16 ^a	0,78±0,14 ^a	0,33±0,04 ^b	1,12±0,23 ^a	0,89±0,04 ^a	0,38±0,06 ^b	0,01

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

I.2.2.3. Teneurs sériques en transaminases (Tableau 13)

Une augmentation significative des teneurs sériques en transaminases (ALT, AST) est observée chez les différents lots de rats expérimentaux mâles et femelles quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2). Cette augmentation est plus importante quand la dose de mancozebe augmente.

I.2.2.4. Teneurs en cholestérol (g/l) sérique et des lipoprotéines (Figure 11 et Tableau A1 en annexe)

Les teneurs sériques en cholestérol ne varient pas significativement entre les lots de rats.

Au niveau des fractions lipoprotéiques VLDL, LDL et HDL, les teneurs en cholestérol restent similaires chez les différents lots étudiés et ne sont pas influencées par le mancozebe.

I.2.2.5. Teneurs en triglycérides (g/l) sériques et des lipoprotéines (Figure 12 et Tableau A2 en annexe)

Quelque soit la dose de mancozebe testée D1 et D2, les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation très significative des teneurs sériques en triglycérides comparés à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est dose dépendante.

Au niveau des fractions lipoprotéiques VLDL et LDL, les teneurs en triglycérides sont variables chez les rats mâles et femelles.

Quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2) les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation très significative des teneurs en triglycérides au niveau des VLDL comparés aux rats témoins. Cette augmentation est accentuée avec la dose D2.

Au niveau des LDL, les rats expérimentaux mâles et femelles présentent une augmentation significative des teneurs en triglycérides seulement à la dose D2, comparés aux valeurs témoins.

Aucune variation significative des teneurs en triglycéride au niveau des HDL n'est observée.

I.2.2.6. Teneurs en protéines (g/l) des lipoprotéines (Tableau 14)

Aucune variation significative des teneurs en protéines des VLDL et LDL n'est observée.

Alors que au niveau des HDL et quelque soit la dose de mancozebe testée D1 et D2, les rats expérimentaux mâles et femelles présentent une diminution significative comparés à leurs témoins respectifs. Cet effet est dose dépendant.

Tableau 13: Teneurs sériques en glucose, protéines totales, urée, créatinine et transaminases chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe

	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Glucose (g/L)	1,14±0,05 ^d	1,63±0,17 ^c	1,98±0,10 ^b	0,98±0,06 ^d	1,75±0,25 ^b	2,23±0,07 ^a	0,001
Protéines totales (g/L)	64,55±3,11	63,03±4,01	63,25±2,87	62,55±4,03	62,97±3,90	63,80±4,26	0,146
Urée (g/L)	0,23±0,03 ^c	0,56±0,02 ^b	0,88±0,09 ^a	0,25±0,04 ^c	0,55±0,07 ^b	0,88±0,12 ^a	0,001
Créatinine (g/L)	10,23±1,12 ^d	14,01±0,71 ^c	16,02±0,81 ^b	10,27±1,31 ^d	16,01±1,2 ^b	18,22±1,05 ^a	0,001
ALT (UI/L)	28±1,23 ^c	31,24±1,70 ^b	45,12±2,26 ^a	26,36±2,15 ^c	33,22±2,42 ^b	45,12±1,88 ^a	0,002
AST (UI/L)	34,53±1,35 ^c	38,28±1,14 ^b	58,38±2,56 ^a	32,82±1,38 ^c	39,14±1,08 ^b	60,02±2,19 ^a	0,001

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

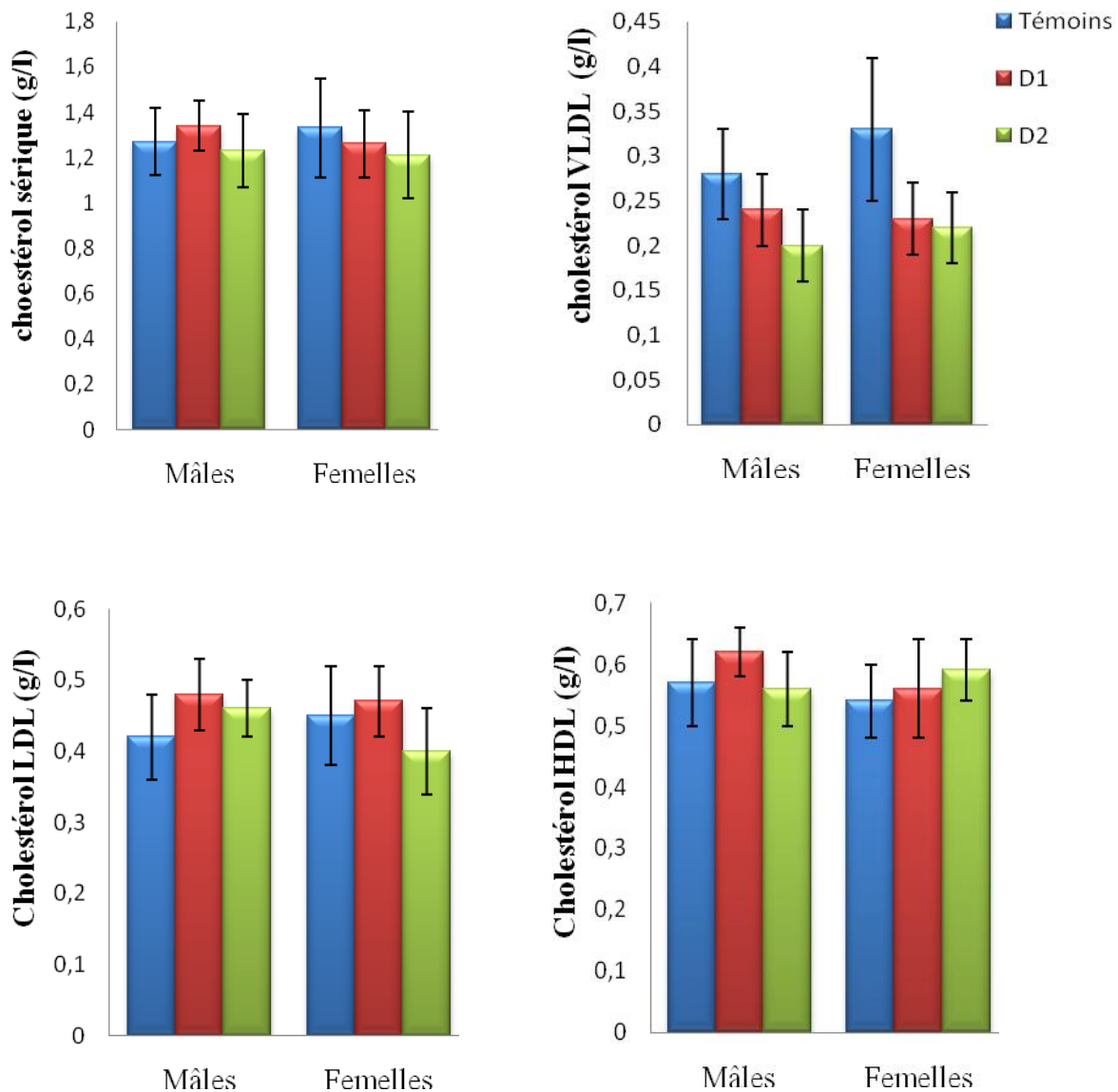


Figure 11 : Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant 1 mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

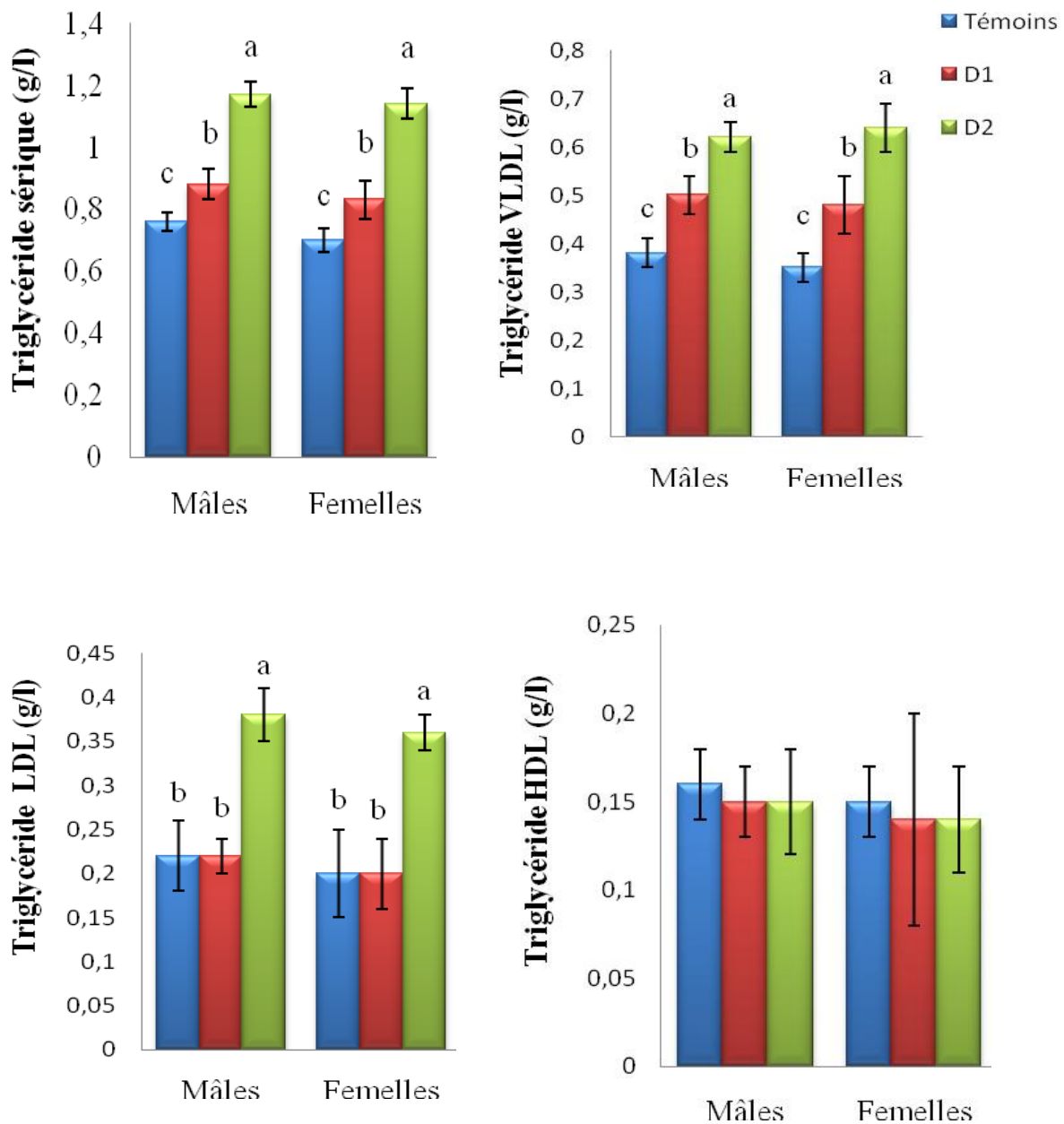


Figure 12 : Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Tableau 14: Teneurs en protéines (g/L) des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe.

	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
VLDL (g/L)	0,42±0,04	0,50±0,08	0,47±0,05	0,39±0,06	0,43±0,06	0,44±0,05	0,121
LDL (g/L)	0,29±0,03	0,32±0,04	0,34±0,06	0,26±0,05	0,30±0,06	0,29±0,06	0,136
HDL (g/L)	0,85±0,16 ^a	0,68±0,12 ^b	0,46±0,09 ^c	1,12±0,23 ^a	0,63±0,07 ^b	0,38±0,09 ^c	0,01

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

I.3. Poids et composition des organes

I.3.1. Poids des différents organes

I.3.1.1. Effets de la métribuzine (Figure 13 et Tableau A3 en annexe)

Les poids des différents organes chez les rats mâles et femelles sont significativement différents à ceux des rats témoins.

Au niveau du foie, quelque soit la dose de métribuzine testée (1,3 mg/kg/j et 13 mg/kg/j), le poids du foie chez les rats mâles et femelles est similaire à celui des rats témoins respectifs.

Les rats femelles ont un foie moins lourd que celui des rats mâles.

La dose D1 et D2 de métribuzine entraîne une diminution significative du poids du muscle chez les rats expérimentaux mâles et femelles par rapport aux rats témoins respectifs. Cette diminution est dose dépendante.

Au niveau du tissu adipeux, les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation significative du poids seulement à la dose D2 comparés aux valeurs témoins.

I.3.1.2. Effets du mancozebe (Figure 14 et Tableau A3 en annexe)

Quelque soit la dose de mancozebe testée D1 et D2, les rats expérimentaux mâles et femelles présentent une augmentation significative du poids de foie par rapport à leurs témoins. Cette augmentation est importante à la dose D2.

Au niveau du muscle, les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une chute du poids de muscle avec les deux doses de mancozebe comparés à leurs témoins respectifs. Cet effet est accentué avec la dose D2 chez les rats femelles.

Aucune variation significative du poids du tissu adipeux n'est notée chez les rats expérimentaux mâles et femelles.

I.4. Teneurs en lipides totaux des organes

I.4.1. Effets de la métribuzine (Figure 15 et Tableau A4 en annexe)

Les teneurs en lipides totaux des différents organes (foie, tissu adipeux et intestin) présentent des variations significatives chez les différents lots de rats.

Au niveau du foie et l'intestin, les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation significative des teneurs en lipides totaux seulement avec la dose D2 de métribuzine comparés aux rats témoins respectifs.

Quelque soit la dose de métribuzine testée (D1 et D2), les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation significative des teneurs en lipides totaux du muscle comparés aux valeurs obtenues chez les témoins.

Concernant le tissu adipeux, les teneurs en lipides totaux présentent une diminution significativement chez les différents lots des rats expérimentaux mâles et femelles quelque soit la

dose de métribuzine testée (D1 et D2) par rapport aux rats témoins. Cette diminution est importante avec la dose D2.

I.4.2. Effets du mancozebe (Figure 16 et Tableau A4 en annexe)

Quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), les teneurs en lipides totaux au niveau du foie, du muscle et l'intestin chez les rats expérimentaux mâles et femelles sont significativement élevées comparés à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est dose dépendante.

Concernant le tissu adipeux, les teneurs en lipides totaux montrent une diminution significative chez les rats expérimentaux mâles et femelles quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2) par rapport aux rats témoins.

I.5. Teneurs en protéines totales des organes

I.5.1. Effets de la métribuzine (Figure 17 et Tableau A5 en annexe)

Quelque soit la dose de métribuzine testée (D1 et D2), les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une diminution significative des teneurs en protéines totales au niveau du foie, muscle et tissu adipeux comparés à leurs témoins respectifs. Cette diminution est dose dépendante. Aucune variation significative des teneurs en protéines totales intestinales n'est notée chez les rats.

I.5.2. Effets du mancozebe (Figure 18 et Tableau A5 en annexe)

Les teneurs en protéines totales du foie ne présentent aucune variation significative chez les rats expérimentaux mâles et femelles.

Quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation des teneurs en protéines totales du tissu adipeux et une diminution des protéines du muscle comparés aux rats témoins respectifs. Cette augmentation est importante avec la dose D2. Concernant l'intestin et quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), les teneurs en protéines totales montrent une diminution significative chez les rats mâles et femelles comparés aux rats témoins respectifs. Cette diminution est dose dépendante seulement chez les rats femelles.

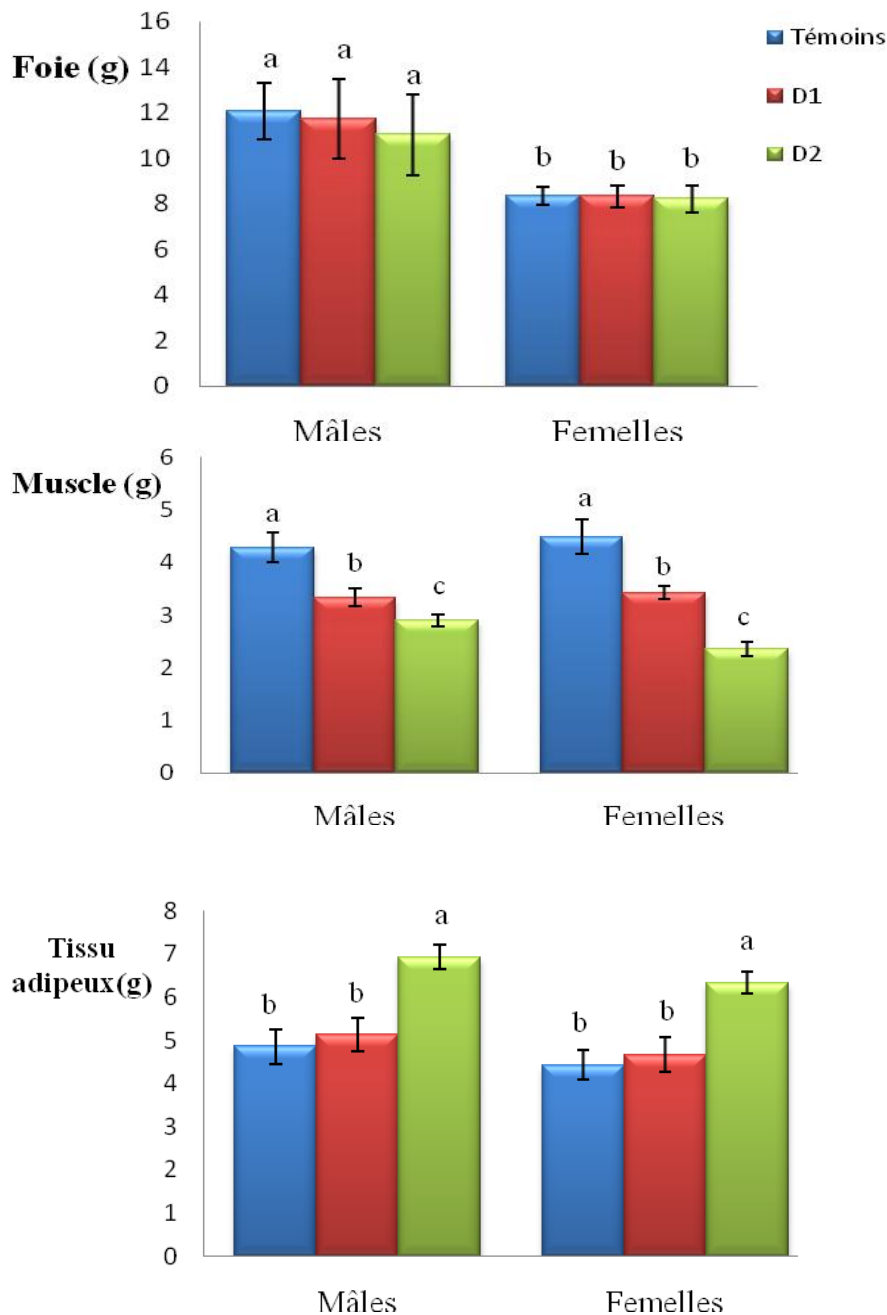


Figure 13: Poids des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

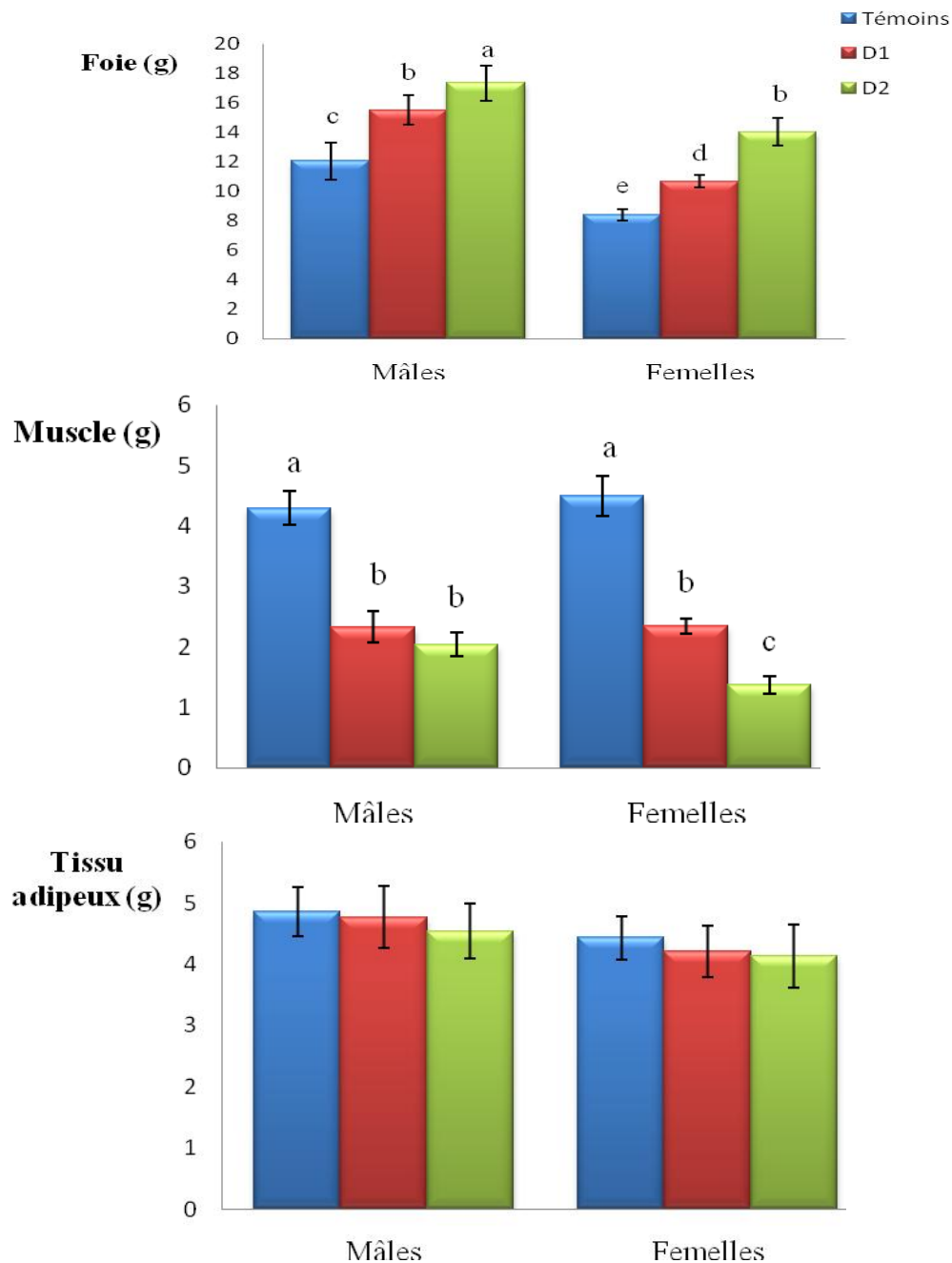


Figure 14: Poids des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose de mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

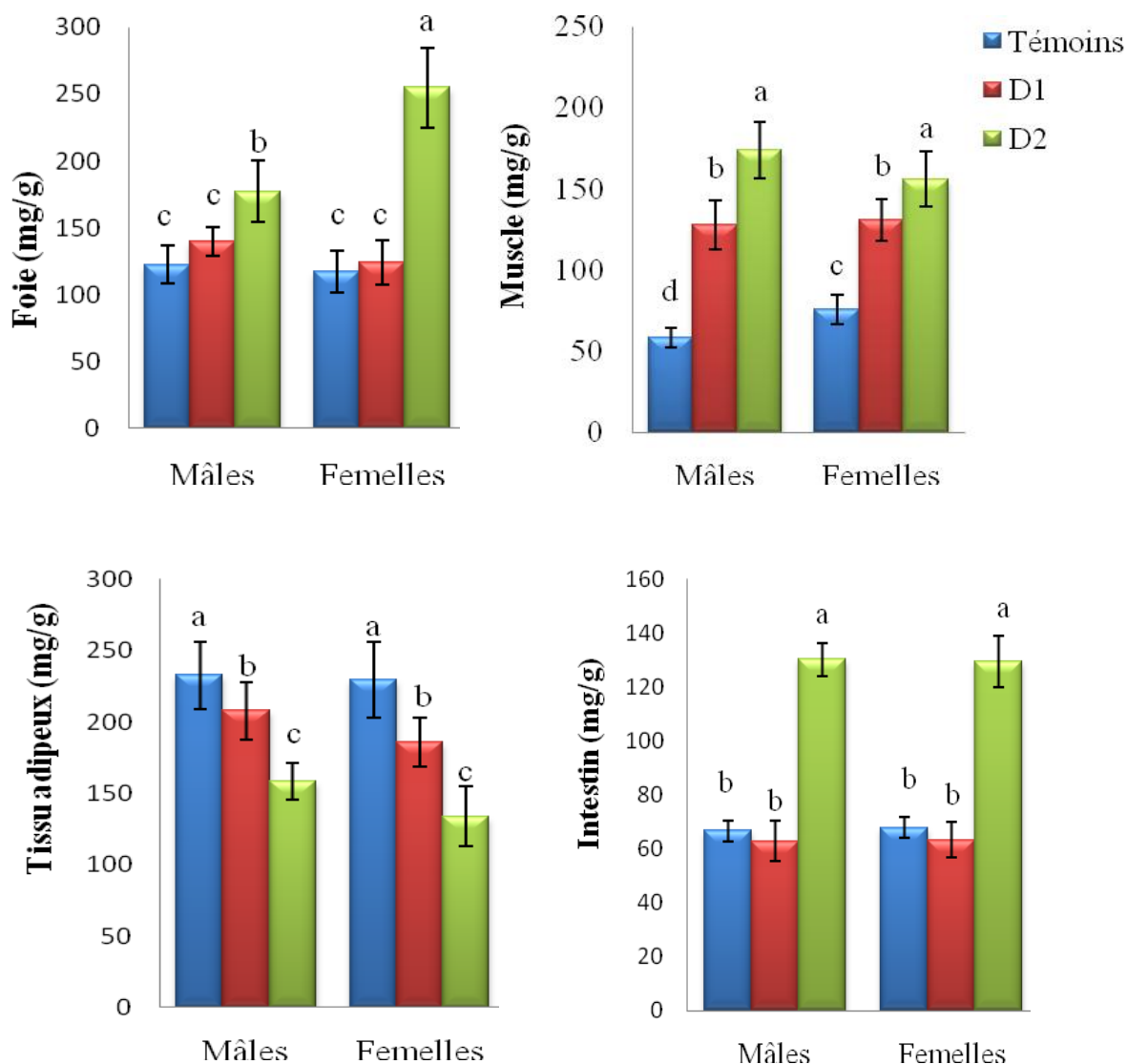


Figure 15: Teneurs en lipides totaux des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j).Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

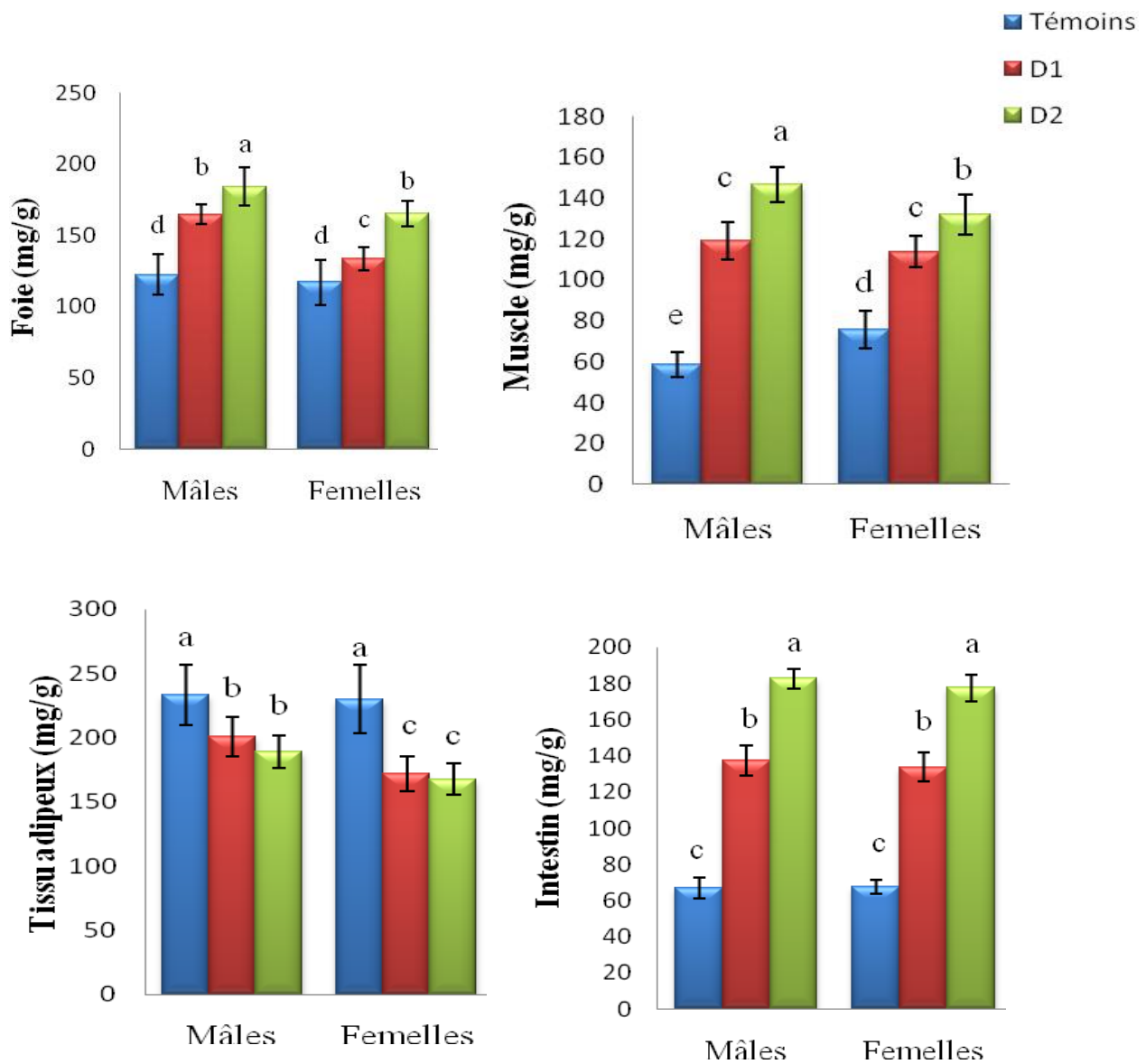


Figure 16: Teneurs en lipides totaux des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

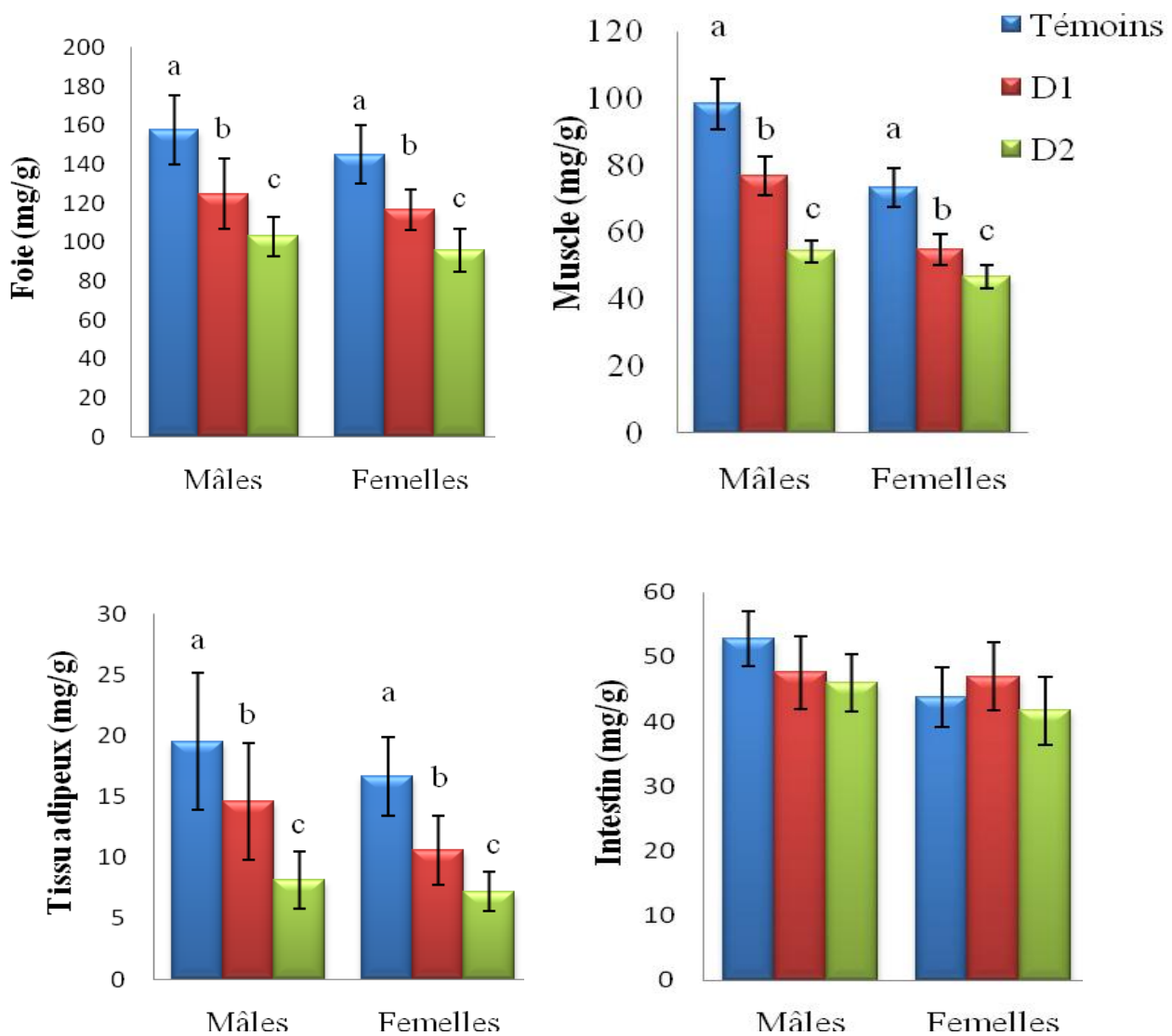


Figure 17 : Teneurs en protéines totales des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

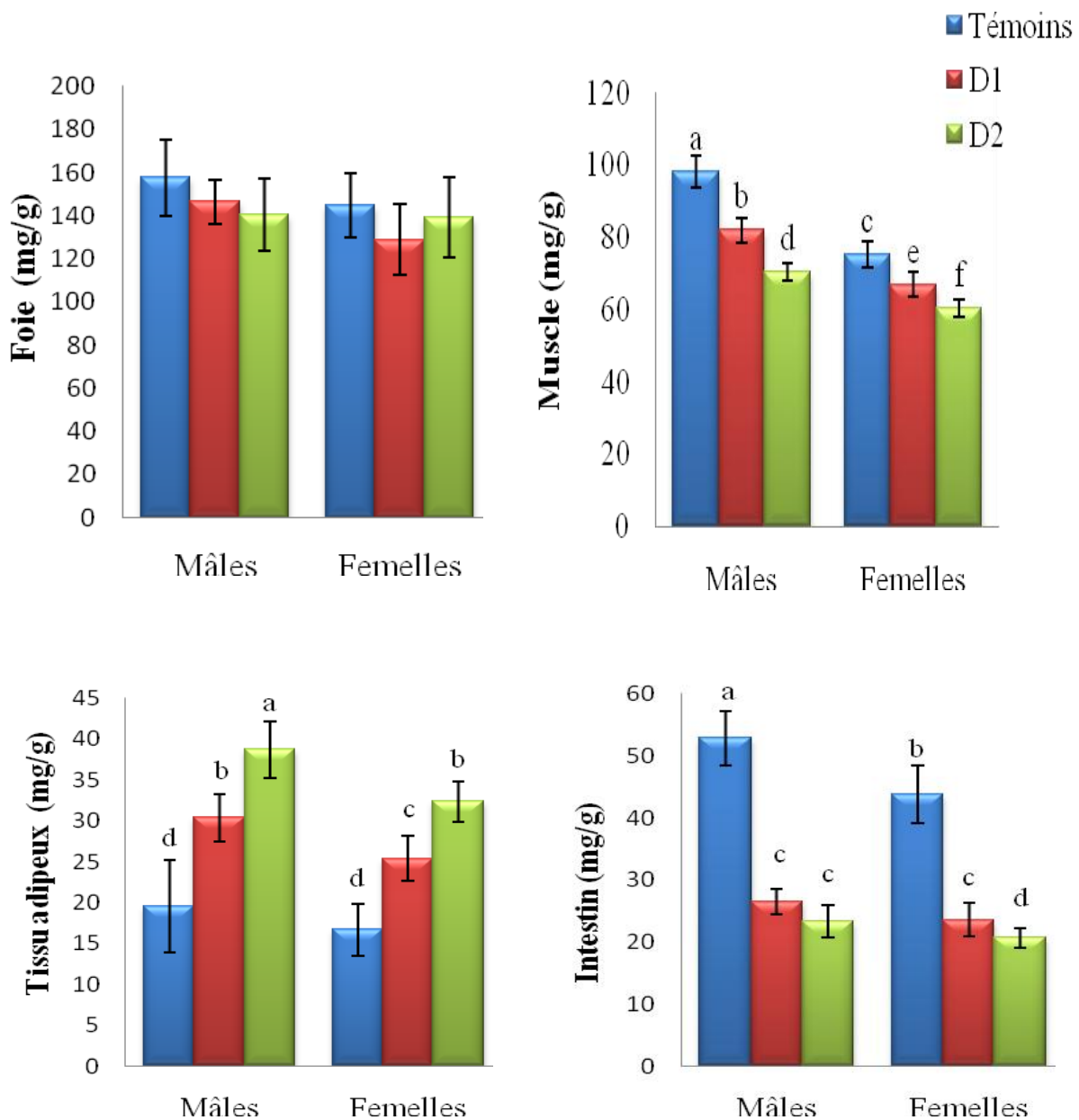


Figure 18 : Teneurs en protéines totales des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

I.6. Teneurs en cholestérol total des organes

I.6.1. Effets de la métribuzine (Tableau 15)

Les teneurs en cholestérol total du foie chez les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une diminution significative comparées aux valeurs témoins seulement avec la dose D2 de la métribuzine. Au niveau du muscle, du tissu adipeux et de l'intestin, aucune variation significative des teneurs en cholestérol total n'est notée chez les rats.

I.6.2. Effets du mancozebe (Tableau 16)

Les teneurs en cholestérol total hépatique ne présentent aucune variation quelque soit la dose du mancozebe utilisée. Par ailleurs, au niveau du muscle et de l'intestin, la dose D1 et D2 de mancozebe entraîne chez les rats expérimentaux mâles et femelles une augmentation significative des teneurs en cholestérol par rapport à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est importante avec la dose D2. Par contre et quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), les teneurs en cholestérol total du tissu adipeux sont diminuées significativement chez les rats mâles et femelles expérimentaux par rapport aux rats témoins. Cet effet est accentué avec la dose D2.

I.7. Teneurs en triglycérides des organes

I.7.1. Effets de la métribuzine (Tableau 17)

Les doses D1 et D2 de métribuzine chez les rats mâles et femelles entraînent une augmentation significative des teneurs en triglycérides hépatiques et musculaires par rapport à leurs témoins respectifs ; cette augmentation des triglycérides est plus importante avec la dose D2. Les teneurs en triglycérides du tissu adipeux sont réduites par la métribuzine chez les rats. Concernant l'intestin, les teneurs en triglycéride chez les rats mâles et femelles sont significativement augmentées seulement avec la dose D2 de métribuzine par rapport aux valeurs témoins.

I.7.2. Effets du mancozebe (Tableau 18)

Les teneurs en triglycéride du foie, du muscle, du tissu adipeux et de l'intestin présentent des variations significatives entre les différents lots de rats. Quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation significative des teneurs en triglycérides hépatiques, musculaires et intestinales par rapport à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est dose dépendante.

Tableau 15: Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine.

	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Foie (mg/g)	15,59±1,81 ^a	14,4±1,58 ^a	7,35±0,30 ^b	15,34±1,96 ^a	15,32±1,43 ^a	5,78±0,39 ^b	0,01
Muscle (mg/g)	3,13±0,74	2,46±0,52	2,58±0,43	2,64±0,64	2,36±0,40	3,34±0,67	0,145
Tissu adipeux (mg/g)	9,36±0,86	8,21±0,71	11,81±1,87	9,10±1,06	11,5±1,40	9,08±0,67	0,136
Intestin (mg/g)	6,53±1,38	7,29±2,68	6,93±1,60	6,75±1,25	8,94±1,74	7,02±1,37	0,127

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

Tableau 16: Teneurs en cholestérol total des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe

	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Foie (mg/g)	15,59±1,81	14,28±1,62	15,24±1,57	15,34±1,96	14,48±1,87	13,82±1,12	0,127
Muscle (mg/g)	3,13±0,74 ^d	6,38±0,57 ^c	8,12±0,49 ^b	2,64±0,64 ^d	7,22±0,33 ^c	11,01±0,73 ^a	0,001
Tissu adipeux (mg/g)	9,36±0,86 ^a	6,8±0,52 ^b	5,17±0,46 ^c	9,10±0,26 ^a	7,22±0,45 ^b	5,54±0,36 ^c	0,005
Intestin (mg/g)	6,53±0,48 ^d	9,09±0,61 ^c	14,22±1,36 ^b	6,75±1,25 ^d	14,2±1,96 ^b	17,92±1,04 ^a	0,003

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

Tableau 17: Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine

	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Foie (mg/g)	35,97±4,23 ^c	54,22±3,84 ^b	76,53±1,14 ^a	38,2±5,64 ^c	59,86±3,26 ^b	74,57±2,84 ^a	0,001
Muscle (mg/g)	20,78±1,94 ^c	30,77±1,38 ^b	42,52±3,06 ^a	24,36±3,05 ^c	34,12±1,28 ^b	45,4±2,10 ^a	0,001
Tissu adipeux (mg/g)	86,28±3,88 ^a	68,13±2,15 ^b	55,58±3,51 ^d	84,26±3,84 ^a	72,93±2,80 ^b	66±2,61 ^c	0,001
Intestin (mg/g)	23,94±2,85 ^b	22,20±3,38 ^b	44,6±1,98 ^a	21,94±1,24 ^b	20,56±2,61 ^b	46,4±2,46 ^a	0,01

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

Tableau 18: Teneurs en triglycérides des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe

	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Foie (mg/g)	35,97±4,23 ^e	61,22±3,17 ^c	82,80±2,6 ^a	38,22±5,64 ^e	50,97±3,68 ^d	74,54±4,3 ^b	0,0001
Muscle (mg/g)	20,78±1,94 ^e	28,21±1,89 ^d	41,20±1,0 ^b	24,36±3,05 ^e	33,56±1,06 ^c	53,8±2,29 ^a	0,0001
Tissu adipeux (mg/g)	86,28±6,88 ^a	62,44±2,68 ^b	52,8±4,80 ^c	82,26±5,84 ^a	61,28±3,72 ^b	53,8±2,14 ^c	0,001
Intestin (mg/g)	23,94±2,85 ^d	40,58±2,17 ^c	77,41±4,0 ^a	21,94±1,24 ^d	41,98±4,11 ^c	68±2,49 ^b	0,001

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

Concernant le tissu adipeux, quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), les teneurs en triglycérides chez les rats expérimentaux mâles et femelles sont significativement diminuées par rapport aux rats témoins. Cette diminution est plus importante avec la dose 2.

I.8. Activités des enzymes lipases des organes

I.8.1. Effets de la métribuzine (Figure 19 et 20 et Tableau A6 en annexe)

Les activités des LPL au niveau du foie, du muscle, du tissu adipeux et de l'intestin présentent des variations significatives chez les rats mâles et femelles.

Quelque soit la dose de metribuzine testée (D 1 et D 2), les activités de la HTGL au niveau du foie et de la LPL musculaire montrent une augmentation significative chez les rats expérimentaux mâles et femelles comparés à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est dose dépendante.

Chez les rats expérimentaux mâles et femelles recevant la métribuzine à la dose D1 et D2, l'activité des LPL du tissu adipeux et de l'intestin présentent une augmentation seulement avec la dose D2 Comparée aux valeurs témoins.

Concernant l'activité des enzymes lipases hormonosensible LHS du tissu adipeux, aucune variation significative n'est notée.

I.8.2. Effets du mancozebe (Figure 21 et 22 et Tableau A6 en annexe)

Les activités des enzymes lipases du foie, du tissu adipeux et de l'intestin ne montrent aucune variation significative chez les différents lots de rats.

Quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), l'activité de la LPL du muscle est significativement augmentée chez les différents lots de rats expérimentaux mâles et femelles comparée aux valeurs témoins respectives. Cette augmentation est accentuée avec la dose D2.

L'activité de l'enzyme LHS du tissu adipeux est significativement élevée chez les rats expérimentaux mâles et femelles par rapport à leurs témoins et ceci quelque soit la dose de mancozebe testée. Cette augmentation est dose dépendante.

I.9. Activité de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase plasmatique

I.9.1. Effets de la métribuzine. (Figure 23 et Tableau A7 en annexe)

Quelque soit la dose de métribuzine testée (D 1 et D 2), l'activité de l'enzyme LCAT plasmatique est significativement diminuée chez les rats expérimentaux mâles et femelles par rapport aux rats témoins respectifs. Cette diminution est plus importante avec la dose D2.

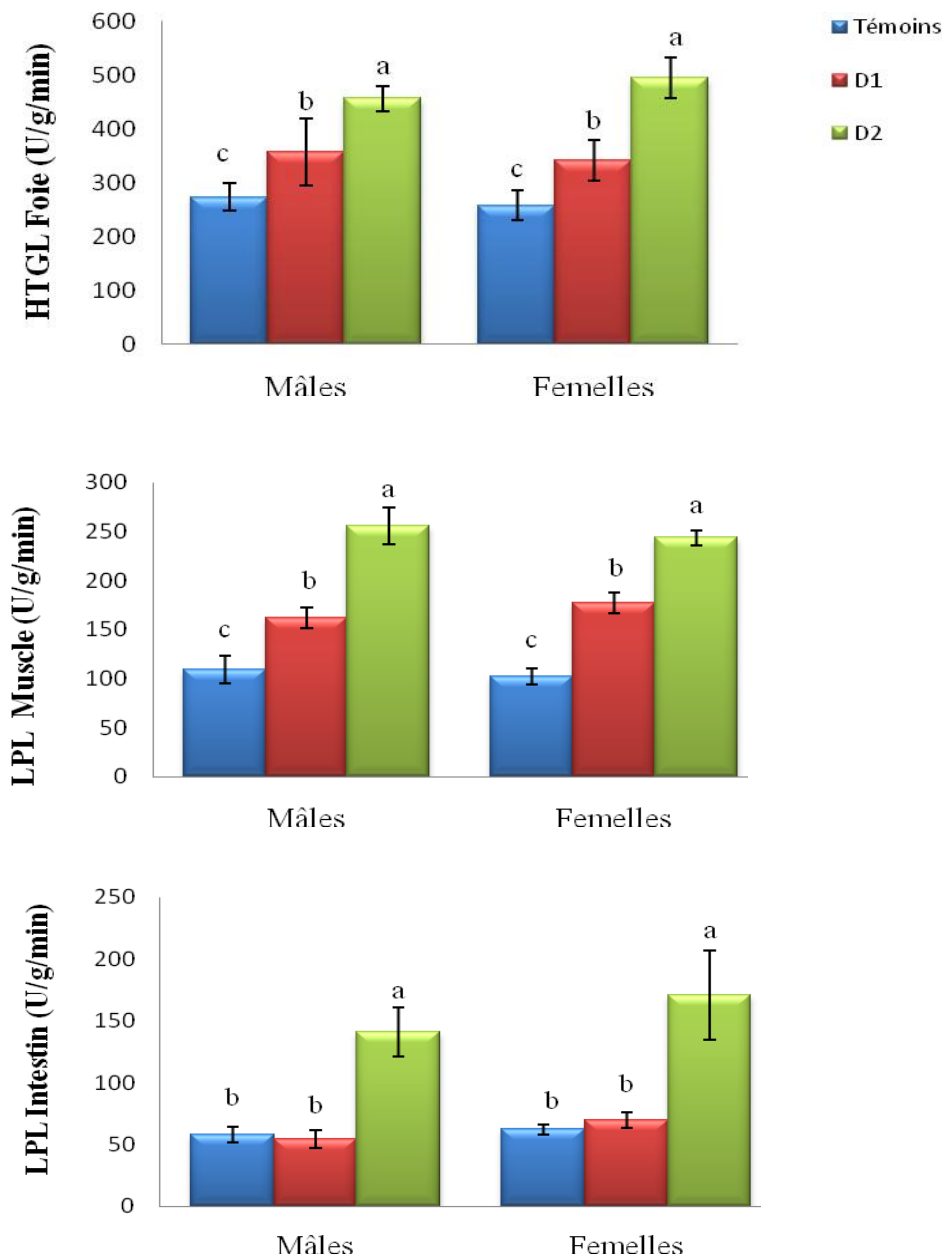


Figure 19: Activités des enzymes lipases du foie, muscle et intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

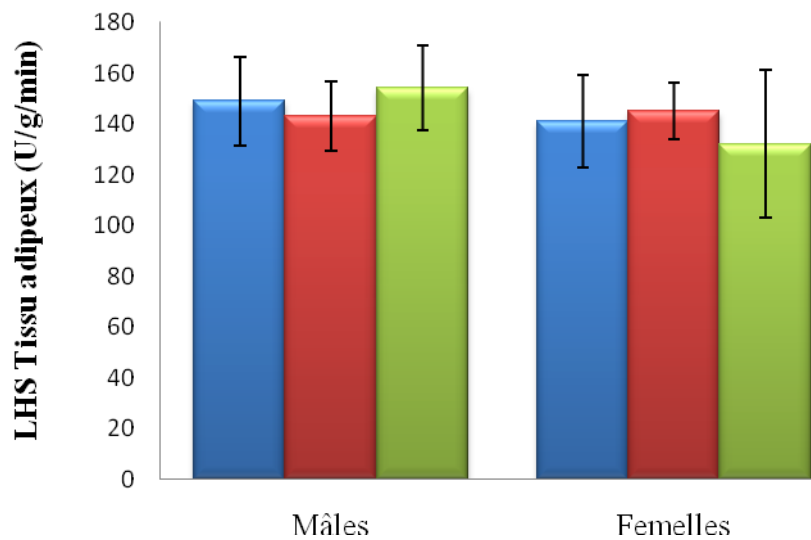
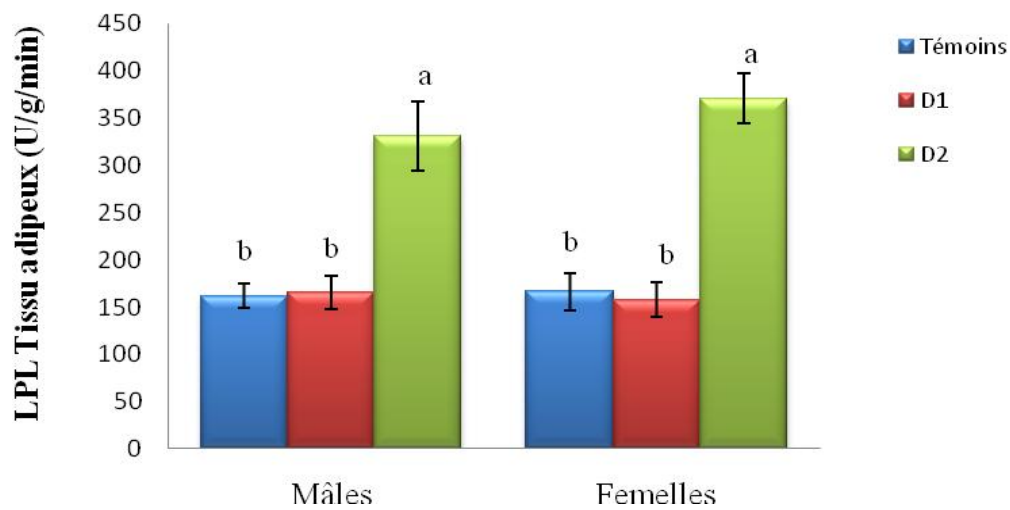


Figure 20: Activités des enzymes lipases du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

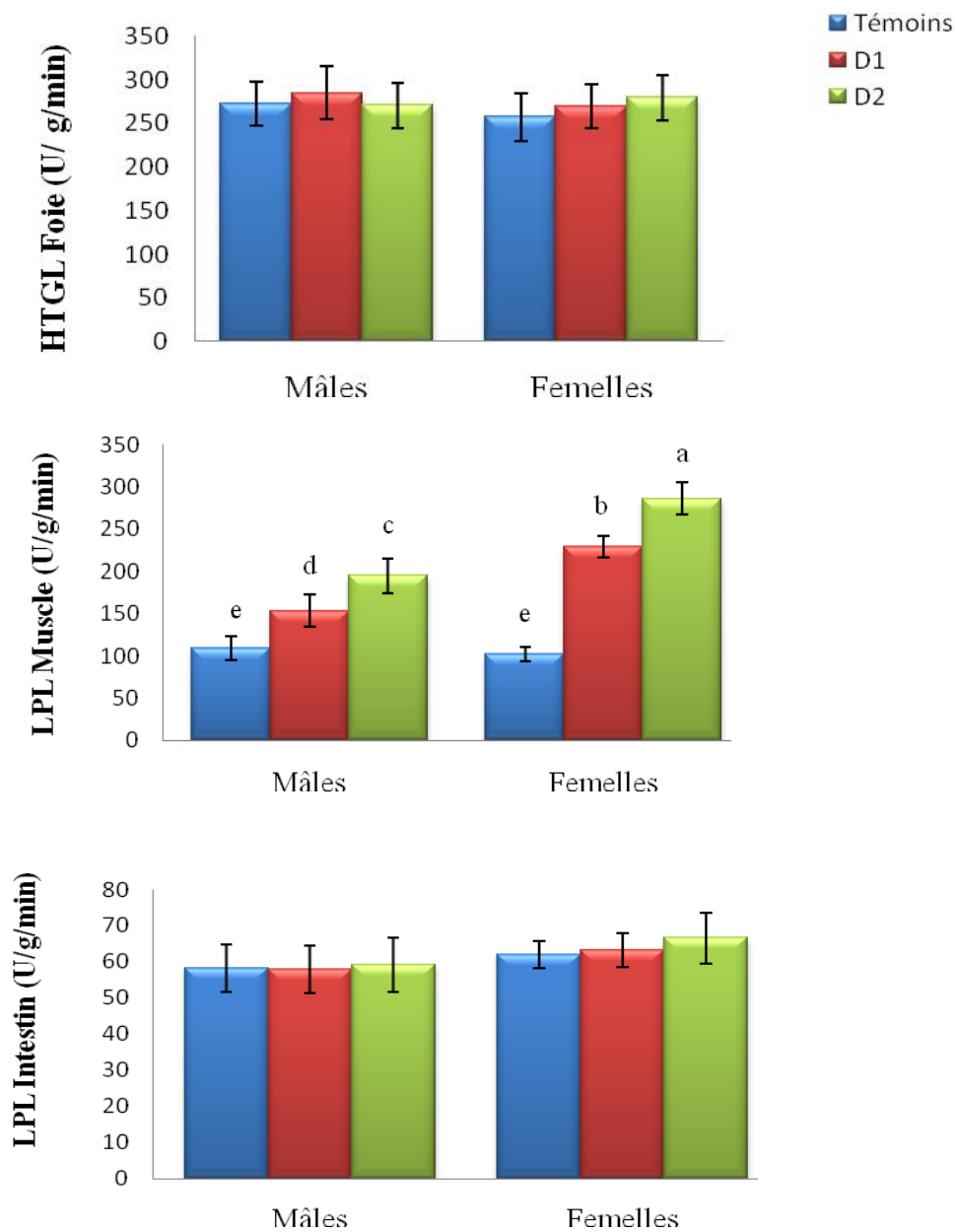


Figure 21: Activités des enzymes lipases du foie, muscle et intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozbe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

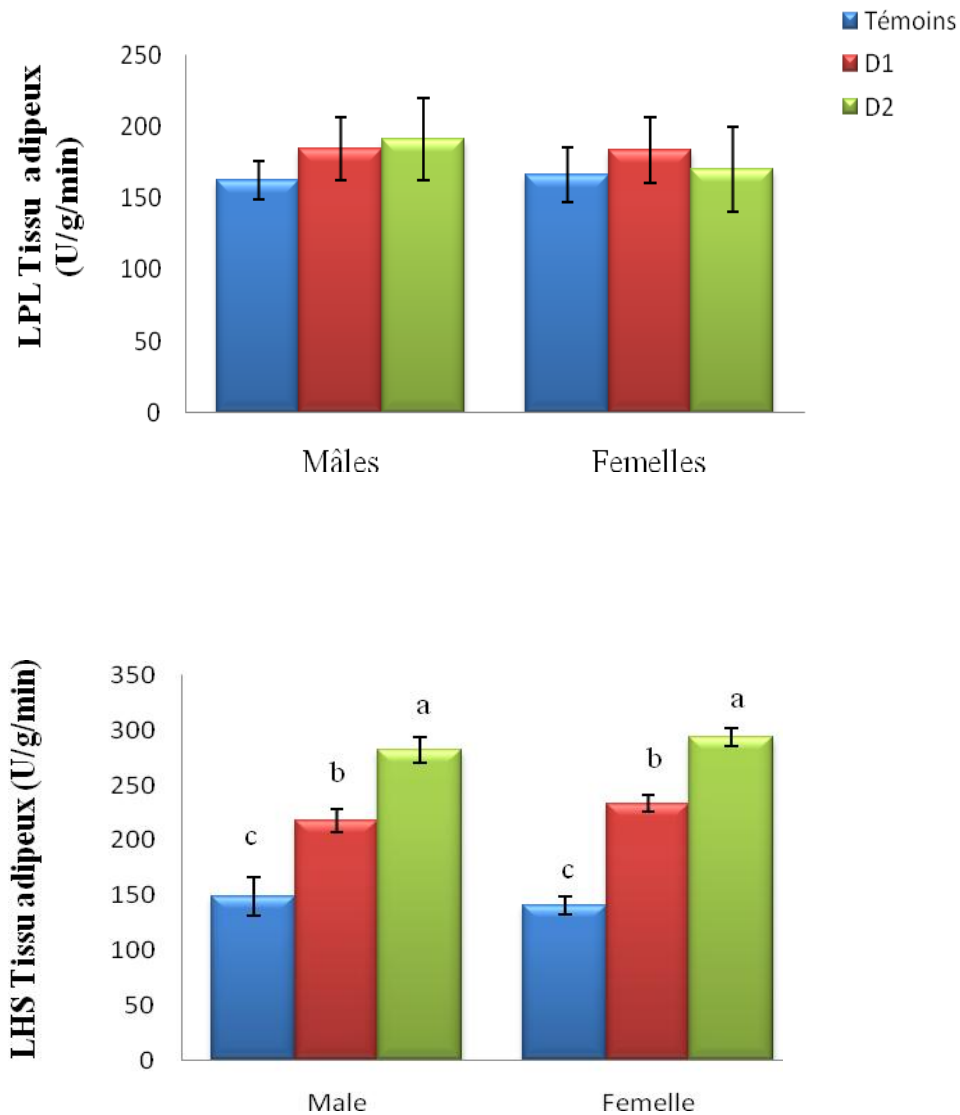


Figure 22: Activités des enzymes lipases du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

I.9.2. Effets du mancozebe (Figure 23 et Tableau A7 en annexe)

Chez les rats expérimentaux mâles recevant les deux doses D1 et D2, l'activité de l'enzyme LCAT présente une diminution significative seulement avec la dose D2 comparée à leurs témoins. Chez les rats expérimentaux femelles, cette diminution est plus importante que la dose de mancozebe testée augmente.

II. Effets de la métribuzine et du mancozebe sur le statut oxydant/antioxydant

II.1. Marqueurs antioxydants sériques et érythrocytaires

II.1.1. Teneurs en vitamine C sérique, en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase

II.1.1.1. Effets de la métribuzine (Figure 24 et Tableau A8 en annexe)

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

Par contre, chez les rats traités par la dose D2 de métribuzine, on observe une diminution significative des teneurs sériques en vitamine C par rapport aux valeurs témoins.

Chez les rats traités par les deux doses D1 et D2 de métribuzine, les teneurs en glutathion et l'activité catalase érythrocytaire sont significativement diminuées par rapport aux valeurs témoins. Cette diminution est accentuée par la dose D2.

II.1.1.2. Effets du mancozebe (Figure 25 et Tableau A8 en annexe)

Aucune variation des teneurs sériques en vitamine C n'est notée chez les différents lots de rats mâles et femelles.

Quelques soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), les teneurs érythrocytaires en glutathion sont significativement diminuées chez les rats expérimentaux mâles et femelles par rapport à leurs témoins respectifs. Cette diminution est dose dépendante.

L'activité de la catalase est significativement augmentée chez les rats expérimentaux mâles seulement avec la dose D2 comparée aux valeurs témoins. Chez les rats expérimentaux femelles, l'augmentation de l'activité de la catalase est dose dépendante.

II.2. Marqueurs du statut oxydant

II.2.1. Effets de la métribuzine (Figure 26 et Tableau A9 en annexe)

Les teneurs plasmatiques des marqueurs du statut oxydant (malondialdéhyde, protéines carbonylées, diènes conjugués et taux d'oxydation) montrent des variations significatives chez les rats mâles et femelles.

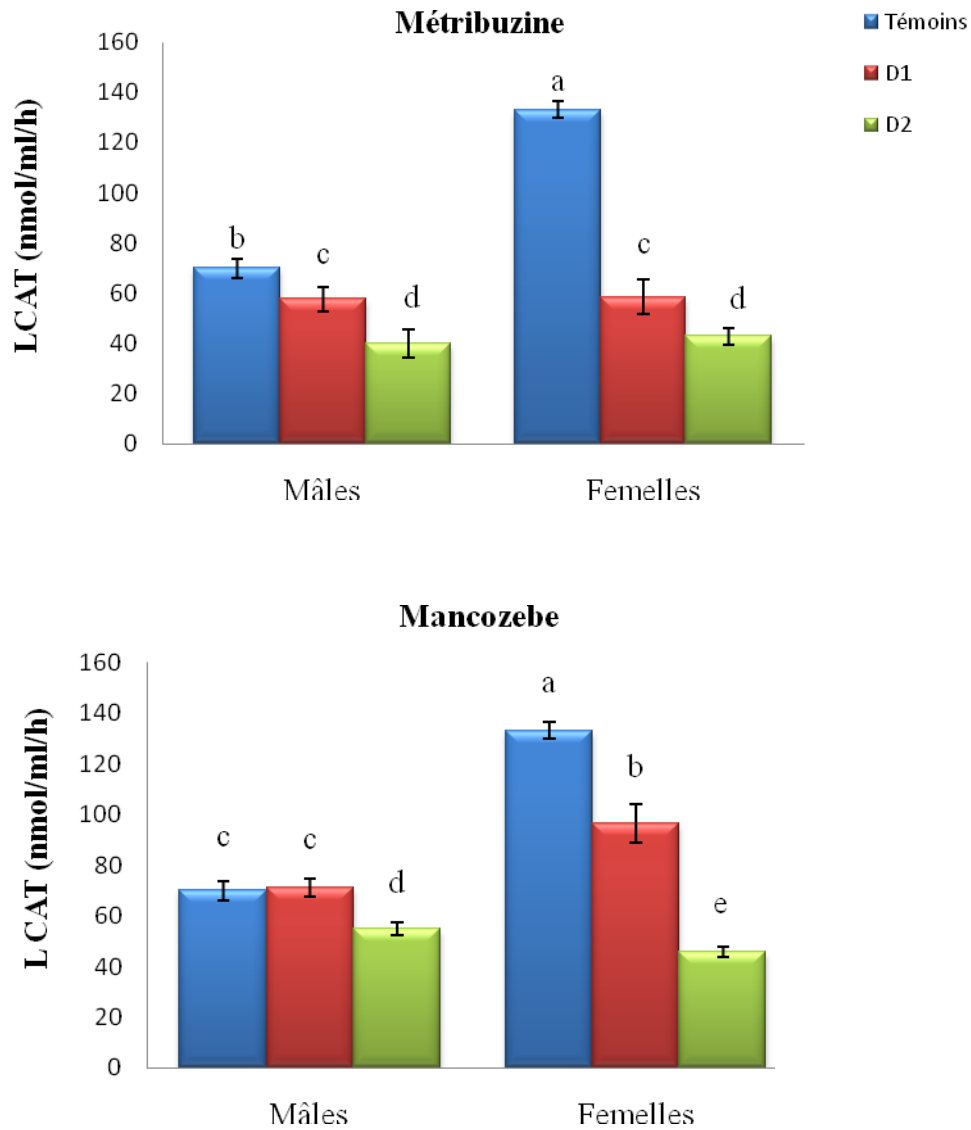


Figure 23: Activité de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine ou le mancozebe. D1 : 1,3 mg/kg/j pour la métribuzine et 5 mg/kg/j pour le mancozebe. D2 : 13 mg/kg/j pour la métribuzine et 50 mg/kg/j pour le mancozebe. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

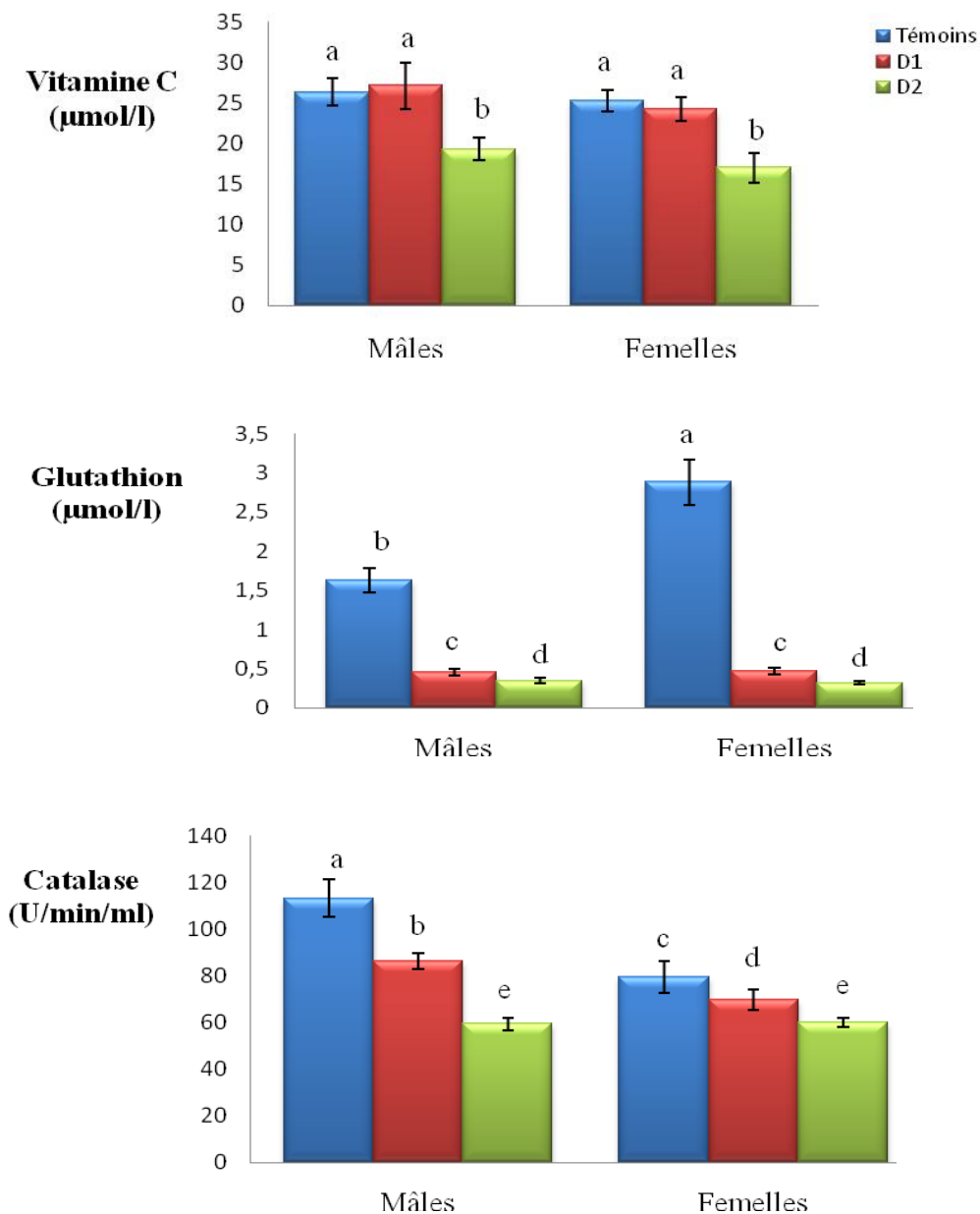


Figure 24: Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

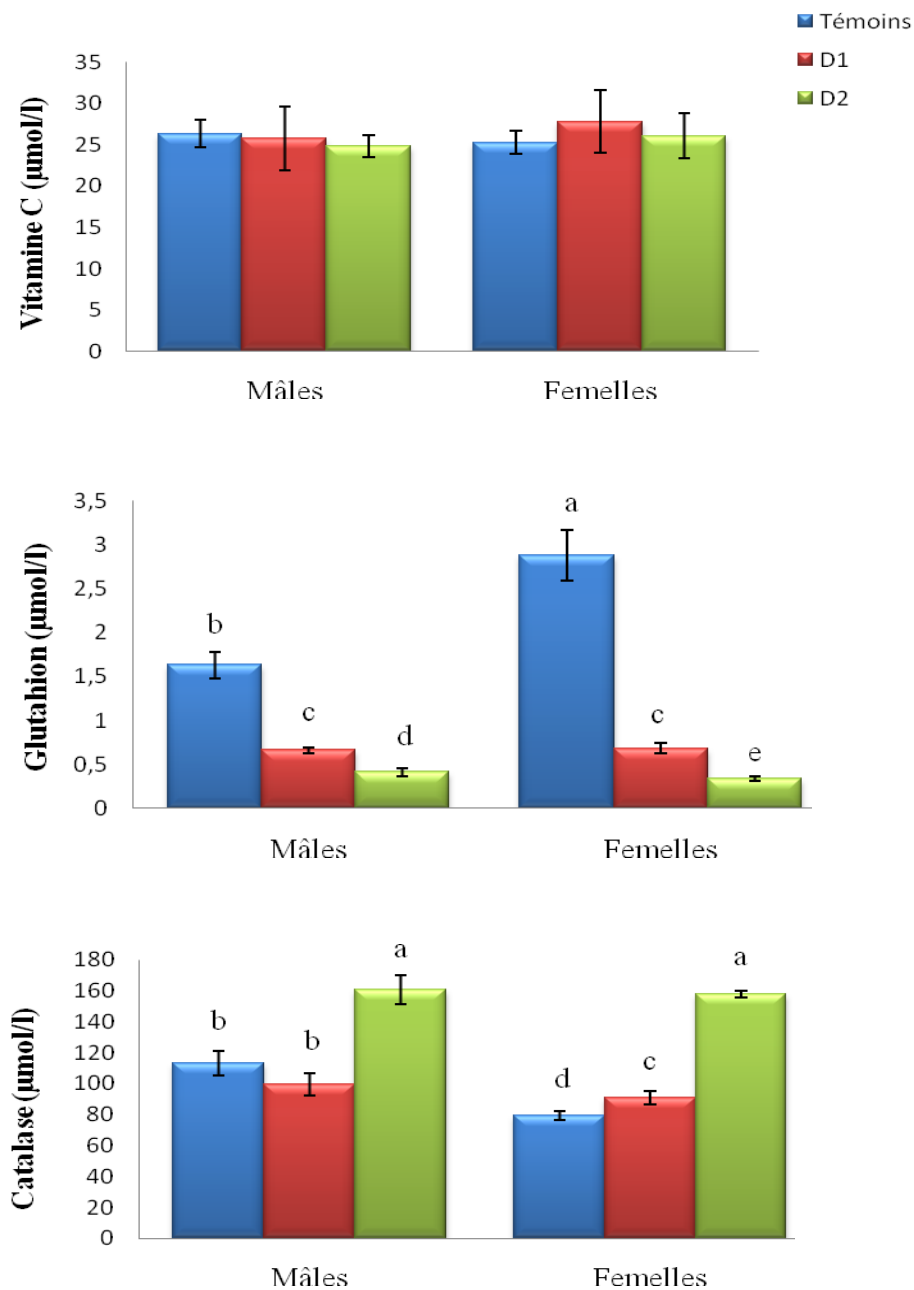


Figure 25: Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

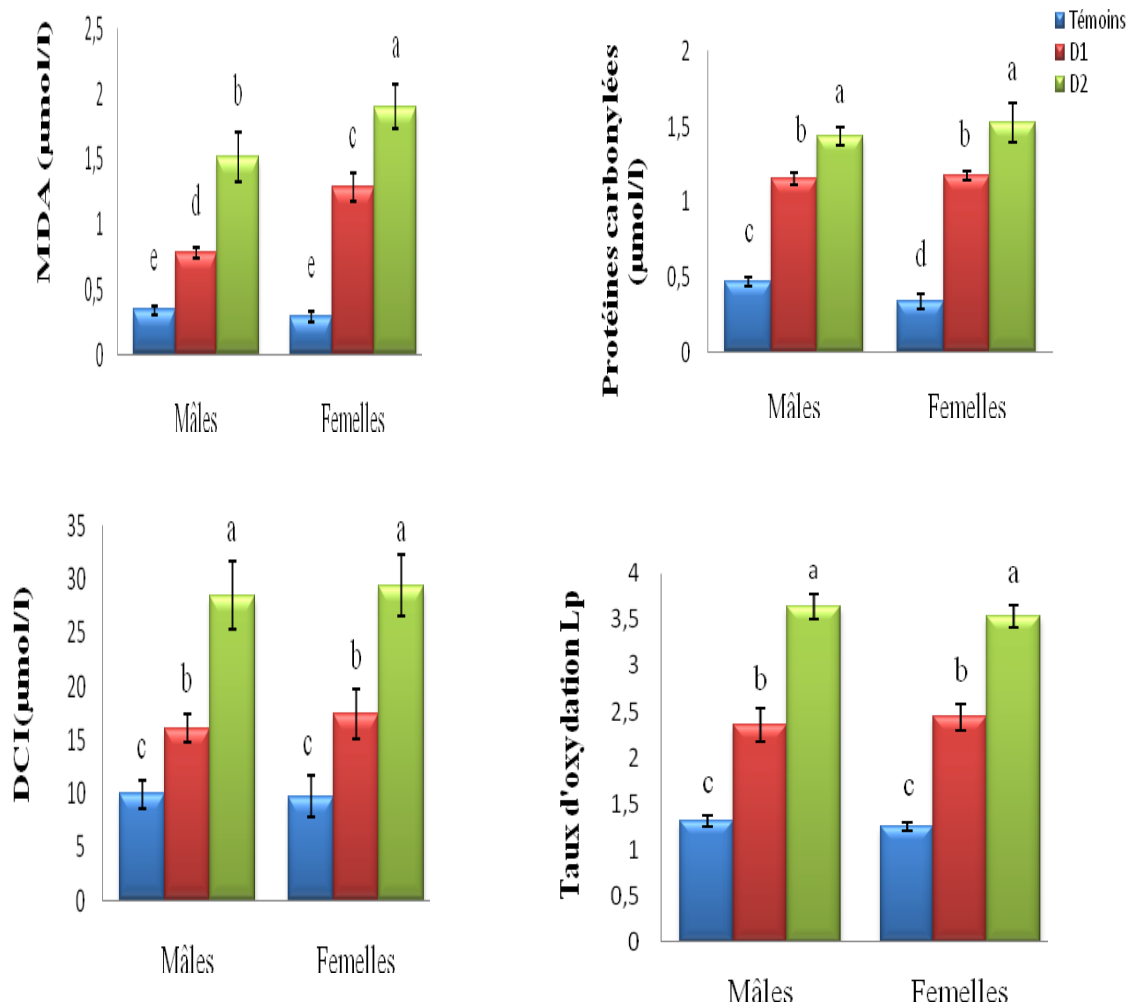


Figure 26: Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde ; DCI : teneurs initiales en diènes conjuguées. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Quelque soit la dose de métribuzine testée (D1 et D2), les teneurs plasmatiques en malondialdéhyde, en protéines carbonylées, en diènes conjugués et le taux d'oxydation sont significativement élevés chez les rats expérimentaux mâles et femelles comparée aux rats témoins respectifs. Cette augmentation est dose dépendante.

II.2.2. Effets du mancozebe (Figure 27 et Tableau A9 en annexe)

Quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D 2), les teneurs plasmatiques en malondialdéhyde, en protéines carbonylées, en diènes conjugués et le taux d'oxydation des lipoprotéines sont significativement augmentés chez les différents lots de rats mâles et femelles comparées aux valeurs témoins respectifs. Cet effet est accentué à la dose D2.

II.3. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant des organes

II.3.1. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie

II.3.1.1. Effets de la métribuzine (Figure 28 et Tableau A10 en annexe)

Quelque soit la dose de métribuzine testée (D 1 et D 2), les rats expérimentaux mâles et femelles montrent une augmentation significative des teneurs hépatiques en MDA et en protéines carbonylées comparés aux rats témoins respectifs. Cette augmentation est dose dépendante.

Par contre, les teneurs hépatiques en glutathion réduit sont significativement diminuées chez les rats expérimentaux mâles et femelles recevant les deux doses de métribuzine comparés aux rats témoins. Cette diminution est plus importante avec la dose 2.

II.3.1.2. Effets du mancozebe (Figure 29 et Tableau A10 en annexe)

Aucune variation des teneurs en MDA au niveau du foie n'est notée chez les différents lots de rats. Quelque soit la dose de mancozebe testée (D 1 et D2), les teneurs hépatiques en protéines carbonylées présentent une augmentation significative chez les rats mâles et femelles comparés aux rats témoins. Cette augmentation est dose dépendante.

Par contre, les teneurs hépatiques en glutathion sont significativement diminuées chez les différents lots de rats mâles et femelles recevant les deux doses de mancozebe comparés à leurs témoins respectifs. Cette diminution est plus importante pour la dose 2 de mancozebe testée.

II.3.2. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle

II.3.2.1. Effets de la métribuzine (Figure 30 et Tableau A11 en annexe)

Les teneurs en malondialdéhyde et en protéines carbonylées musculaires sont significativement augmentées, quelque soit la dose de metribuzine testée (D1 et D2) par

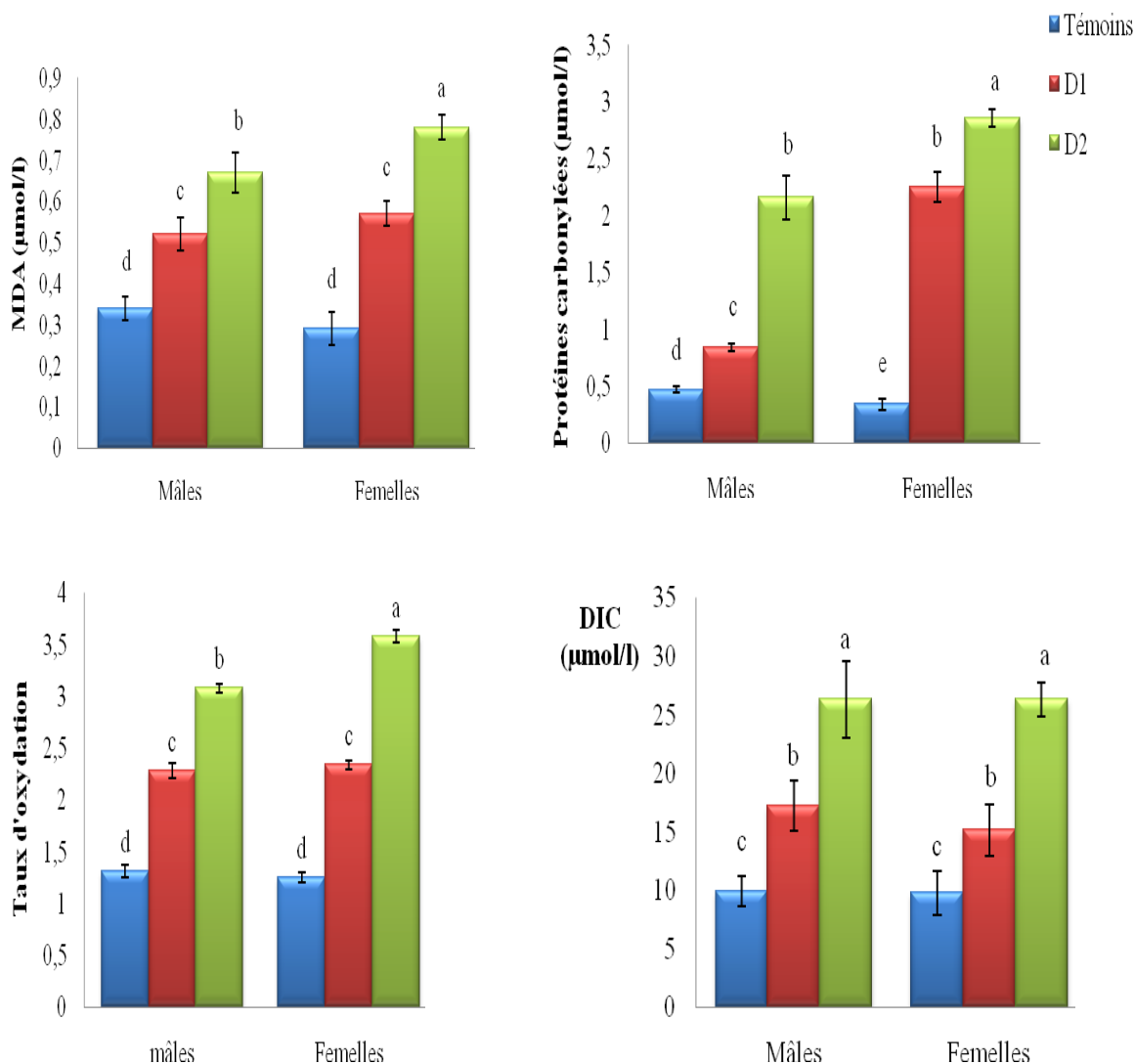


Figure 27: Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde ; DCI : teneurs initiales en diènes conjuguées. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

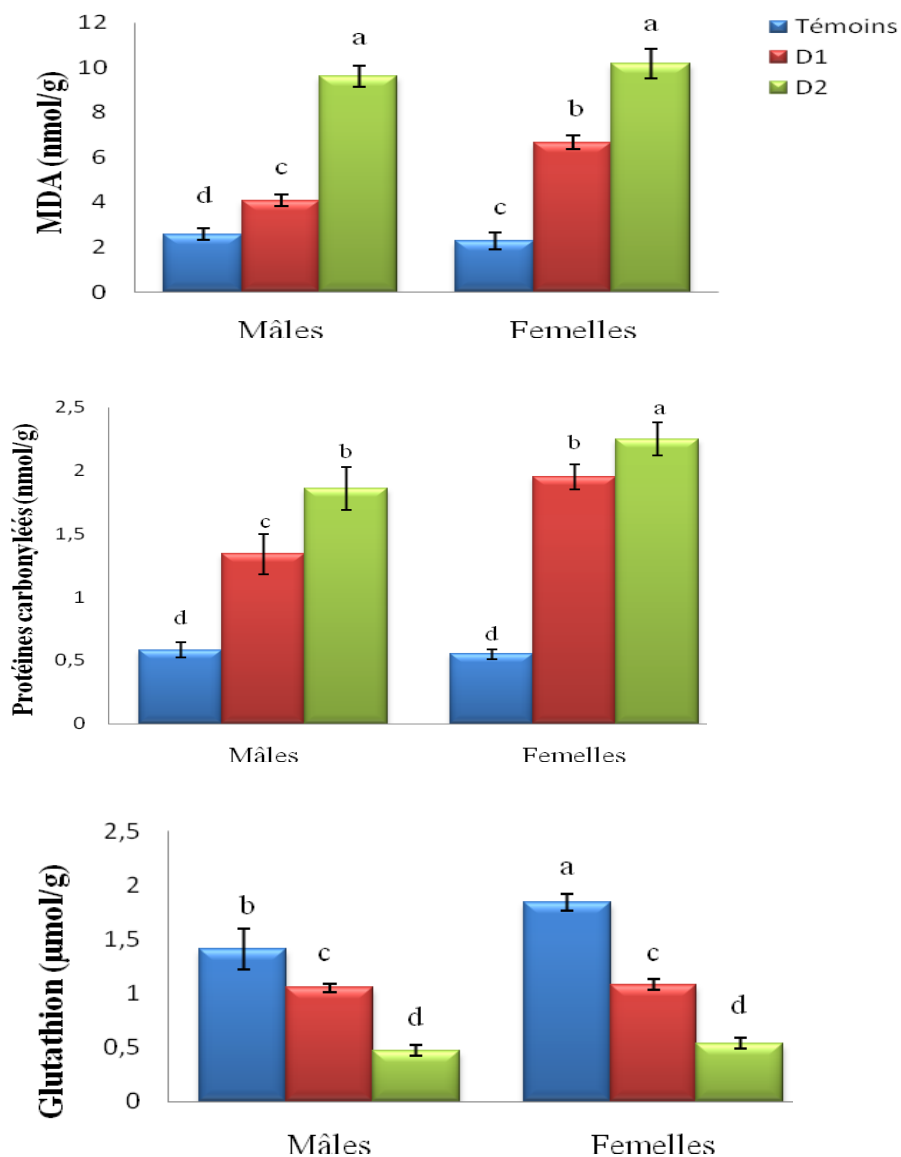


Figure 28: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

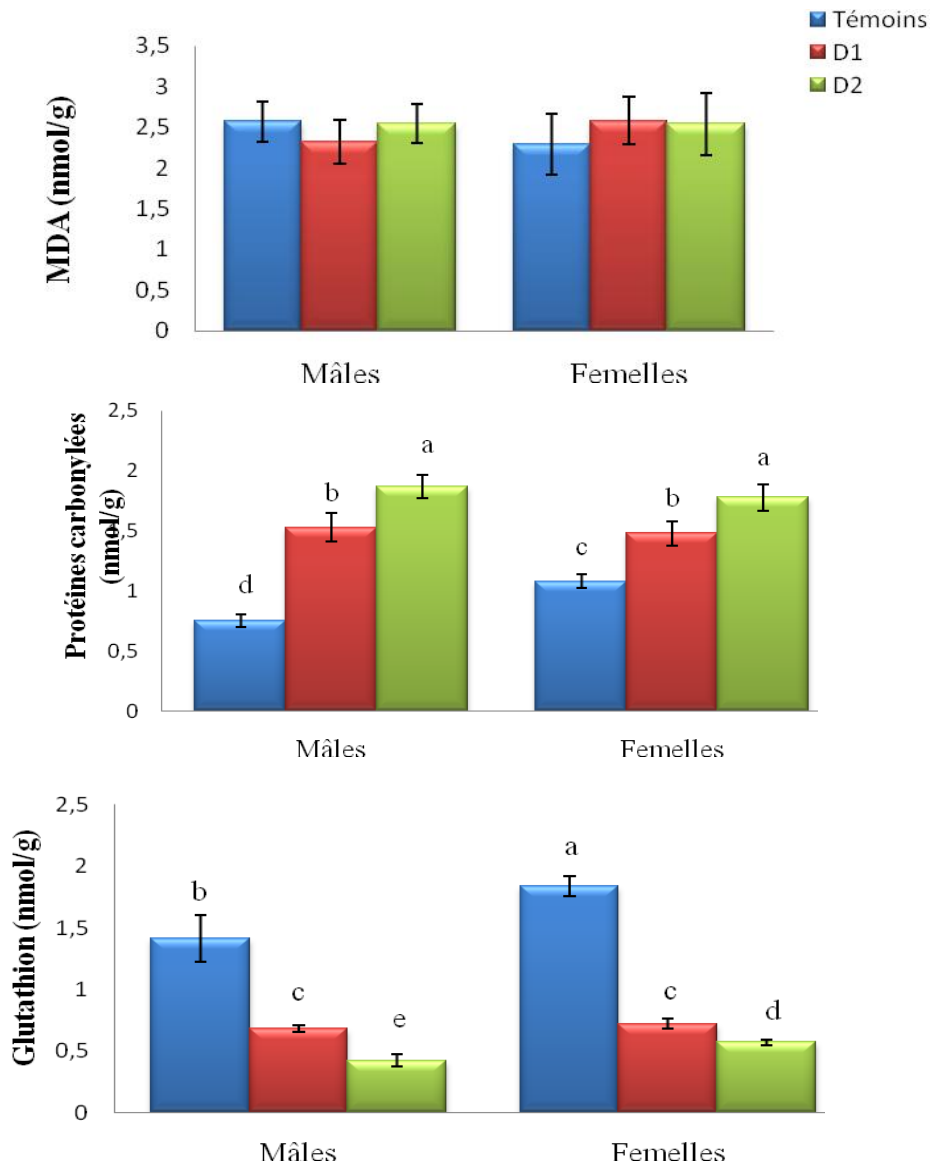


Figure 29: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 : DL50/100 (50 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

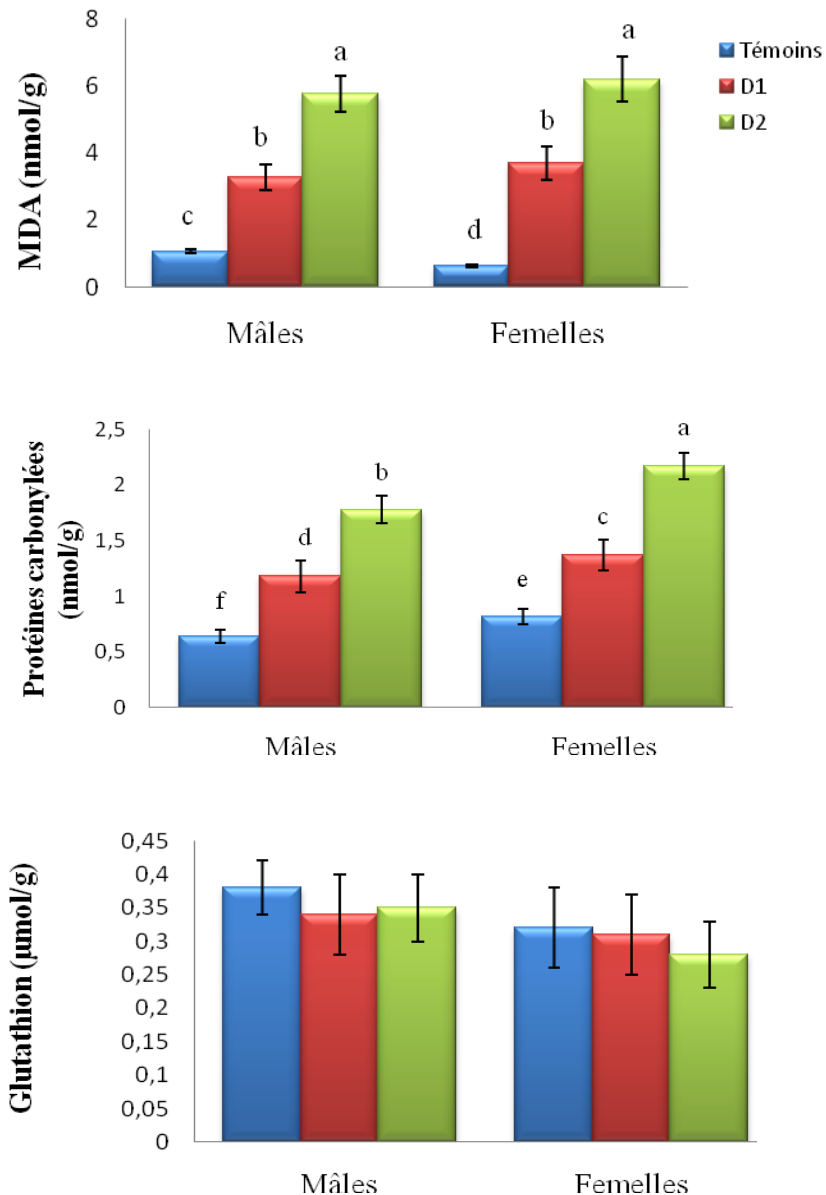


Figure 30: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 : DL50/100 (13 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

rapport aux valeurs témoins. Par contre, aucune variation significative des teneurs en glutathion musculaire n'est notée.

II.3.2.2. Effets du mancozebe (Figure 31 et Tableau A11 en annexe)

Les teneurs en MDA et en protéines carbonylées musculaires montrent une augmentation significative, quelque soit la dose de mancozebe testée par rapport aux valeurs témoins.

De plus, les teneurs en glutathion musculaire sont significativement diminuées chez les rats mâles et femelles comparée à leurs témoins respectifs. Cette diminution est dose dépendante.

II.3.3. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux

II.3.3.1. Effets de la métribuzine (Figure 32 et Tableau A12 en annexe)

Quelque soit la dose de métribuzine (D1 et D2) testée, les teneurs en MDA et en protéines carbonylées du tissu adipeux montrent une augmentation significative chez les rats expérimentaux mâles et femelles comparée aux valeurs témoins. Cette augmentation est accentuée par la dose D2.

Les teneurs en glutathion ne présentent aucune variation significative chez les différents lots de rats.

II.3.3.2. Effets du mancozebe (Figure 33 et Tableau A12 en annexe)

Les teneurs en MDA et en protéines carbonylées sont significativement augmentées chez les rats expérimentaux mâles et femelles comparés à leurs témoins respectifs, quelque soit la dose testée. Alors que les teneurs en glutathion adipocytaire ne montrent aucune différence significative entre les différents lots de rats.

II.3.4. Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin

II.3.4.1. Effets de la métribuzine (Figure 34 et Tableau A 13 en annexe)

Quelque soit la dose de métribuzine testée (D1 et D2), les teneurs en MDA de l'intestin montrent une augmentation significative chez les rats mâles et femelles par rapport à leurs témoins. Cette augmentation est dose dépendante seulement chez le sexe femelle.

Les teneurs en protéines carbonylées sont significativement augmentées chez les rats expérimentaux mâles et femelles recevant les deux doses de métribuzine comparés à leurs témoins respectifs. Cet effet est accentué avec la dose D2.

Par contre, les teneurs en glutathion de l'intestin ne varient pas chez les différents lots de rats.

II.3.4.2. Effets du mancozebe (Figure 35 et Tableau A13 en annexe)

Aucune variation significative n'est notée concernant les teneurs en MDA, en protéines carbonylées et en glutathion de l'intestin chez les différents lots de rats mâles et femelles.

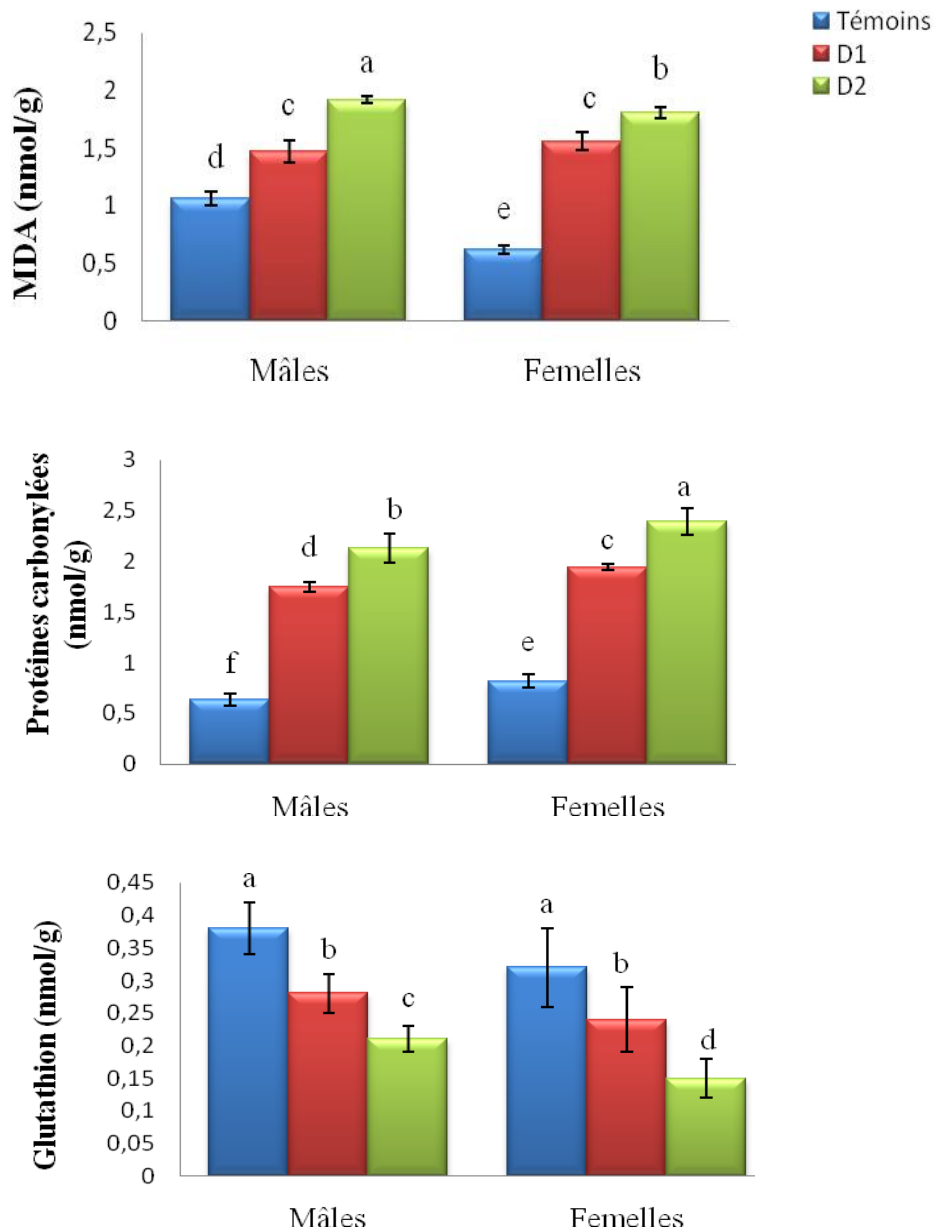


Figure 31: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 : DL50/100 (50 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

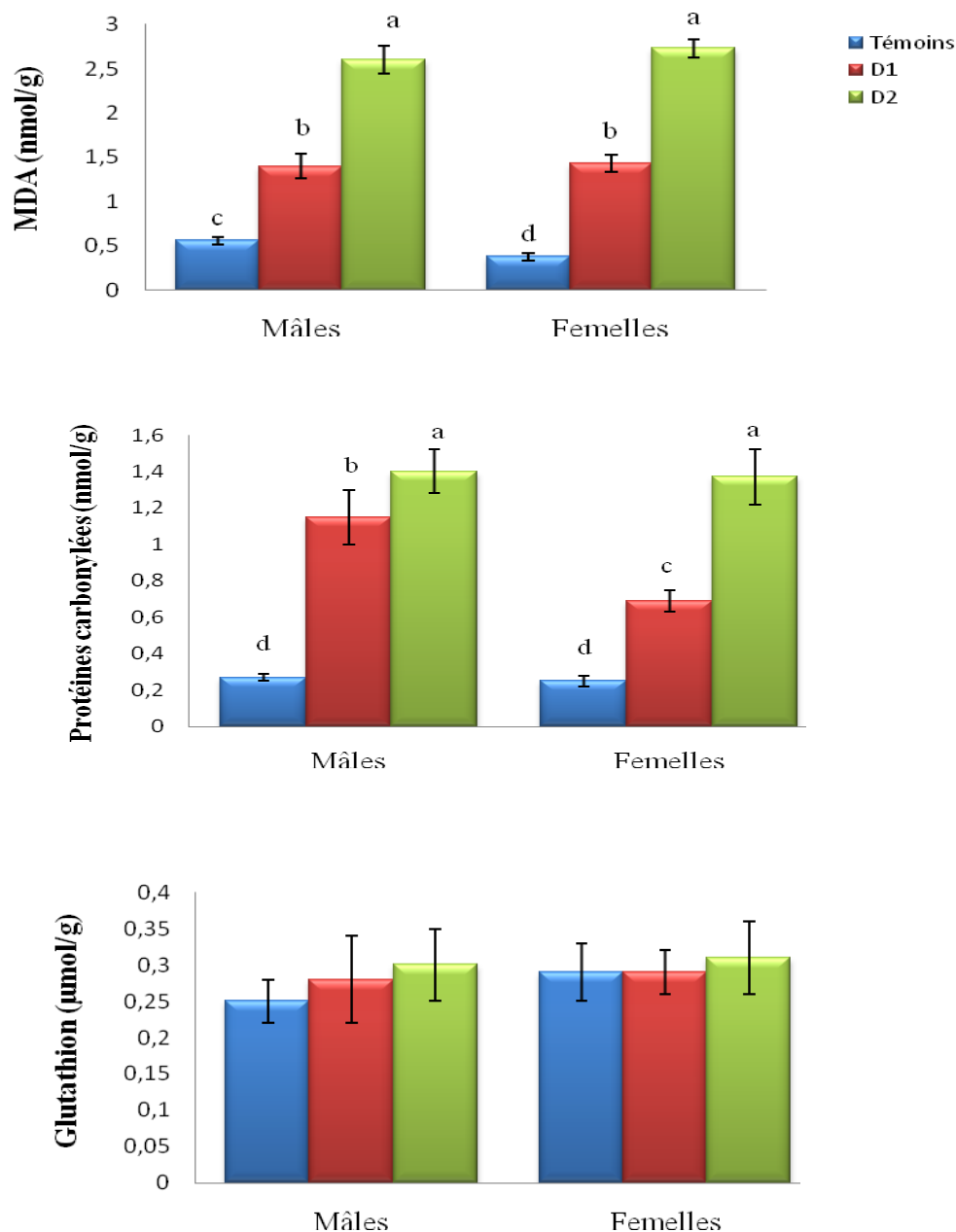


Figure 32: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

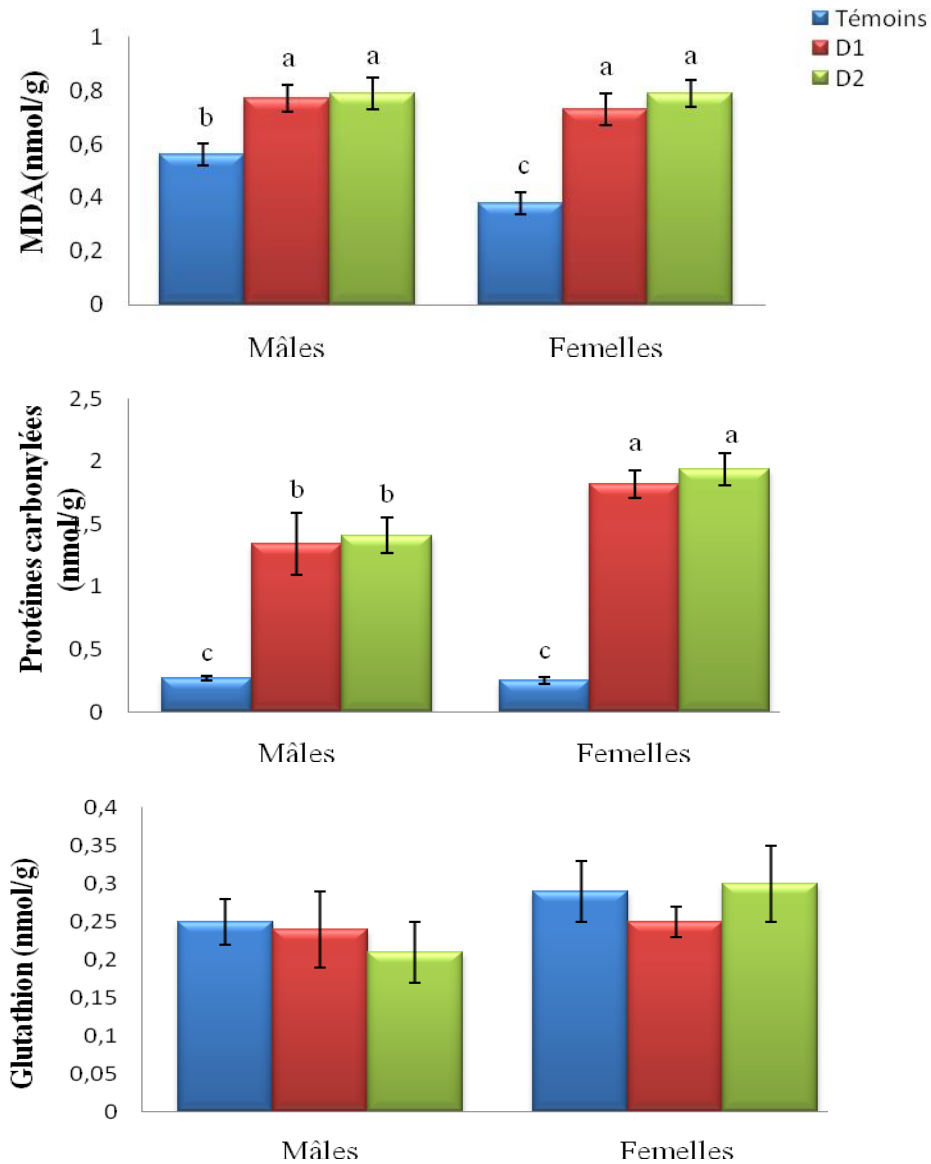


Figure 33: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes (P < 0,05).

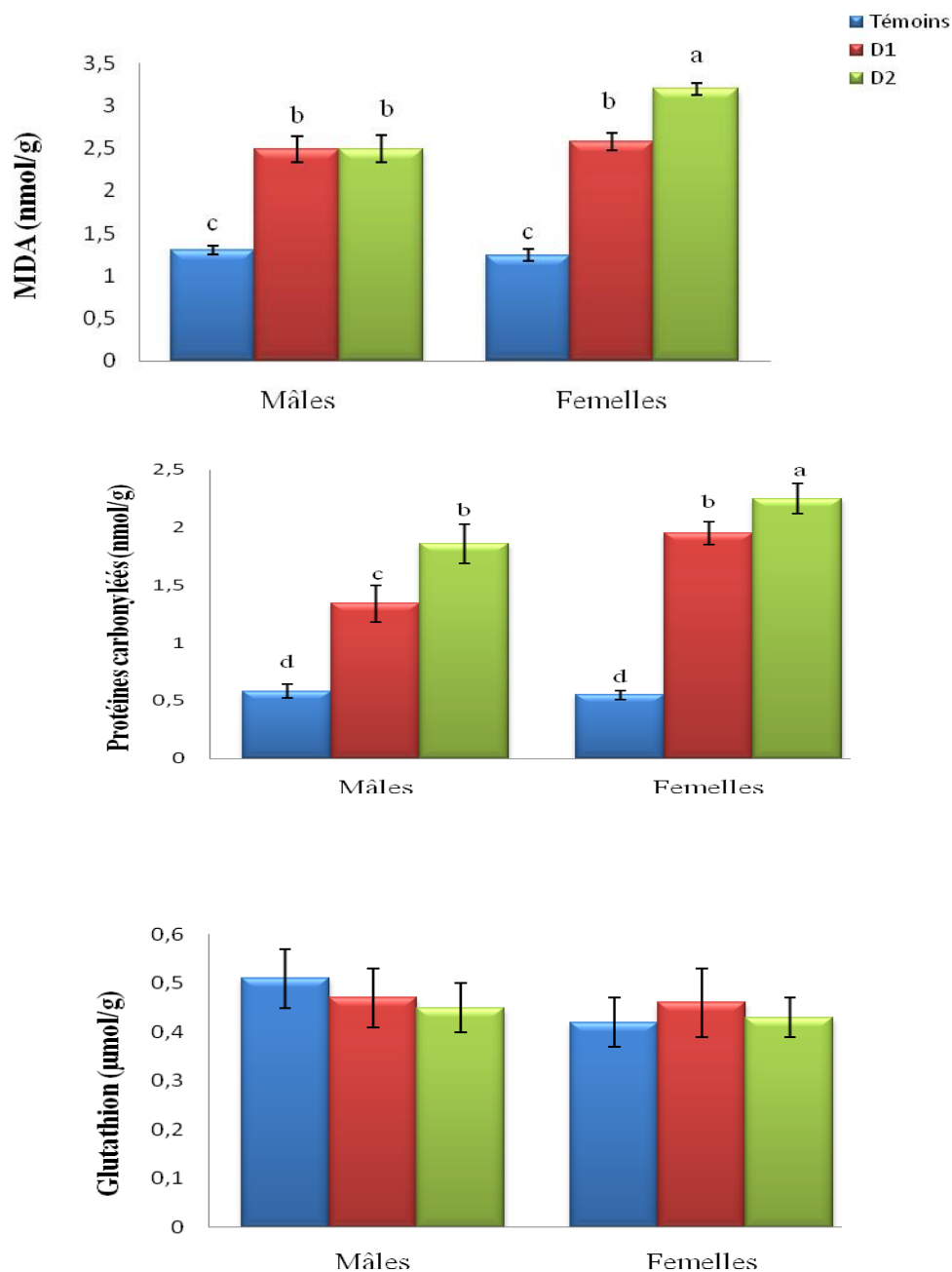


Figure 34 : Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine. D1 : dose de métribuzine sans effet (1,3 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (13 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

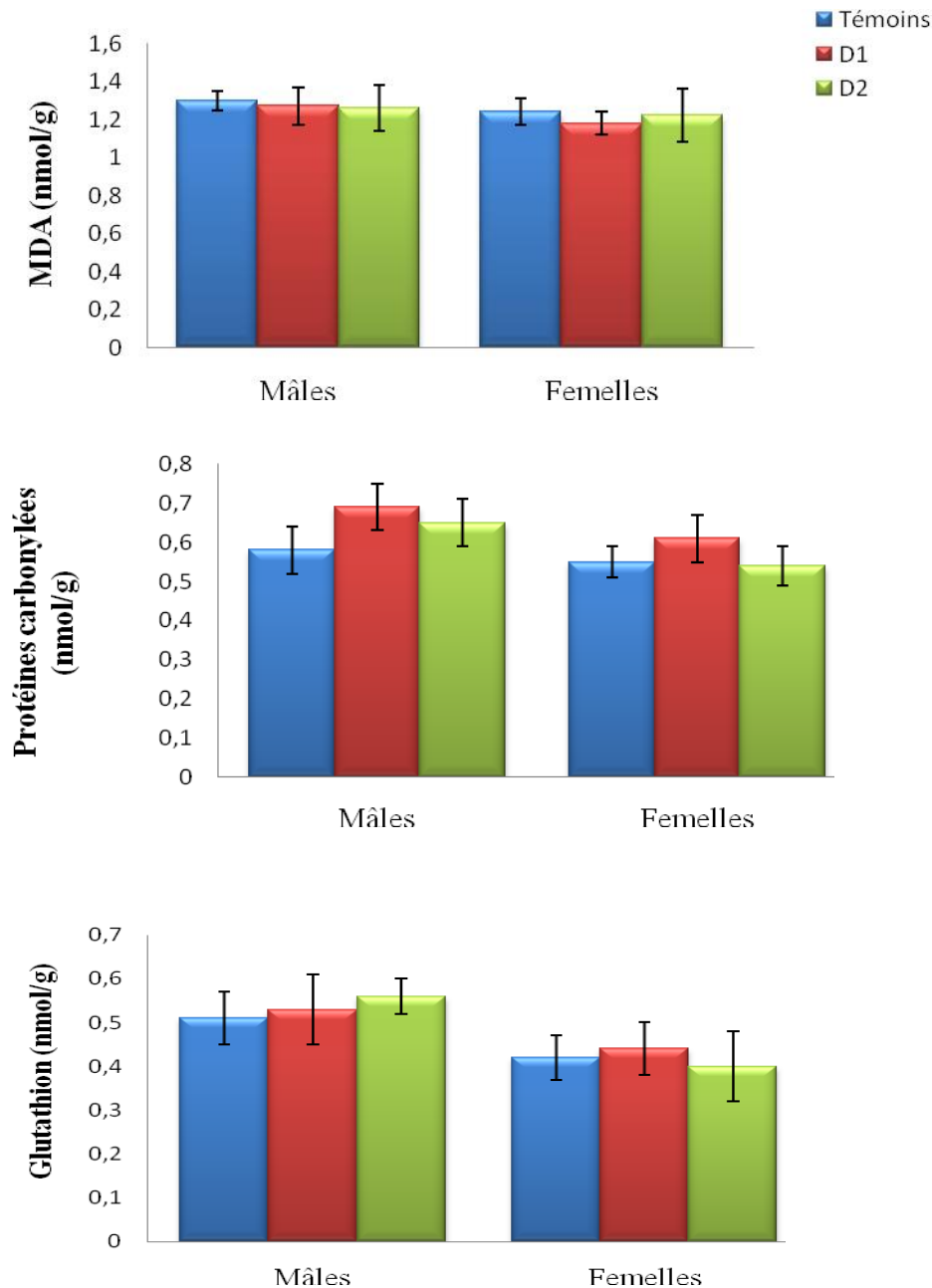


Figure 35: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant le mancozebe. D1 : dose du mancozebe sans effet (5 mg/kg/j) ; D2 :DL50/100 (50 mg/kg/j). MDA : malondialdéhyde. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro – Wilk), la comparaison des moyennes entre les six groupes de rats mâles et femelles est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c, d,) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

III. Analyse histologique des organes

Dans le but de voir si l'administration de la métribuzine ou du mancozebe s'accompagne ou non d'une altération de l'architecture tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau des organes (foie, muscle, tissu adipeux et intestin) chez les rats témoins et chez les rats traités par la métribuzine et par le mancozebe. L'examen histologique est conçu dans le but de compléter nos résultats précédents.

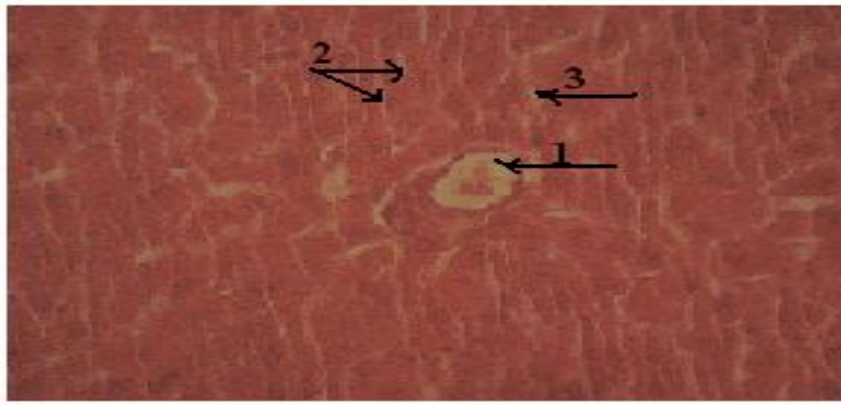
III.1. Effet de la métribuzine

Au niveau du foie : l'analyse histologique au niveau du foie après coloration à l'hématoxyline-Eosine, montre la présence d'un infiltrat lymphocytaires péri vasculaire (veine centrolubulaire) sous forme d'un manchon chez les rats traités par la métribuzine à la dose D1. Pour les rats recevant la metribuzine à la dose D2, l'analyse histologique montre une désorganisation architecturale, un infiltrat lymphocytaire au niveau de la veine centrolobulaire et l'espace porte par rapport aux rats témoins qui présente un parenchyme hépatique normal contenant une veine centrolobulaire bien visible. Chez les rats témoins, les travées hépatiques dont les hépatocytes qui sont des cellules spécifiques du foie, ont l'aspect de cellules volumineuses, possédant un ou deux noyaux, un nucléole volumineux, un cytoplasme éosinophile et granuleux dont les plages claires sont l'emplacement de glycogène et des capillaires sinusoides entre les travées hépatiques (**Figure 36**).

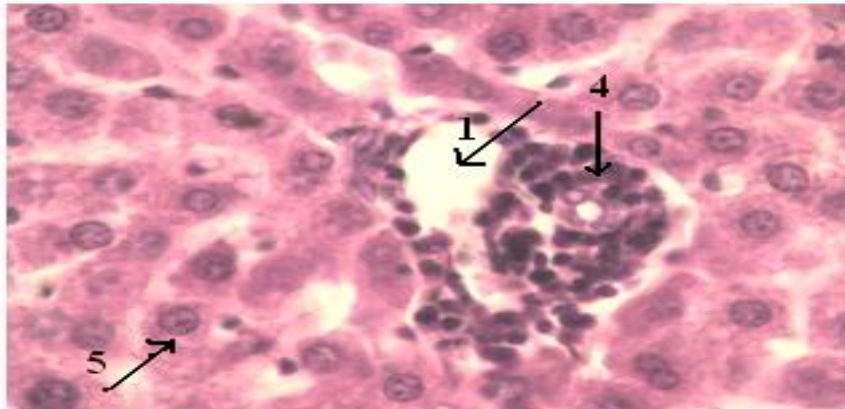
Au niveau du muscle gastrocnémien: l'étude histologique au microscope optique en coupe longitudinale réalisée au niveau du muscle révèle la présence d'un infiltrat inflammatoire dense, un œdème et quelques fibres dissociées chez les rats expérimentaux recevant la dose D1 de métribuzine.

Concernant les rats traités par la metribuzine à la dose D2, les cellules musculaires sont hypertrophiées, dissociées avec présence d'œdème et d'un infiltrat inflammatoire comparées aux cellules musculaires des rats témoins. Chez ces derniers, les cellules musculaires ont la forme d'un cylindre allongé, possédant plusieurs noyaux situés en périphérie de la cellule, contre sa membrane plasmique. Le cytoplasme riche en mitochondries, possède des striations indiquant la présence des disques clairs et disques sombres (**Figure 37**).

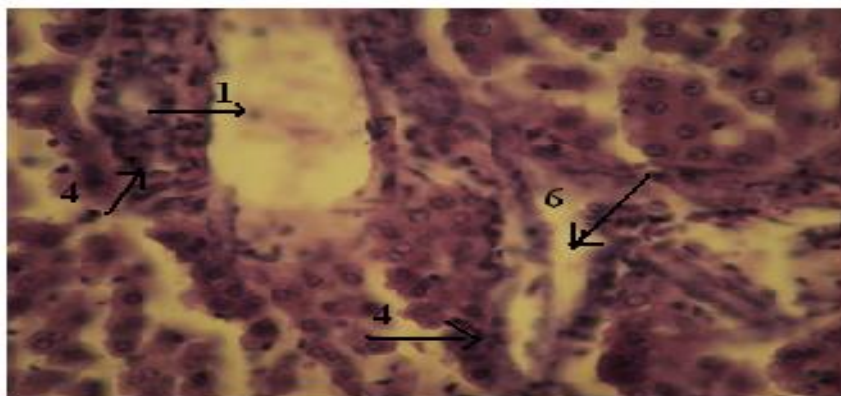
Au niveau du tissu adipeux : l'analyse histologique du tissu adipeux, chez les rats expérimentaux consommant la metribuzine à dose D1 et D2 montre une inégalité des tailles des adipocytes par rapport aux rats témoins qui présentent au microscope optique, des adipocytes sous forme de cellules sphériques et de taille presque identique.



(A)

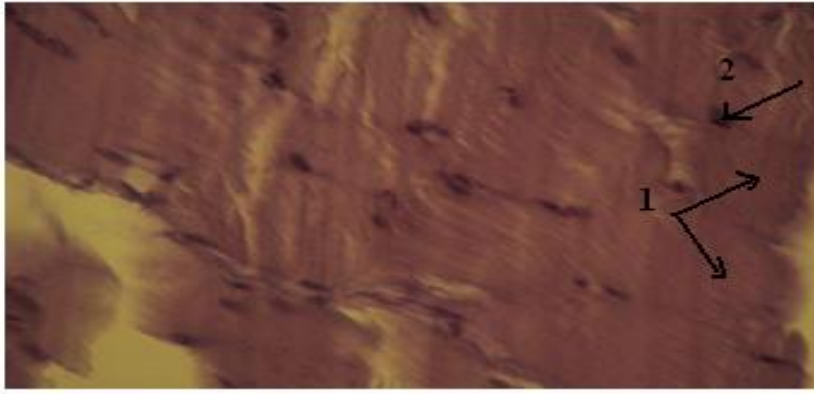


(B)

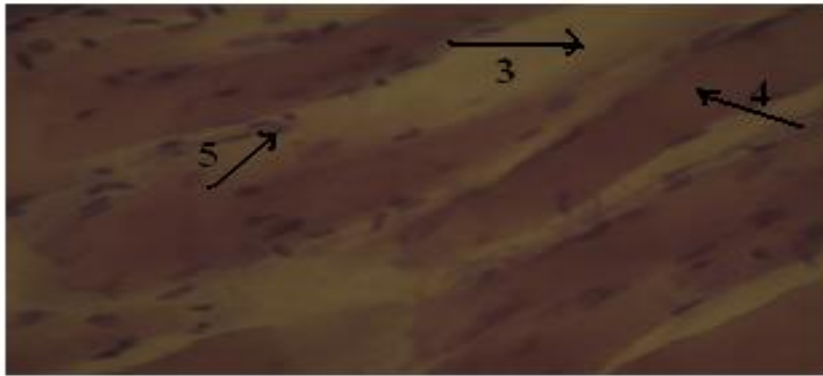


(C)

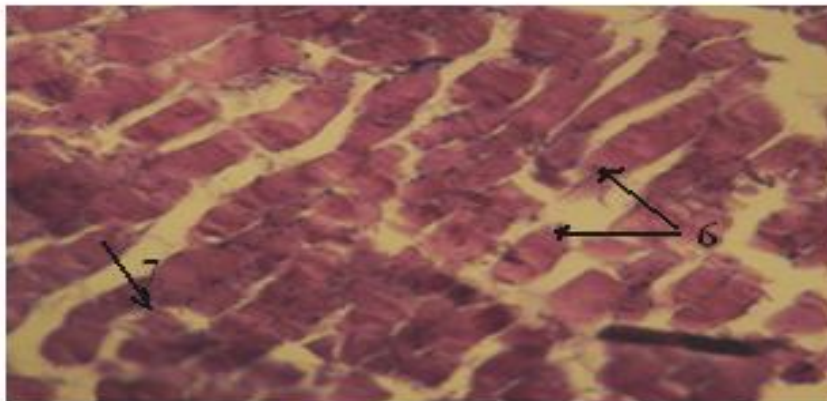
Figure 36 : Coupes histologiques de foie de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (1,3 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (13 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. **1** : veine centrolobulaire ; **2** : travée hépatique ; **3** : capillaire sinusöide ; **4** : infiltrat lymphocytaire ; **5** : hépatocyte ; **6** : espace porte.



(A)



(B)



(C)

Figure 37 : Coupes histologiques du muscle de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (1,3 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (13 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. **1** : fibres musculaires ; **2** : noyau ; **3** : disques clairs ; **4** : disques sombres ; **5** : infiltrat inflammatoire ; **6** : fibres dissociées ; **7** : hypertrophie.

Leur cytoplasme renferme une volumineuse vacuole lipidique unique (triglycéride), entourée par une mince couronne cytoplasmique avec un noyau aplati refoulé contre la membrane plasmique (**Figure 38**).

Au niveau du l'intestin : l'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau du l'intestin grêle chez les rats expérimentaux recevant la dose D1 révèle la présence d'une muqueuse inflammatoire avec hyperplasie du follicule lymphoïde.

Chez les rats recevant la dose D2 de métribuzine, l'analyse microscopique révèle la présence d'un infiltrat inflammatoire dense et les glandes détruites par rapport aux rats témoins qui présentent une muqueuse bien visible comportant de nombreuses villosités et microvillosités destinées à augmenter la surface d'échanges (**Figure 39**).

III.2. Effet de mancozebe

Au niveau du foie : l'analyse histologique au niveau du foie après coloration à l'hématoxyline_Eosine montre un infiltrat inflammatoire périvasculaire (veine centrolobulaire) chez les rats expérimentaux quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2), comparés à leurs témoins (**Figure 40**).

Au niveau du muscle gastrocnémien : l'analyse au microscopique optique des coupes longitudinales du muscle gastrocnémien montre chez les rats consommant le mancozebe à la dose D1 la présence d'un infiltrat discret inflammatoire au niveau des cellules musculaires.

Concernant les rats consommant le mancozebe à la dose D2, l'analyse histologique du muscle montre une dissociation des fibres musculaires et la présence de l'œdème (**Figure 41**).

Au niveau du tissu adipeux : quelque soit la dose de mancozebe testée (D1 et D2) données aux rats expérimentaux, l'analyse au microscope des coupes histologiques du tissu adipeux montre un discret infiltrat inflammatoire au niveau des adipocyte par rapport aux rats témoins qui présentent une architecture adipocytaire normale (**Figure 42**).

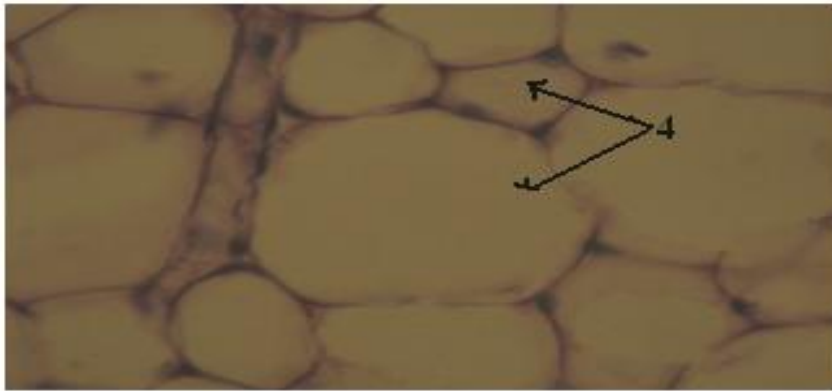
Au niveau du l'intestin : l'analyse histologique réalisé au niveau du l'intestin révèle une architecture anormale chez les rats expérimentaux comparés aux rats témoins.

En effet, chez les rats recevant le mancozebe à dose D1, l'observation microscopique révèle des glandes rares, un infiltrat inflammatoire et la nécrose des cellules interstitielles.

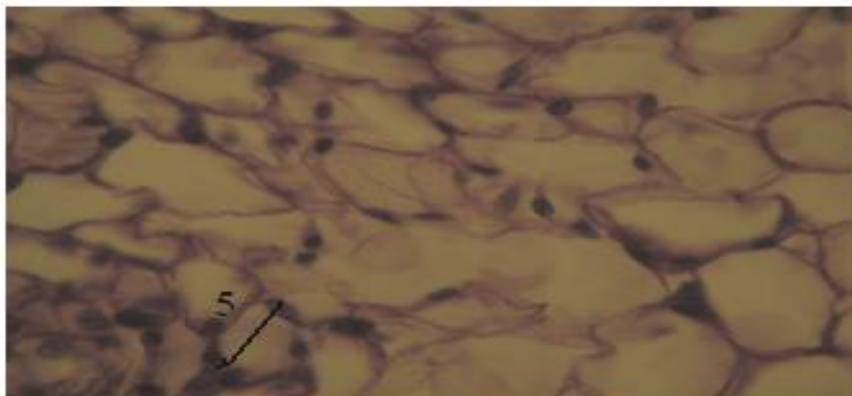
Concernant les rats recevant la dose D2 de moncozebe, l'observation microscopique montre une ulcération, des glandes rares et un infiltrat dense (**Figure 43**).



(A)

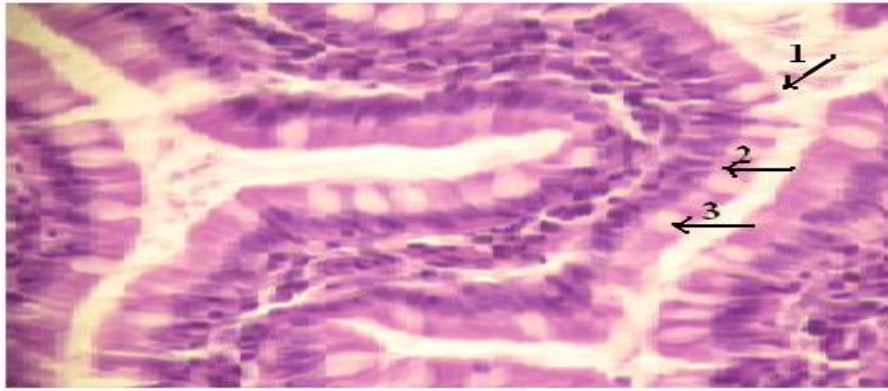


(B)

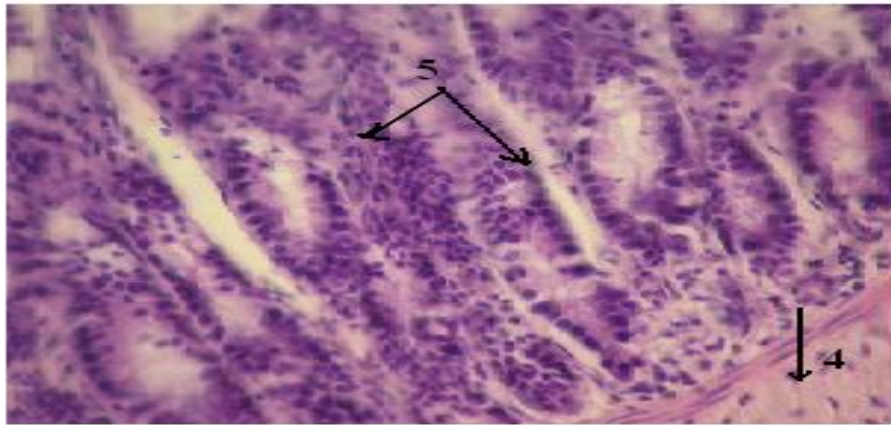


(C)

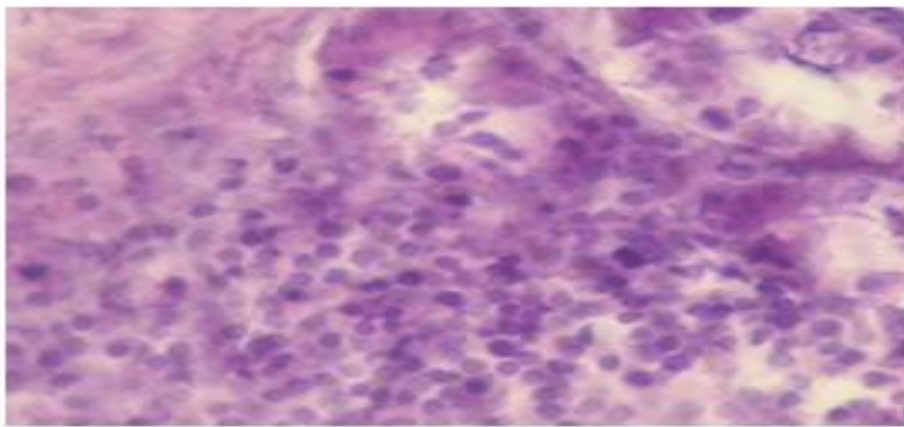
Figure 38 : Coupes histologiques du tissu adipeux de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (1,3 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (13 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. **1** : adipocyte ; **2** : noyau ; **3** : cytoplasme ; **4** adipocytes de tailles différentes ; **5** : infiltrat inflammatoire.



(A)

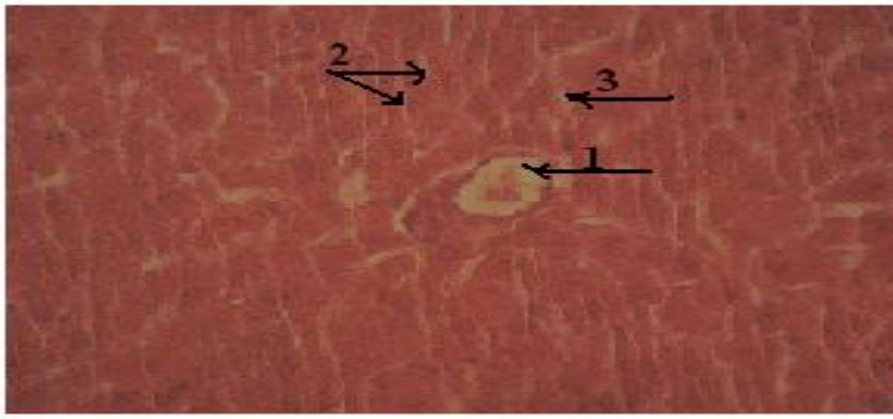


(B)

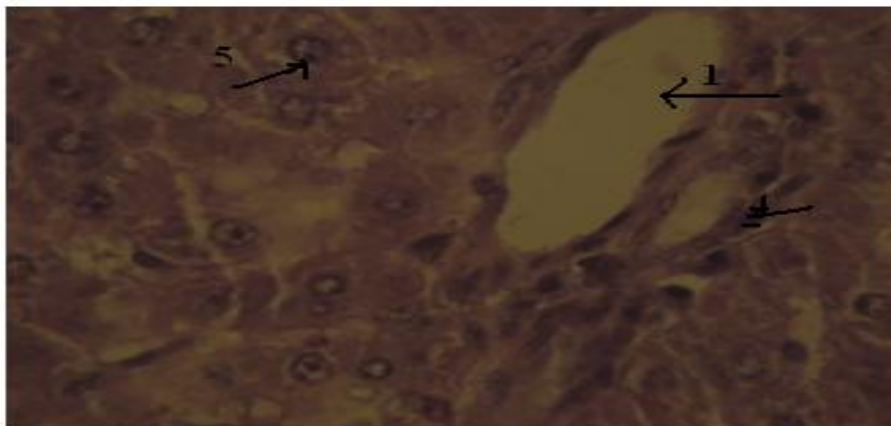


(C)

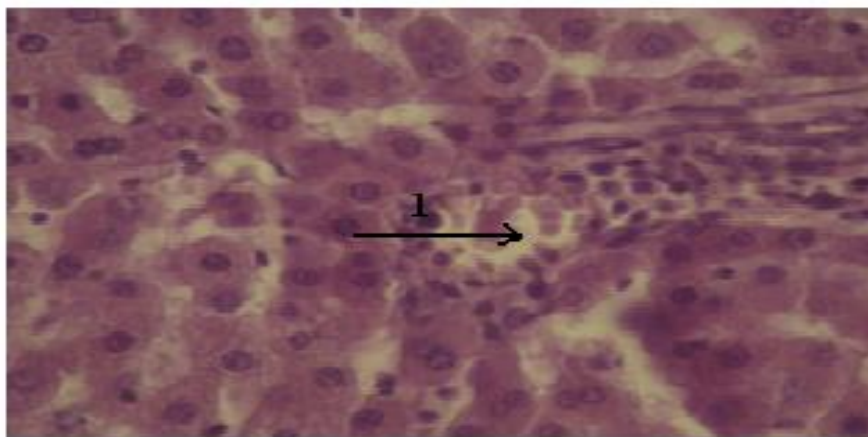
Figure 39 : Coupes histologiques de l'intestin de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (1,3 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (13 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. 1 : villosité intestinale ; 2 : entérocyte ; 3 : noyau ; 4 la sous muqueuse ; 5 : muqueuse inflammatoire.



(A)

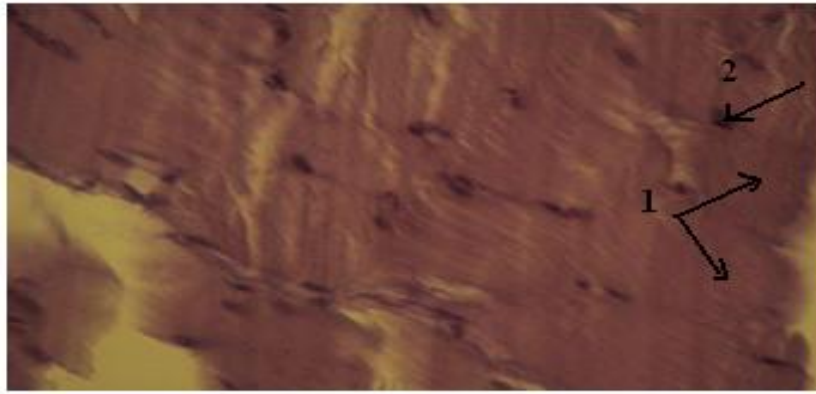


(B)

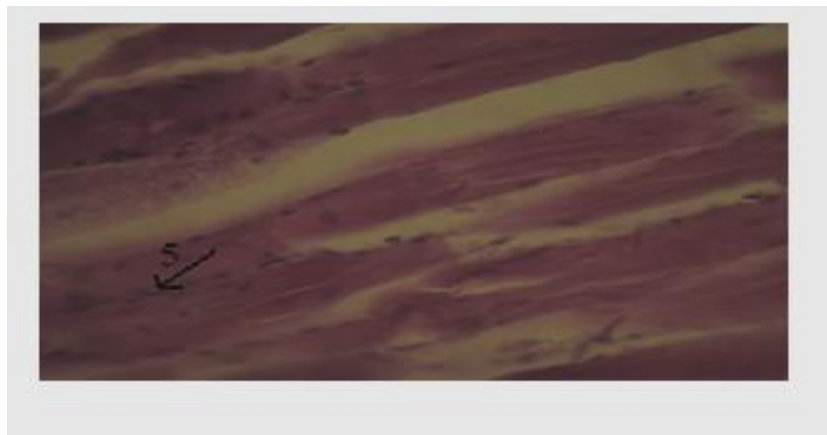


(C)

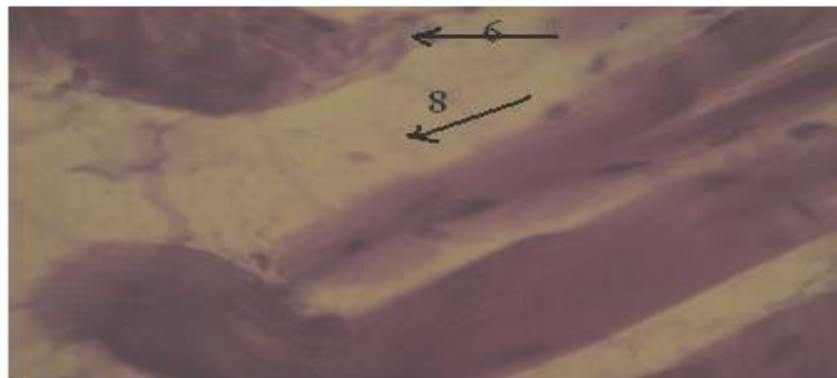
Figure 40: Coupes histologiques de foie de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (5 mg/kg/j) du mancozebe Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (50 mg/kg/j) du mancozebe Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. **1** : veine centrolobuaire ; **2** : travée hépatique ; **3** : capillaire sinusoiide ; **4** : infiltrat lymphocytaire ; **5** : hépatocyte.



(A)

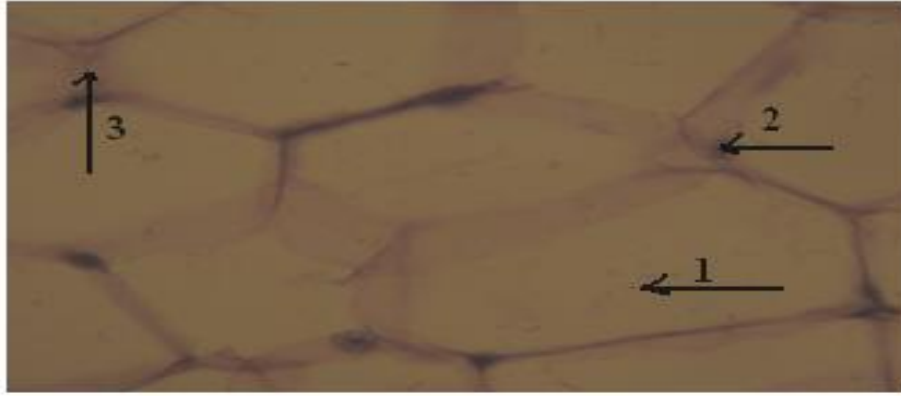


(B)

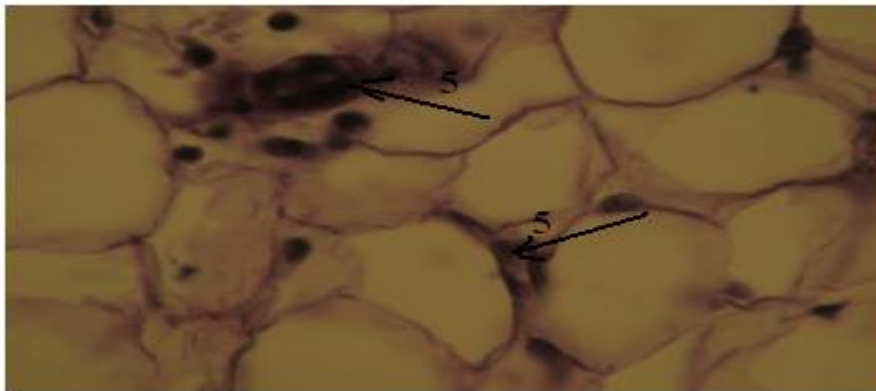


(C)

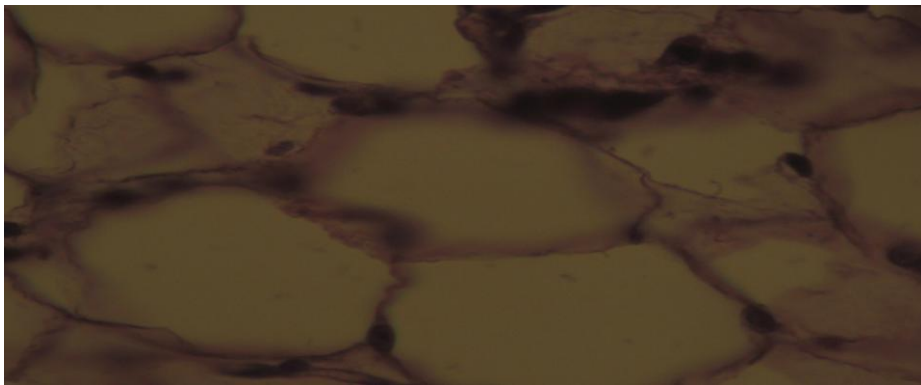
Figure 41 : Coupes histologiques du muscle de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (5 mg/kg/j) du mancozebe Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (50 mg/kg/j) du mancozebe Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. **1** : fibres musculaires ; **2** : noyau ; **5** : infiltrat inflammatoire ; **6** : fibres dissociées ; **7** : hypertrophie ; **8** : œdème.



(A)

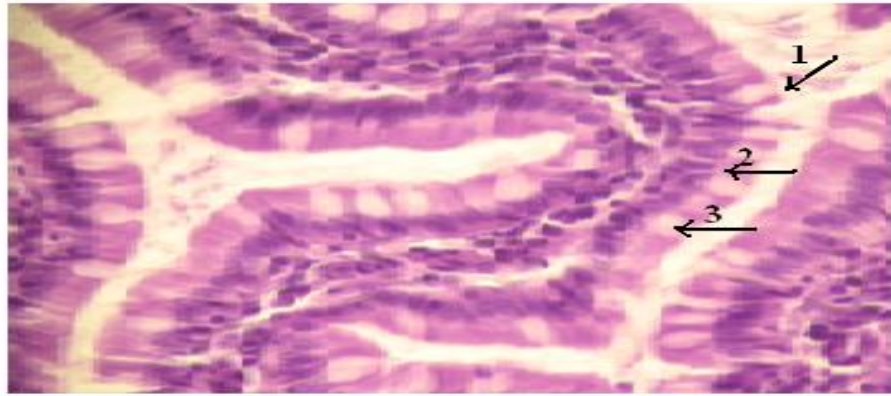


(B)

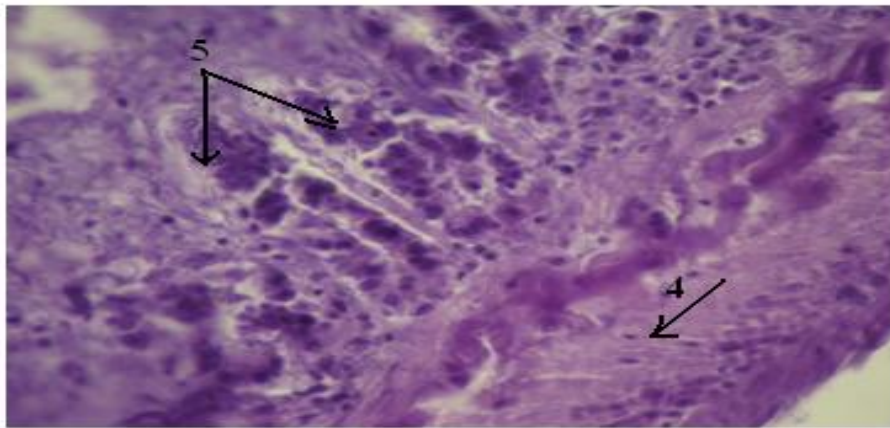


(C)

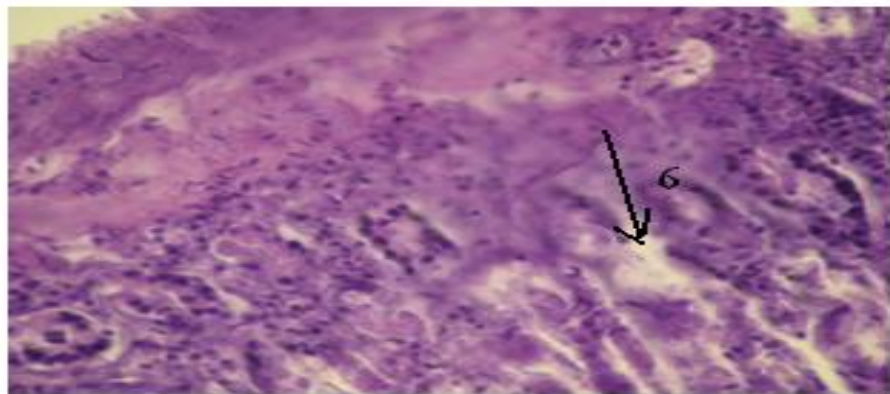
Figure 42 : Coupes histologiques du tissu adipeux de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (5 mg/kg/j) du mancozebe Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (50 mg/kg/j) du mancozebe Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. **1** : adipocyte ; **2** : noyau ; **3** : cytoplasme ; **5** : infiltrat inflammatoire.



(A)



(B)



(C)

Figure 43 : Coupes histologiques de l'intestin de rat témoin Gr X 40(A), rats expérimentaux recevant la dose D1 (1,3 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (B) et rats expérimentaux recevant la dose D2 (13 mg/kg/j) de la métribuzine Gr X 40 (C). EP : espace porte. Gr : grossissement. **1** : villosité intestinale ; **2** : entérocyte ; **3** : noyau ; **4** la sous muqueuse ; **5** : muqueuse inflammatoire ; **6** : ulcération.

DISCUSSION

Le développement de l'agriculture et la volonté d'augmenter les rendements ont conduit à une utilisation croissante des pesticides. Il demeure important de rappeler que les pesticides sont des produits toxiques et qu'ils doivent être utilisés de façon rationnelle et sécuritaire.

Les pesticides, qu'ils soient naturels ou de synthèse (la majorité), sont des produits biologiquement actifs et donc intentionnellement toxiques pour les organismes cibles. Du fait de leur dangerosité intrinsèque, le contact inopiné de ces substances avec des cibles non désignées risque d'entraîner des troubles graves pour ces dernières. L'homme constitue l'une de ces cibles involontaires du fait qu'il est l'applicateur de ces substances mais aussi, par exemple, consommateur de ressources alimentaires contaminées par des résidus. Ces deux contextes d'exposition aux pesticides, professionnel et environnemental, soulignent deux risques bien différents, le premier lié à des expositions habituellement élevées, le second associé à des expositions généralement très faibles mais répétées dans le temps (Multigner, 2005). Certains indices de toxicité tant aiguë que chronique peuvent être utilisés pour évaluer le niveau de risque ou le degré de toxicité des pesticides. La DL50 (dose létale 50) est un indice du degré de toxicité aiguë d'un produit chimique. Cette valeur exprime la dose qui est mortelle pour 50% d'un groupe expérimental d'animaux de laboratoire. Ainsi, plus la valeur de la DL50 sera faible, plus le produit sera toxique. Cet indice est généralement déterminé suite à l'administration orale (DL50 orale) et cutanée (DL50 cutanée) du produit (Onil et Louis, 2001).

De nombreuses études épidémiologiques ont établi des liens plus ou moins importants entre l'exposition professionnelle aux pesticides et certaines formes de cancers, observés pour le lymphome non hodgkinien, la leucémie, les sarcomes, le myélome multiple, le cancer du cerveau, le cancer de la prostate et le lymphome de Hodgkin (Onil et Louis, 2001).

Des expériences sur des animaux ont permis de démontrer que certains produits chimiques, y compris des ingrédients actifs de pesticides, ont une activité semblable à celle d'hormones et ont des effets nocifs sur l'homéostasie endocrinienne (Grunfeld et Bonfeld-Jorgensen, 2004; Andersen et al., 2002).

De fait, l'incidence accrue d'anomalies de développement et de plusieurs maladies hormonales a contribué à une prise de conscience de ce que des contaminants présents dans l'environnement peuvent nuire à la santé humaine en perturbant les fonctions endocriniennes (Phillips et Tanphaichitr, 2008; McLachlan et al., 2006; Foster et al., 2004).

Les contaminants présents dans l'environnement pourraient aussi intervenir dans d'autres maladies liées au système hormonal, dont l'hypothyroïdie, le diabète, l'obésité, le trouble déficitaire de l'attention et le syndrome hypercinétique, l'endométriase et la polykystose ovarienne. Ces produits chimiques pourraient donc jouer un rôle dans les modifications observées de la santé humaine (Bourguignon et Parent, 2010; Grun et Blumberg, 2009; Hotchkiss et al., 2008).

Certains pesticides ou mélanges de pesticides pourraient aussi être responsables d'effets génétiques, ces derniers sont très cumulatifs lors d'exposition répétitive à des mélanges complexes de pesticides (Bolognesi, 2003).

Les fongicides et les herbicides constituent un moyen de lutte, le plus efficace contre les maladies majeures des plantes cultivées, et qui sont nécessaires dans le maintien, voire l'augmentation des rendements agricoles. Cependant, la plupart de ces molécules sont hautement toxiques et difficilement biodégradables. Leur utilisation massive et répétée peut engendrer des conséquences néfastes pour toutes les composantes de l'environnement.

L'objectif de ce travail de doctorat est de démontrer l'effet de deux types de pesticides (herbicide et fongicide) sur le métabolisme et l'état de santé en général.

Le travail est réalisé sur des rats de la race wistar âgés de 3 mois qui consomment un régime à base de purée de pomme de terre traitée par les deux types de pesticides à différentes doses par rapport aux témoins qui reçoivent un régime de pomme de terre non contaminé par ces deux pesticides. Le protocole expérimental dure trois mois. La pomme de terre a été choisie car elle constitue un légume consommé fréquemment par la population Algérienne.

Les doses choisies sont considérées (D1, dose sans effet ; D2, DL 50/100) comme des doses sans effets toxiques par l'organisme ECH (European commission health, 2009; 2006).

La métribuzine, un composé organique synthétique, herbicide sélectif de la famille des triazines est utilisé pour inhiber la croissance des mauvaises herbes en empêchant la photosynthèse. Il est généralement appliqué au soja, pommes de terre, luzerne, canne à sucre, orge, et tomates (USEPA, 2003).

De point de vue santé, il y a peu d'informations sur les effets de l'exposition à la métribuzine chez l'être humain. Chez les animaux, les études aiguës indiquent que la métribuzine montre un ordre bas de la toxicité, comme indiqué par des valeurs élevées de DL₅₀. Les études sub-chroniques suggèrent que la métribuzine pourrait causer des effets nuisibles sur le gain de poids corporel, le poids des organes, et les paramètres hématologiques à des doses élevées (USEPA, 2003).

Le mancozebe est un fongicide systémique appartenant à la famille des carbamates. Il s'agit plus précisément d'un dithiocarbamate, non inhibiteur des cholinestérases. Les effets toxiques du mancozebe à court et à long terme chez l'animal après administration répétée dans l'alimentation, sont dus à son métabolite principal, l'ETU (éthylenthionurée).

Deux voies métaboliques sont possibles : la voie principale donne directement de l'EDA (éthylène diamine), par hydrolyse du mancozebe puis de la glycine par oxydation de l'EDA ; l'autre voie métabolique passe par l'oxydation du mancozebe en EBIS (éthylène bis isothiocyanate sulfite), conduisant à la formation d'ETU puis d'EU (éthylénurée), avant de rejoindre la voie principale pour

former finalement de la glycine avec incorporation des métabolites dans des composés naturels (Bonnard et al., 2011).

Pour les deux pesticides utilisés, les effets à long terme de faibles doses sont mal élucidés, d'où l'originalité de notre travail.

Les variations du poids corporel sont déterminées chez les rats témoins et chez les rats consommant la pomme de terre traitée par la métribuzine et par le mancozebe, et sont notées chaque jour à la même heure au cours de la période d'expérimentation (3 mois).

Nos résultats montrent que les rats témoins mâles et femelles ont une prise de poids corporel importante par rapport au poids initial au cours des trois mois d'expérimentation. L'administration de la métribuzine et du mancozebe induit une perte de poids corporel chez les rats traités avec les doses D1 et D2 comparés aux rats témoins quelque soit le sexe de l'animal. La réduction du poids corporel est plus importante chez les animaux traités avec la dose D2 comparés à ceux traités par la dose D1. La diminution du poids corporel suite à l'administration de la métribuzine et du mancozebe est en accord avec des études réalisées avec d'autres pesticides (Bhattie et al., 2011; Singh et al., 2011; Jennifer et al., 2007)

Néanmoins, Mallem et al. (2007) ont mené une étude chez les lapins traités par le Manèbe, fongicide de la famille des dithiocarbamètes par gavage et ont observé une augmentation de la masse chez les lapins traités à une concentration de 8 mg/kg/j, suite à des variations hormonales.

La diminution du poids corporel est due à la perte des réserves graisseuses et à une fonte musculaire chez l'animal lors d'une souffrance (OCDE, 2000 ; GTPWOAUFSP, 2008). En général, la chute corporelle est due en premier à une diminution de la masse grasse suivie de celle de la masse maigre. Elle représente la conséquence ultime d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports qui sont inférieurs aux dépenses énergétiques (Ritz et al., 2007).

Dans notre étude, la diminution du poids corporel après l'administration de la métribuzine et du mancozebe est associée à une réduction de la prise alimentaire chez les rats mâles et femelles.

La réduction de la consommation alimentaire et de l'apport énergétique est de plus en plus importante lorsque la dose testée augmente et ceci quelque soit le sexe. Ces résultats sont en accord avec les résultats de [Domingues](#) et al. (2011) sur le diuron chez les rats mâles de la race wistar.

La diminution de l'apport énergétique peut expliquer la diminution du poids corporel chez les rats traités par la métribuzine et par le mancozebe.

Le gain pondéral représente la croissance des rats par rapport au poids initial pendant la période d'expérimentation, et donc reflète mieux les variations du poids corporel au cours du temps. La réduction du gain pondéral est fortement importante chez les rats consommant les pommes de terre traitées avec la dose D2 que ceux traités avec la dose D1 concernant la métribuzine et le mancozebe et ceci quelque soit le sexe.

Ces signes peuvent être des marqueurs fiables de souffrance dans les études de toxicité. Plusieurs études ont mis en évidence le stress associé à une restriction alimentaire produisant une perte de poids plus de 20 à 25 % chez le rat (OCDE, 2001; Foltz et Ullman-Cullere 1999).

L'administration des pesticides induit un large éventail des effets toxicologiques chez les mammifères. Les paramètres biochimiques varient lors d'un stress, de douleur ou de souffrance. Dans les tests toxicologiques, ces variations sont liées à la perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien traduisant une hyperglycémie liée à l'activation du système orthosympathique, une augmentation du taux plasmatique de créatine kinase liée à une atteinte du tissu musculaire, une diminution des β -lipoprotéines et du taux de cholestérol, ainsi qu'une augmentation de la concentration d'angiotensine, et de l'activité de la rénine, liées à la stimulation du système orthosympathique (Manser, 1992).

Dans notre étude, l'administration de la métribuzine et du mancozebe induit plusieurs changements métaboliques. Les résultats obtenus montrent une augmentation très significative des teneurs sériques en glucose chez les rats expérimentaux mâles et femelles sous régimes pommes de terre traitées par la métribuzine et le mancozebe. Cette augmentation est plus importante avec la dose D2 que la dose D1. Ceci explique peut être le résultat du grand catabolisme du glycogène hépatique. Ces résultats sont en accord avec d'autres auteurs utilisant d'autres pesticides (Kumar et Rajini, 2009; Ksheerasagar et Kaliwal, 2006; [Yousef](#) et al., 2006).

Différentes études ont trouvé que les pesticides contenant du manganèse tel que le maneb, fongicide de la famille des dithiocarbamates ont un effet sur le métabolisme des carbohydrates (Mallem et al., 2007; Faudemay et al., 1976).

Nos résultats montrent que les rats recevant la métribuzine ou le mancozebe (D1 et D2) ne présentent aucune variation significative des teneurs sériques en protéines totales. Ces résultats sont en désaccord avec d'autres travaux ([Yousef](#) et al., 2006; [Kalender](#) et al., 2005) qui montrent une réduction des taux de protéines totales par les pesticides.

Des analyses biochimiques telles que le dosage de l'urée et la créatinine sériques sont employées pour évaluer la fonction rénale. En effet, la créatinine et l'urée constituent des marqueurs fiables de la fonction rénale, leur augmentation ou leur diminution reflète un dysfonctionnement rénal.

La créatinine sérique est un déchet métabolique azoté, produit terminal du catabolisme de la créatine musculaire. On considère que la filtration glomérulaire est le mécanisme essentiel de l'élimination de la créatinine. Il existe une relation inverse de type hyperbole entre la filtration glomérulaire et la créatinémie. A ce titre, la créatinine plasmatique représente un marqueur peu sensible d'une faible diminution de la filtration glomérulaire.

L'urée est un catabolite des acides aminés produit par les hépatocytes. Sa production est donc dépendante du fonctionnement hépatique et du catabolisme des protéines. Cette molécule est

éliminée par filtration glomérulaire et réabsorbée par les tubules, d'autant plus que le débit urinaire intra tubulaire est faible.

L'urée ne peut donc être considérée comme un marqueur fiable de la fonction rénale. L'une des causes les plus fréquentes de l'augmentation de l'urée sans rapport avec une altération rénale est une augmentation du catabolisme protéique (Maurey, 2005).

Cependant, la détermination simultanée de l'urée et la créatinine peuvent refléter la fonction rénale. Quelque soit la dose de la métribuzine et du mancozebe testée (D1 et D2), les teneurs sériques en urée et en créatinine chez les différents lots de rats expérimentaux mâles et femelles présentent une augmentation significative comparés à leurs témoins respectifs. Cette augmentation est d'autant plus importante que la dose de pesticide augmente. Des résultats semblables ont été également retrouvés par des auteurs sur d'autres pesticides (Garoui et al., 2011; Salem, 2011; Renugadevi et Milton., 2009), qui ont montré l'augmentation de la créatinine et l'urée par différents types de pesticides avec altération de la fonction rénale.

D'après Atessahin et al. (2005) et Cuzzocrea et al. (2002), ces composés empêchent l'incorporation de l'acide aminé dans la protéine causant une augmentation du catabolisme des protéines et des niveaux de l'urée et de la créatinine qui sont les métabolites principaux du métabolisme des protéines.

Saafi-Ben Salah et al. (2012) montrent que l'administration du diméthoate par voie orale pendant deux mois chez les rats provoque une nette insuffisance rénale caractérisée par une augmentation significative du taux de la créatinine et de l'urée sériques.

Une autre étude montre que le pesticide contenant le cobalt provoque l'augmentation des taux plasmatiques de créatinine et d'urée reflétant le diagnostic de l'insuffisance rénale chez les rats (Fetoui et al, 2010; Donadio et al., 1997).

Les travaux de Siddharth et al. (2012) ont mesuré le taux sanguin des pesticides organochlorés chez des patients atteints d'une insuffisance rénale chronique (IRC) comparés à des témoins sains et ont observé un niveau très élevé de l'hexachlorocyclohexane, l'endosulfane, l'aldrine, le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) dans le sang des patients atteints d'IRC. Ces résultats peuvent être en faveur d'une association positive et directe entre la présence des pesticides dans le sang des patients et leur insuffisance rénale chronique.

Nos résultats ont prouvé que le traitement avec les deux doses de métribuzine et de mancozebe provoque une augmentation des activités enzymatiques des transaminases sériques, alanine aminotransférase (ALT) et aspartate aminotransférase (AST). Les enzymes transaminases sont considérées comme un indicateur des dommages des tissus qui sont expliqués par le degré d'exposition et la sévérité des symptômes toxiques. Les ALT et AST sont des enzymes jouant un rôle dans le métabolisme des acides pyruvique et oxaloacétique.

L'ALT est essentiellement localisée dans le foie, dans le cytoplasme des hépatocytes. L'AST se trouve dans une grande variété de tissus (muscles, dont le myocarde, cerveau, reins) et dans le foie où 80 % de son activité sont localisés dans les mitochondries.

L'augmentation de l'ALT est plus spécifique et plus sensible que celle de l'AST dans l'affirmation d'une cytolysé hépatique.

L'augmentation significative des activités sériques de l'AST et ALT chez les rats traités peut être expliquée par les changements destructifs des cellules hépatiques induites par la métribuzine et le mancozèbe, entraînant par la suite des changements de perméabilité, et la fuite des enzymes.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres travaux utilisant différents pesticides (Bhattie et al., 2011; Singh et al., 2011; Choudhary et al., 2003) et qui confirment l'augmentation des transaminases par certains pesticides.

Selon Katagi (2010), un aspect soutenant le potentiel hépatotoxique de l'atrazine (herbicide de la famille des triazines) est sa capacité de bioaccumulation, la substance agit avec les biomembranes et n'est pas excrétée. L'explication de l'existence de ces hépatites toxiques par les pesticides vient du fait que ce sont les métabolites de la molécule qui se révèlent toxiques dans certaines conditions.

D'après EL-Kady et al. (2009), la contamination de la nourriture et des aliments avec des ions des métaux lourds comme par exemple le cadmium cd^{2+} induit l'augmentation de l'activité d'AST et d'ALT dans le plasma. Ceci est principalement dû à la fuite de ces enzymes du foie vers la circulation sanguine.

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

L'analyse des paramètres lipidiques chez les rats consommant la pomme de terre traitée par les deux doses de la métribuzine montrent une hypocholestérolémie, hypertriglycémie, un taux réduit de cholestérol lié aux lipoprotéines VLDL et LDL, tandis que les HDL sont invariables.

Les teneurs en apoprotéines totales des lipoprotéines reflètent en général le nombre de particules circulantes. Un taux élevé des apoprotéines VLDL et LDL et un taux faible des Apo-HDL sont notés chez les rats traités par la métribuzine, en faveur d'une augmentation du nombre de particules VLDL et LDL et une réduction des particules HDL.

Ce changement de ces apoprotéines traduit probablement un défaut du métabolisme des apoprotéines affectant le métabolisme des lipoprotéines.

De plus, l'hypocholestérolémie au niveau du sérum et des fractions lipoprotéiques peut être due à une réduction de la synthèse du cholestérol ou une augmentation de son élimination chez les rats exposés aux pesticides. La seule voie d'élimination du cholestérol est le foie, par l'intermédiaire de la bile.

Ces résultats concordent avec ceux d'Ibrahim et El-Gamal (2003) où le Diazinon a provoqué une chute significative des teneurs en CH-LDL et par d'autres auteurs qui ont travaillé sur différents types de pesticides (Sankar et al., 2012; Yousef et al., 2006; Lucić et al., 2002 ; Grajewski et Oberdisse, 1977). Ces auteurs expliquent la diminution de la cholestérolémie par une réduction de synthèse ou par la sous-nutrition des rats.

Les rats mâles et femelles consommant la pomme de terre traitées par le mancozebe montrent aucune variation des teneurs en cholestérol sérique, et cholestérol des lipoprotéines VLDL, LDL et HDL, ainsi qu'un taux élevé en triglycérides sériques et des lipoprotéines VLDL et LDL tandis que les triglycérides HDL ne varient pas. Les apoprotéines VLDL et LDL sont invariables alors que les apoprotéines HDL sont diminuées significativement.

L'hypertriglycéridémie induite par les deux pesticides correspond à une surproduction hépatique des VLDL-TG suite à une augmentation du flux de glucose et d'acides gras libres au foie et /ou une diminution du catabolisme par inhibition de la lipoprotéine lipase (LPL).

Ainsi, nos résultats montrent clairement que la métribuzine affecte le métabolisme des lipoprotéines chez les rats mâles et femelles. En effet, on observe une augmentation du nombre de particules VLDL et LDL dont la composition est anormale (appauvrissement en cholestérol et enrichissement en triglycéride), associée à une réduction des particules HDL anormales (enrichissement en cholestérol et en triglycéride). Cependant, le mancozebe entraîne une réduction des particules HDL qui semblent être de composition normale. Dans ce cas, les lipoprotéines VLDL et LDL sont enrichies en triglycérides. Ainsi, les deux pesticides affectent le métabolisme des lipoprotéines, probablement en altérant la synthèse ou le catabolisme.

Ces anomalies lipidiques peuvent être associées à des modifications hormonales. En effet, d'autres travaux ont démontré que les dithiocarbamates ont un effet sur la thyroïde. Ils diminuent la sécrétion de la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) et provoquent une diminution dans la sécrétion de la T4 circulante, causant ainsi une hypothyroïdie. Cela explique l'hyperlipémie marquée par une augmentation des concentrations sériques en cholestérol et/ou en triglycérides et l'hyperglycémie suite à la diminution probablement du taux du catabolisme de ces molécules (Mallem et al., 2007; Jeffrey et al., 2001; Kachar et al., 1997 ; Wayland et Edward, 1991).

Dans une étude menée par Rai et al. (2009) sur le Cartap et le carbofuran, pesticides de la famille des carbamates, administrés aux rats wistar, des altérations aux niveaux des différents lipides sériques sont notées avec augmentation très élevée des triglycérides et cholestérol dans les LDL, VLDL et HDL. L'effet de ces deux pesticides a été plus marqué lorsqu'ils sont administrés en combinaison. L'élévation des lipides totaux et du cholestérol total sérique peut être due à la stimulation des catécholamines qui stimulent la lipolyse et augmentent la production des acides gras.

Il existe une forte relation entre le taux de cholestérol sérique, HDL, LDL cholestérol et la LCAT enzyme responsable de l'estérification du cholestérol sérique permettant le retour du cholestérol excédant des tissus périphériques vers le foie (Perlemuter et al., 2003).

La lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) est une enzyme plasmatique spécifique (dont le lieu d'activité est le plasma) qui hydrolyse les lécithines des lipoprotéines plasmatiques et produit des esters de cholestérol. Elle catalyse le transfert de l'acide gras (habituellement polyinsaturé) estérifiant la fonction alcool secondaire d'une lécithine (phosphatidyl choline), sur la fonction alcool de carbone 3 du cholestérol. Les lécithines sont hydrolysées en lysolécithines, beaucoup plus polaires, tandis que le cholestérol est estérifié ce qui le rend presque totalement apolaire. Ce changement de polarité permet au cholestérol estérifié de s'accumuler dans l'intérieur des particules de lipoprotéines et diminue la surface de ces particules donc leur confère une forme sphérique.

La LCAT est une enzyme essentielle dans le métabolisme des HDL, une déficience dans l'activité de la LCAT aboutit à un défaut de maturation des HDL avec une accumulation des pré bêta-HDL (Calabresi et Franceschini, 2010). La diminution de l'activité de la LCAT conduit à une réduction dans la synthèse des HDL mature (Van -Linthout et al., 2010).

L'altération de l'activité de la LCAT et des autres enzymes influençant le métabolisme de HDL peut être dû aux effets des pesticides par inhibition. Nos résultats montrent une diminution de l'activité de la LCAT chez les rats mâles et femelles consommant la pomme de terre traitée par la métribuzine et le mancozebe avec les deux doses (D1 et D2). Cette diminution peut s'expliquer par un défaut de synthèse ou bien inhibition dans la synthèse ou de l'activité de cette enzyme par ces pesticides. En plus dans notre étude la diminution de l'activité de la LCAT peut être expliquée par la diminution du taux de cholestérol sérique ou par la sous-nutrition des rats.

De nombreux produits chimiques affectent l'activité des enzymes spécifiques in vitro et in vivo (Coban et al., 2008). L'exemple est bien documenté pour les drogues médicales (Alici et al., 2008; Ekinici et al., 2007), les ions métalliques (Tekman et al., 2008 ; Ekinici et al., 2007), les pesticides et les fongicides (Ceyhun et al., 2010; Senturk et al., 2009). D'après Kinoshita et Teramota (2001), la réduction de l'activité LCAT peut conduire à l'accumulation de cholestérol libre dans les tissus. Lorsque cette enzyme n'est pas activée ou bien un dysfonctionnement existe au niveau de la protéine, les lipoprotéines HDL ne se transforment pas en HDL2 et HDL3 donc l'excès de cholestérol ne sera pas transporter vers le foie ou il subit l'hydrolyse. A ce stade là, l'excès de cholestérol se dirige vers les tissus périphériques et est stocké sous forme d'ester de cholestérol.

Les analyses des paramètres biochimiques constituent un outil appréciable pour retrouver et suivre les altérations possibles du métabolisme des lipides, des protéines ou des carbohydrates, qui peuvent être associées à des lésions au niveau des organes résultant de l'effet des différents polluants. Le foie est l'organe principal impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques, c'est une

cible majeure pour les produits chimiques et les médicaments. L'hépatotoxicité représente donc un critère important pour évaluer l'effet d'un xénobiotique particulier (Al-Awthan et al., 2012). En plus, le foie est un organe essentiel dans le métabolisme énergétique. Il synthétise le cholestérol et les triglycérides et il produit et recycle les lipoprotéines (Postic et Girard, 2008).

Nos résultats montrent que le poids du foie chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine (D1 et D2) est similaire à celui des rats témoins respectifs. Le mancozebe avec les deux doses testées induit une augmentation du poids du foie chez les rats mâles et femelles comparés à leurs témoins. L'augmentation remarquable du poids du foie des rats traités pourrait être due à l'accumulation de la molécule au niveau des hépatocytes en vue d'une détoxification ou d'un effet d'induction enzymatique (Wayland et Edward, 1991). Les deux types de pesticides (métribuzine et mancozebe) entraînent une chute du poids de muscle avec les deux doses chez les rats mâles et femelles comparés à leurs témoins. Ceci peut être dû à la présence d'une fonte musculaire, ce qui est corrélé à la réduction du poids corporel.

La métribuzine entraîne une augmentation du poids du tissu adipeux chez les rats mâles et femelles seulement avec la dose 2. L'augmentation du poids de tissu adipeux peut être expliquée par l'accumulation de ces molécules dans les adipocytes. Par contre, le mancozebe ne présente aucune variation significative du poids de tissu adipeux.

A côté de ces variations au niveau des poids des organes, les effets des deux pesticides sur le métabolisme lipidique des organes sont aussi mis en évidence dans notre travail.

Les rats mâles et femelles consommant le régime pomme de terre traitée par les deux pesticides montrent des teneurs élevées des lipides totaux hépatiques avec augmentation des teneurs en triglycérides, tandis que les teneurs hépatiques en cholestérol sont diminuées significativement chez les rats traités par la métribuzine, et sont stables chez les rats traités par le mancozebe.

Ces résultats suggèrent une augmentation du flux d'acides gras plasmatiques et de la mobilisation des graisses du tissu adipeux. Cela provoque une surproduction et sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides par le foie. Malgré cela, la métribuzine et le mancozebe induisent une stéatose hépatique chez le rat, comme indiqué pour d'autres pesticides (Ksheerasagar et Kaliwal, 2006; Nakagawa et Tayama, 1997). *Selon Baligar et Kliwal (2001), les rats traités par le mancozebe à la dose de 500 mg/kg pendant 30 jours entraînent une augmentation des lipides totaux hépatiques.*

L'étude de Faudemay et al. (1976) a été réalisée sur le thirame, le nabame et le zinebe, des fongicides de la famille des dithiocarbamètes. Ces trois pesticides ont un effet commun sur le métabolisme du rat, ils affaiblissent l'utilisation du glucose par le foie par réduction de la sensibilité à l'insuline. En outre, la mobilisation des graisses de dépôts périphériques entraîne l'oxydation des acides gras dans le foie chez les rats traités par le zinebe et le nabame et la stéatose hépatique pour ceux traités par le thirame.

L'altération des processus de signalisation de l'insuline peut affecter le métabolisme des VLDL. *L'insulinorésistance et le diabète de type 2 sont définies classiquement par une intolérance au glucose, mais sont également caractérisés par des anomalies lipidiques, notamment une surproduction hépatique de VLDL (Mulvihill et al., 2011). L'insulinorésistance augmente le taux des acides gras libres plasmatiques, la lipogenèse de novo au niveau du foie et la fixation des remnants de chylomicrons, ce qui contribue à la sécrétion hépatique des TG et la surproduction des VLDL. L'augmentation des lipides hépatiques ont été associés à une sécrétion accrue de VLDL (Adiels et al., 2008). La surproduction des apo B100-VLDL est une complication commune d'une résistance hépatique à l'action de l'insuline et d'une perturbation de la cascade de signalisation de l'insuline. Dans un état physiologique normal, l'insuline peut inhiber la sécrétion des apo B100 à travers l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), une molécule clé dans la voie de signalisation de l'insuline (Qiu et al., 2008).*

Ainsi, l'hypertriglycémie hépatique induite par les pesticides peut être expliquée par l'excès de synthèse des triglycérides hépatiques ou bien par la réduction de l'hydrolyse des triglycérides par inhibition de l'enzyme lipolytique.

L'hypocholestérolémie hépatique induite chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine peut être due à la stimulation du catabolisme hépatique ou bien due à la sous nutrition.

En plus, l'altération du profil lipidique peut être due à une modification de l'activité des enzymes qui jouent un rôle dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines sous l'effet des pesticides. De nombreuses substances chimiques à faible concentration influencent le métabolisme, en diminuant ou en augmentant l'activité normale des enzymes (Ekinici et Beydemir, 2009).

Nos résultats montrent que l'activité de l'enzyme triglycéride lipase hépatique augmente significativement chez les rats traités par la métribuzine, alors qu'elle reste stable chez les rats traités par le mancozebe. Cette élévation peut expliquer l'augmentation de la synthèse hépatique des triglycérides et des VLDL transporteurs des triglycérides endogènes.

Une étude menée par Padma et al. (2012) sur le lindane administré aux rats wistar à une dose de 100mg/kg pendant 30 jours montre une augmentation du cholestérol, triglycérides, LDL et VLDL sériques avec augmentation du cholestérol et des triglycérides hépatiques, associés à une diminution concomitante des HDL sériques.

La triglycéride lipase hépatique (TGL-H) est une enzyme lipolytique, principalement synthétisée par les hépatocytes et exprimée à la surface des capillaires sinusoides du foie. Elle peut donc être considérée comme une lipase du compartiment vasculaire, au même titre que la lipoprotéine lipase, avec laquelle elle partage un certain nombre d'analogies structurales et fonctionnelles. Cependant son rôle métabolique est moins clairement établi et ses points d'impact sur le métabolisme des lipoprotéines paraissent multiples. Les études de biologie cellulaire et moléculaire ont permis des

progrès déterminants concernant la structure de l'enzyme et la définition des domaines fonctionnels, ainsi que l'acquisition d'outils moléculaires pour aborder l'étude des mécanismes de régulation (Bertrand et al., 1995).

Les arguments en faveur d'un rôle de la triglycéride lipase hépatique dans la captation du cholestérol-HDL par les hépatocytes laissent supposer une régulation stérol-dépendante de cette enzyme. Ainsi, l'administration à l'animal d'un régime riche en cholestérol induit une baisse des ARNm spécifiques de l'enzyme triglycéride lipase hépatique (Sultan et al., 1990).

Les modèles de culture de cellules hépatocytes viennent étayer cette observation, montrant une relation inverse entre le contenu cellulaire en cholestérol et l'activité triglycéride lipase hépatique sécrétée ou encore les taux d'ARNm correspondants (Ragabet et al., 1994). L'incubation, en présence du mévinoline qui bloque la néosynthèse cellulaire de cholestérol, induit également une forte stimulation des messagers de l'enzyme triglycéride lipase hépatique (Bush et al., 1990). Une étude a comparé l'activité triglycéride lipase hépatique chez des patients atteints d'une hypercholestérolémie familiale (HF) authentifiée, et chez un nombre équivalent de sujets présentant des taux comparables de cholestérol, mais sans HF (Morigushi et al., 1990). Les patients HF, qui ont un déficit du récepteur des LDL, présentent un niveau d'activité triglycéride lipase hépatique sensiblement plus élevé que les sujets non-HF.

Parmi les molécules d'intérêt pharmacologique utilisées lors des dyslipidémies, seuls les fibrates ont montré un effet stimulant de l'activité triglycéride lipase hépatique de sujets normolipémiques (Heller et al., 1983) et hypertriglycéridémiques (Eisenberg et al., 1984).

Ainsi, les patients présentant un niveau élevé de HDL ont une activité triglycéride lipase hépatique basse (Howard, 1987). Dans une étude, un groupe de patients diabétiques présentant des complications vasculaires montrent une activité triglycéride lipase hépatique très abaissée, en relation avec une hypertriglycéridémie modérée et un mauvais équilibre glycémique (Azéma, 1990).

Dans toutes ces situations, on trouve une relation inverse entre les variations d'activité triglycéride lipase hépatique et celles affectant les taux de HDL-cholestérol, et plus particulièrement les HDL de grande taille (HDL_{2b}), argument en faveur d'un rôle de l'enzyme dans le catabolisme des HDL riches en lipides (Colvin et al., 1991). De la même façon, l'activité triglycéride lipase hépatique varie de façon parallèle aux concentrations des hormones thyroïdiennes, lors d'explorations conduites chez des sujets hypo- ou hyperthyroïdiens, avant et après traitement (Valdemarsson et al., 1983).

Chez l'homme, la déficience génétique en LPL est associée au syndrome de chylomicronémie familiale avec un taux très élevé des triglycérides plasmatiques et une concentration faible des

HDLc (Wang et Eckel, 2009). Une diminution de l'activité de la LPL cause une dyslipidémie significative chez la souris et se manifeste par une forte hypertriglycéridémie (Zhang et al., 2008). Le métabolisme lipidique au niveau du muscle gastrocnémien, du tissu adipeux et de l'intestin est perturbé chez les rats mâles et femelles consommant la pomme de terre traitée par la métribuzine et le mancozebe. Nos résultats montrent une augmentation des lipides totaux musculaires avec une augmentation du taux des triglycérides musculaires pour les deux pesticides, tandis que le taux en cholestérol reste stable chez les rats traités par la métribuzine et augmente chez les rats traités par le mancozebe.

La LPL musculaire est marquée par une augmentation significative chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine et le mancozebe avec les deux doses. L'augmentation des lipides totaux est due à l'augmentation des triglycérides au niveau du muscle. Ainsi l'augmentation des triglycérides musculaires peut être due à l'augmentation de l'activité de la LPL musculaire.

Concernant le tissu adipeux, les rats mâles et femelles traités par les pesticides montrent une diminution des teneurs en lipides totaux avec une diminution du taux des triglycérides chez les rats traités par la métribuzine et le mancozebe tandis que le taux de cholestérol ne varie pas chez les rats traités par la métribuzine et diminue chez ceux traités par le mancozebe par rapport aux témoins. La diminution des triglycérides adipocytaires peut être due à une augmentation de l'hydrolyse des ces triglycérides. De plus, la LPL adipocytaire montre une augmentation chez les rats traités par la métribuzine et aucune variation n'est notée chez les rats traités par le mancozebe. L'activité de la LHS reste stable chez les rats traités par la métribuzine tandis qu'elle augmente chez les rats traités par le mancozebe.

L'augmentation de l'activité de la lipase hormono-sensible LHS entraîne l'augmentation de l'hydrolyse des triglycérides de réserve (lipolyse périphérique), et par conséquent la libération dans le sang de grandes quantités d'acides gras ce qui va induire la saturation des capacités de stockage des triglycérides au niveau des adipocytes d'où la stabilisation de l'activité de la LPL (Frayn, 2005). L'augmentation de la LHS explique donc l'appauvrissement du tissu adipeux en triglycérides, observé chez les rats traités par le mancozebe. Par contre, les variations des activités des enzymes LPL et LHS adipocytaires n'expliquent pas la réduction des triglycérides au niveau du tissu adipeux chez les rats traités par la métribuzine. Ces anomalies peuvent être induites par un autre mécanisme dû à l'accumulation du pesticide dans les adipocytes.

L'intestin est aussi affecté par les pesticides, montrant une élévation des teneurs en lipides totaux et en triglycérides chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine et le mancozebe avec les deux doses.

Nos résultats montrent que l'activité de la LPL intestinale augmente significativement chez les rats traités par la métribuzine et elle est invariable chez les rats traités par le mancozebe.

L'augmentation des triglycérides au niveau de l'intestin peut être expliquée par l'augmentation de la LPL intestinale induite par la métribuzine.

Certains pesticides organophosphorés causent des changements dans le métabolisme des lipides par l'inhibition des sérines hydrolases y compris les lipases. Ces lipases sensibles aux pesticides organophosphorés, jouent un rôle essentiel dans la régulation cellulaire, la nutrition et les maladies, leur inhibition pourrait perturber l'homéostasie lipidique entraînant des pathologies chez les mammifères (Quistad et al., 2006).

Nos résultats montrent clairement que les deux pesticides, la métribuzine et le mancozebe affectent le métabolisme des lipoprotéines, le métabolisme lipidique des organes et les activités des enzymes lipolytiques chez les rats mâles et femelles. La métribuzine et le mancozebe induisent une toxicité au niveau tissulaire en altérant le métabolisme lipidique.

Chez les rats mâles et femelles consommant les pommes de terre traitées par la métribuzine (D1 et D2), une diminution des teneurs en protéines hépatique, musculaires et adipocytaires est notée. Alors qu'au niveau intestinal, les teneurs en protéines totales ne présentent aucune variation significative.

Les deux doses de mancozebe testées n'ont aucune influence sur les teneurs en protéines hépatiques chez les rats mâles et femelles. Cependant, les teneurs en protéines totales adipocytaires montrent une augmentation significative, alors qu'au niveau du muscle et de l'intestin, elles sont diminuées chez les rats mâles et femelles et ceci quelque soit la dose testée.

Selon Mahadevaswami et al. (2000), l'administration du mancozebe aux rats pendant 15 jours à 600, 700 et 800 mg/kg entraîne une diminution des protéines totales au niveau du foie. Les variations du taux des protéines tissulaires traduisent une altération du métabolisme protéique tissulaire par les pesticides.

La deuxième partie de notre travail porte sur un concept important, le stress oxydatif, reconnu aujourd'hui comme la base moléculaire de toutes les pathologies. On parle de stress oxydant lorsque l'homéostasie redox est perturbée, soit par une surproduction d'espèces réactives oxygénées (ROS), soit par une défaillance des systèmes antioxydants (Guyton et al., 1996). Les xénobiotiques, y compris les pesticides, sont connus pour augmenter la production des ROS, qui à leur tour génèrent le stress oxydatif dans les différents tissus (Mehta et al., 2008). Les apoprotéines, le cholestérol, les esters de cholestérol et les triglycérides qui composent les fractions des lipoprotéines peuvent être oxydés par les radicaux toxiques, ce qui entraîne une modification de leurs structures chimiques et leurs fonctions cellulaires (El-Banna et al., 2009).

Lorsque le foie ne peut pas convenablement exercer sa fonction de détoxification à cause d'agents inhibiteurs tels que les métaux lourds et toxiques, les hormones, les produits chimiques, les

dioxines, furanes, pesticides, solvants, etc., une situation inflammatoire se crée et transmet des sous-produits toxiques qui, à leur tour, vont augmenter le stress oxydatif.

Il semblerait que le stress oxydatif obéisse à la même loi pharmacotoxicologique que celle associée aux effets secondaires de certains médicaments, à savoir la dose dépendance : c'est à dire que les effets secondaires disparaissent ou diminuent en fonction de la dose administrée.

Les espèces oxygénées réactives (ROS) et les espèces réactives d'azote (RNS) considérés comme des marqueurs oxydatifs réagissent avec la totalité des macromolécules de l'organisme : lipides, protéines, acides nucléiques et les carbohydrates. Le corps possède cependant un système de défense antioxydant.

Dans cette optique nous contribuons à déterminer les marqueurs de statut oxydant (malondialdéhyde, protéines carbonylées et l'oxydation in vitro des lipoprotéines totales) et les antioxydants (vitamine C, glutathion et la catalase) au niveau du plasma, des érythrocytes et des organes chez les rats témoins et les rats traités par la métribuzine et le moncozebe à des doses faibles. Dans notre travail, les résultats obtenus sont en faveur de l'existence d'un stress oxydatif chez les rats consommant la métribuzine (Chiali et al., 2013).

La Vitamine C (acide L-ascorbique) est essentielle pour éliminer de notre corps les diverses pollutions (pesticides, métaux-lourds, poisons etc.) présentes dans notre environnement. Elle permet également d'éviter la déshydratation liée à la sénescence et de nettoyer l'organisme des radicaux libres qui résultent de son métabolisme normal.

Dans notre étude, les teneurs en vitamine C montrent une diminution chez les rats consommant la pomme de terre contaminée par la métribuzine à la dose D2. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Sankar et al. \(2012\)](#) et ceux de [Ajiboye \(2010\)](#) qui montrent que certains pesticides provoquent la diminution du taux de la vitamine C chez les rats. Par contre, le moncozebe n'a pas d'effet sur la vitamine C.

Le glutathion est un élément crucial, antioxydant du mécanisme de défense et il fonctionne comme un réactif direct anti-radicalaire (Romao et al., 2006). Son épuisement peut avoir comme conséquence la dégénération de cellules due à l'effort oxydant provoqué par des polluants (Zhang et al., 2008).

Dans une étude, la diminution du taux de GSH rénal chez les rates allaitantes traitées par du cobalt et leur progéniture peut-être la conséquence de son utilisation accrue par les cellules pour piéger les radicaux. Il a été suggéré que la déplétion intracellulaire en groupe sulfhydryle par le cobalt est la condition essentielle pour la génération des radicaux libres et la perturbation des organites intracellulaires (Battaglia, 2009).

La métribuzine et le mancozebe entraînent une diminution très significative des teneurs en GSH chez les rats mâles et femelles traités par les deux doses D1 et D2. La production chronique

d'espèces réactives réduit considérablement les niveaux intracellulaires de GSH puisque le GSH est essentiel à la régénération des vitamines. Sa déficience s'accompagne d'une diminution des niveaux d'acide ascorbique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs sur différents pesticides (Sankar et al., 2012; Aboul-Soud et al., 2011).

Selon une étude menée par Siddiqui et al. (1993), le mancozebe administré aux rats par voie orale à la dose de 100 et 200 mg/kg pendant 7 jours provoque l'augmentation de la glutathion transférase hépatique.

Un autre paramètre antioxydant déterminé dans notre étude est la catalase, enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée. Le peroxyde d'hydrogène est un sous produit de nombreuses réactions métaboliques. La cellule doit absolument l'éliminer au fur et à mesure qu'il se forme. Ce produit deviendrait rapidement mortel s'il s'accumulait dans la cellule. La catalase permet de le transformer rapidement en composés inoffensifs, de l'eau et l'oxygène .

L'activité de l'enzyme érythrocytaire catalase est diminuée chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine à D1 et D2. Ces résultats en désaccord avec plusieurs auteurs qui ont testé l'effet de certains types de pesticides entraînant l'augmentation de l'activité de la catalase chez les animaux, en raison de l'existence de ces pesticides dans l'organisme et par la suite stimulant la défense antioxydant (Sankar et al., 2012; Srivastava et al., 2012; Aboul-Soud et al., 2011; Campos-Pereira et al., 2012; Datta et al., 2010).

Chez les rats traités par le mancozebe, une augmentation de l'activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats mâles et femelles est notée avec la dose D2. L'activité élevée de la catalase est une réponse adaptative contre la génération augmentée des radicaux libres (Koner et al., 1998). Il est bien connu que dans la situation de stress oxydant, l'activité de la catalase peut soit augmenter soit diminuer. En réalité, ses variations dépendent de l'intensité du stress oxydatif que subit l'organisme.

Le stress oxydatif se produit lorsque l'environnement redox est disrompue, ce qui provoque la mort cellulaire dans des circonstances diverses (Valko et al., 2007; Schafer et Buettner, 2001). L'exposition au cobalt (élément chimique rentrant dans la composition des pesticides) accentue la production de ROS intracellulaire et augmente la peroxydation lipidique, ce qui conduit finalement à des dommages cellulaires et la fuite de certains enzymes comme la lactate deshydrogénase (LDH), qui est une enzyme intracellulaire. Ceci traduit le résultat d'une perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire, suite à la peroxydation des lipides, sous l'influence de radicaux libres et dans des conditions de stress oxydatif (Zou et al., 2001).

Lorsque les mécanismes de défense sont insuffisants et/ou lorsqu'un excès de radicaux libres est généré, ces derniers sont dotés de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec de nombreuses

molécules comprenant l'ADN cellulaire, le cholestérol membranaire, les macromolécules de la matrice extracellulaire, dont le collagène et l'acide hyaluronique.

Mais il existe d'autres cibles des ROS, tels que les acides gras libres ou membranaires au cours de la peroxydation lipidique, et sont de ce fait toxiques pour l'organisme (Young et Woodside, 2001). Le malondialdéhyde (MDA) est le produit principal d'oxydation des acides gras polyinsaturés peroxydés et représente un index important de peroxydation des lipides. Dans notre étude, l'augmentation des teneurs sériques en malondialdéhyde chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine et le moncozebe aux doses D1 et D2, reflète la peroxydation lipidique et indique des dommages membranaires. Ces résultats sont en accord avec les études de plusieurs auteurs qui ont démontré l'interaction de l'atrazine, herbicide de la famille des triazines avec les lipides membranaires entraînant une augmentation du MDA, marqueur de l'oxydation lipidique (Srivastava et al., 2012; [Aboul-Soud et al., 2011](#); Bhatti et al., 2011; Singh et al., 2011; [Ajiboye, 2010](#); Nwani et al. 2010).

La peroxydation lipidique entraîne la libération d'autres produits d'oxydation comme les diènes conjugués. L'oxydation in vitro des lipoprotéines plasmatiques, induite par les métaux (cuivre), est déterminée par le suivi au cours du temps de la formation de ces diènes conjuguées. Ainsi, dans notre étude, les résultats montrent une augmentation des teneurs sériques des diènes conjuguées et du taux d'oxydation des lipoprotéines chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine et le moncozebe à dose D1 et D2, en faveur d'une augmentation de l'oxydation des lipides par les pesticides.

Les protéines carbonylées sont considérées comme des marqueurs de l'oxydation des protéines. Une augmentation significative des teneurs en protéines carbonylées est notée chez les rats mâles et femelles consommant la pomme de terre contaminée par la métribuzine et le moncozebe aux doses D1 et D2, en faveur de l'oxydation des protéines.

L'exposition des animaux d'expérience aux pesticides est connue pour induire la peroxydation des lipides dans divers tissus, qui est responsable des effets biologiques défavorables (Sharma et al., 2005; El-Demerdash et al., 2004; Kamboj et al., 2006). Le mécanisme de la toxicité des pesticides a été habituellement associé à l'augmentation de la peroxydation des lipides dans le foie (Sharma et al., 2005; Datta et al., 1994). Les espèces réactives de l'oxygène telles que des anions superoxydes, des radicaux d'hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène augmentent le processus oxydant et induisent des dommages oxydatifs aux lipides des membranes. La lipopéroxydation accrue peut être l'un des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité induite par l'atrazine.

Au niveau tissulaire, les marqueurs du statut oxydant/antioxydant sont aussi mis en évidence.

Au niveau du foie, les résultats montrent une augmentation du taux des protéines carbonylées avec diminution des teneurs en glutathion réduit chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine

et le mancozebe, tandis que le taux en MDA hépatique est augmenté significativement chez les rats traités par le métribuzine alors qu'il reste stable chez les rats traités par le mancozebe.

Au niveau du muscle gastrocnémien, une augmentation des teneurs en MDA et en protéines carbonylées est notée chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine et le mancozebe tandis que les teneurs en glutathion sont invariables. La métribuzine et le mancozebe altèrent la défense antioxydante et augmentent les niveaux de l'oxydation lipidique et protéique, en faveur de l'apparition d'un stress oxydatif au niveau des organes. De plus, les changements biochimiques sont accompagnés par une accentuation de la peroxydation lipidique au niveau des organes étudiés, ce qui indique une induction significative des dommages oxydatifs et un dysfonctionnement des défenses antioxydantes notamment enzymatiques.

Au niveau du tissu adipeux, on remarque une augmentation des teneurs en MDA et en protéines carbonylées chez les rats traités par la métribuzine et le mancozebe alors que les teneurs en glutathion sont invariables, et ceci quelque soit le sexe et la dose testée.

Chez les rats traités par la métribuzine, les teneurs intestinales en MDA et en protéines carbonylées sont significativement augmentées, alors que le taux du glutathion ne varie pas.

Chez les rats mâles et femelles traités par le mancozebe, les marqueurs du statut oxydant/antioxydant (MDA, protéines carbonylées et glutathion) intestinaux sont invariables.

Ainsi, le changement du statut oxydant / antioxydant au niveau des organes dans cette étude a été considéré comme un indicateur de la production accrue de ROS, qui est attribuée aux dommages oxydants au niveau macromoléculaire tels que les lipides, les protéines et l'acide nucléique (Adesiyan et al., 2011).

D'après Farombi et al. (2007), les rats exposés au phtalate Di-n-butylique présentent une augmentation la peroxydation des lipides.

Divers chercheurs ont rapporté que le GSH joue un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages induits par les substances toxiques (Wu et al, 2004; Reed et Fariss, 1984).

Les niveaux réduits de GSH chez les rats traités par le mancozebe ou la métribuzine pourraient être le résultat de la plus grande utilisation de GSH pour la conjugaison et/ou de la participation du GSH en tant qu'un antioxydant dans la neutralisation des radicaux libres produits en raison de la toxicité des pesticides.

La diminution de la glutathion hépatique induite par la métribuzine et le mancozebe rejoignent les résultats d'autres auteurs sur différents pesticides (Bhatti et al., 2011 ;Singh et al., 2011; Aouacheri et al., 2009; Singh et al., 2006; Prsamthi et al., 2005; Thapar et al., 2002; Hazarika et al., 2001; Konstantinova et Russanov, 1999), et en contradiction avec ceux trouvés par Ajiboye (2010) sur l'effet du 2,2-dichloro phosphate de diméthyle, pesticide entraînant l'augmentation des taux en glutathion hépatique chez les rats.

Noriega et al. (2002) ont testé l'effet de paraquat (herbicide) chez les rats, les résultats montrent une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA) et diminution du glutathion hépatique après 1h de l'administration de l'herbicide. L'activité des enzymes antioxydants au niveau du foie montre une diminution du superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase après 3h de l'injection du paraquat.

Une autre étude sur le paraquat montre l'effet de cet herbicide sur l'expression des gènes chez les rats traités induisant une augmentation de l'expression de six gènes tels que ceux de la métallothionéine-1 (MT-1), la phosphoénolpyruvate carboxykinase, Na / K ATPase-transport sous-unité beta1, la glutamate oxaloacétique transaminase, la glutathion-S-transférase, et l'hème oxygénase. Ces résultats suggèrent que l'expression de certains gènes peut être expliquée par l'induction suite au stress oxydatif (Tomita et al., 2006).

Une autre étude par Patel et al. (2006) sur le manèbe (fongicide de la famille des dithiocarbamètes) et le paraquat administrés aux souris à des doses 30 mg/kg et 10 mg/kg successivement pendant 9 semaines montre que ces deux pesticides induisent une élévation de la catalase, la glutathion transférase et la peroxydation lipidique.

Afin de confirmer la toxicité des pesticides au niveau tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques des organes (le foie, le muscle gastrocnémien, le tissu adipeux, l'intestin) chez les rats témoins et chez les rats traités par les pesticides (la métribuzine et le mancozebe). L'examen histologique est conçu dans le but de compléter nos résultats précédents.

L'analyse histopathologique du parenchyme hépatique, du muscle gastrocnémien, du tissu adipeux et de l'intestin chez les rats mâles et femelles traités par la métribuzine et le mancozebe à faible dose (D1) se caractérise généralement par un infiltrat inflammatoire lymphocytaire et un œdème en raison de la présence des pesticides comme corps étrangers.

Pour les rats traités par la métribuzine et le mancozebe à dose plus importante (D2), l'analyse histologique montre une désorganisation architecturale, une nécrose et une stéatose microvacuolaire au niveau du parenchyme hépatique, une dissociation de la fibre musculaire avec hypertrophie des cellules musculaires, une inégalité des tailles des adipocytes, un infiltrat inflammatoire dense, une ulcération et une disparition des glandes au niveau de l'intestin. Ces changements pourraient être dus à la plus grande quantité de produits de ROS qui s'accumulent sur les membranes et surtout l'oxydation des lipides et des protéines affectant l'histo-architecture des différents organes. Des résultats semblables sont indiqués par d'autres auteurs sur différents organes après exposition à d'autres pesticides (Garoui et al., 2011; Ksheerasagar et al., 2011; Renugadevi et al., 2009; Ksheerasagar et Kaliwal, 2006; Pedraza-Chaverri et al., 2006; Choudhary et al., 2003).

La présence de petits adipocytes après exposition aux pesticides peut être liée à l'épuisement des lipides du tissu adipeux. D'après certaines études, la stéatose hépatique due à l'accumulation des

graisses dans le foie serait due à l'afflux élevé d'acides gras libres, libérés à partir du tissu adipeux. En plus, les troubles de l'oxydation des lipoprotéines et l'augmentation de stress oxydatif peuvent également conduire à une stéatose au niveau des hépatocytes (Ratziu et al., 2010; Marra et al., 2008).

Selon Saafi-Ben Salah et al. (2012), les altérations biochimiques ont également été accompagnées par des changements histologiques dans les reins révélés par l'espace de Bowman réduit, la dégénérescence tubulaire, la desquamation des cellules tubulaires, et la dilatation du tubule proximal.

Le fongicide, N-(3,5-dichlorophényl) succinimide (NDPS) induit une néphrotoxicité aiguë caractérisée par une insuffisance rénale avec une nécrose tubulaire proximale (Hong et al., 1998).

Des études histopathologiques du foie chez les rats qui ont reçu le malathion montrent des changements dégénératifs et nécrotiques dans les hépatocytes (Aboul-Soud et al., 2011).

Ainsi, les pesticides induisent des modifications histologiques accompagnées par un dysfonctionnement métabolique et un stress oxydatif.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les pesticides posent un véritable problème de santé publique, et pas seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais aussi pour la population générale. En effet, les effets de faibles quantités de pesticides, en mélange, pendant des périodes longues posent de nombreux problèmes de santé. L'épidémiologie nous montre ainsi que les personnes exposées aux pesticides ont plus de risque de développer de nombreuses maladies que les autres: cancer, malformations congénitales, problèmes d'infertilité, problèmes neurologiques ou encore système immunitaire affaibli sont plus fréquents chez eux.

Notre recherche s'inscrit dans le cadre de projets nationaux en collaboration avec l'équipe de l'INRA portant sur l'évaluation du risque de la consommation des légumes contaminés par les pesticides sur l'état de santé. Ma thèse entre dans le contexte de l'analyse du risque constitué par deux pesticides, la métribuzine et le mancozebe, sur les désordres métaboliques, le déséquilibre du statut oxydant/antioxydant et les perturbations structurales de l'architecture tissulaire au niveau de quelques organes.

Pour réaliser ce travail, on a utilisé comme modèle expérimental *in vivo* le rat wistar, et comme légume, la pomme de terre légume très consommé par la population Algérienne. Le premier apport de nos travaux réside dans la démonstration des effets délétères d'une exposition chronique pendant trois mois aux deux pesticides, mancozebe et métribuzine, chez des rats mâles et femelles, à des concentrations faibles. La plupart des études ultérieures utilisent des doses relativement fortes et les effets à faibles doses sont moins bien décrits.

Les premiers résultats significatifs de notre étude montrent que les deux pesticides testés induisent une chute de poids corporel des rats consécutive à une perte d'appétit et une réduction d'apport énergétique quotidien. La réduction de la consommation alimentaire et de l'apport énergétique est de plus en plus importante lorsque la dose testée augmente. La chute du poids est associée à une fonte musculaire, à une hyperglycémie, une hypertriglycémie et une hypocholestérolémie notée dans le cas de la métribuzine. Ces altérations sont associées à une élévation des taux sériques de créatinine, d'urée et des transaminases chez les rats mâles et femelles reflétant une toxicité dose-dépendante. De plus, les perturbations biochimiques induites par les pesticides concernent aussi les fractions lipoprotéiques.

Il faut aussi noter que les deux pesticides entraînent une augmentation des teneurs en lipides hépatiques, musculaires et intestinales et une réduction des lipides du tissu adipeux, reflétant une distribution anormale des lipides. En plus, les teneurs en protéines sont aussi altérées, avec diminution des teneurs en protéines hépatiques, musculaires et adipocytaires par la métribuzine, alors que le mancozebe entraîne une augmentation des protéines de tissu adipeux et une réduction des protéines musculaires et intestinales, très accentuées avec les doses élevées.

A coté de ces altérations biochimiques, l'activité enzymatique est aussi modifiée. La métribuzine entraîne une augmentation significative de l'activité des enzymes lipases hépatique, musculaire, adipocytaire et intestinale. Concernant le mancozebe, l'activité enzymatique lipase est significativement augmentée au niveau du muscle alors que celle du foie, du tissu adipeux et de l'intestin reste normale. La LHS au niveau du tissu adipeux est augmentée seulement lors de l'exposition au mancozebe.

Un autre marqueur enzymatique, l'activité du L CAT sérique est significativement réduite lors de l'exposition avec les deux pesticides.

Une modification du statut oxydant / antioxydant est notée chez ces rats qui montrent une augmentation des teneurs plasmatiques et tissulaires en malondialdéhyde, diènes conjuguées, protéines carbonylées et des marqueurs de l'oxydation des lipoprotéines en faveur d'un stress oxydatif évident. De plus, les teneurs sériques en vitamine C sont maintenues normales chez les rats consommant la pomme de terre traitée par le mancozebe et significativement réduites par la métribuzine. Les teneurs en glutathion réduit sont significativement réduites au niveau sanguin, hépatique et musculaire chez les rats traités par les deux types de pesticides. L'activité de l'enzyme catalase érythrocytaire est réduite par la métribuzine et augmentée par le mancozebe. Il est possible que la métribuzine et le mancozebe agissent comme des générateurs de radicaux libres altérant les systèmes de défense des différents organes.

L'étude histologique réalisée au niveau des organes (le foie, le muscle, le tissu adipeux, l'intestin) a permis de confirmer la toxicité de ces deux pesticides sur l'architecture tissulaire. En effet, la présence d'un infiltrat lymphocytaire au niveau de tous les organes, d'une nécrose hépatocytaire, d'une dissociation des fibres musculaires, d'une inégalité des tailles des adipocytes et d'une hyperplasie des follicules lymphoïde au niveau de l'intestin permet de confirmer la toxicité de ces deux pesticides.

Nos résultats permettent d'affirmer la toxicité des pesticides à faibles doses chez l'animal de laboratoire. Cependant, la démonstration d'un lien de causalité entre l'exposition aux pesticides et la présence d'un impact sur la santé chez l'homme pourrait être apportée par des études comparatives entre des populations ayant une alimentation conventionnelle et biologique.

Les recherches en termes de santé concernant l'exposition aux pesticides ont très bien démontré jusqu'à présent ses effets très néfastes sur notre organisme. Nous sommes actuellement dans une société où les gens veulent être informés de ce qu'ils consomment et leur santé les préoccupe d'avantage. Les lois existantes et les actions entamées pour régler le problème de résidus de pesticides sont bien, mais peu suffisantes. Ces lois doivent être plus strictes et comporter des solutions plus viables pour l'environnement et notre santé. En s'alliant vers une productivité biologique moderne nous pourrons arriver à faire de l'agriculture, une agriculture propre, qui aura

de meilleurs avantages sur notre santé et environnement en plus de faciliter le développement de l'économie locale.

Perspectives

Une des principales limites de nos études est l'état plutôt descriptif des résultats, lié pour beaucoup, au temps qui nous était imparti, 3 années, pour mettre en place, au laboratoire, la démarche conceptuelle ainsi que les approches techniques pour la développer. Nous avons encore besoin de temps pour explorer différentes pistes de recherche qui nous permettront de mieux évaluer et expliquer les phénomènes observés pendant ces 3 années. Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives et appellent un prolongement de certaines études afin de pouvoir approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets néfastes de l'utilisation des pesticides. Ces perspectives sont donc nombreuses et concernent les points suivants :

- Il serait intéressant de prolonger la durée d'exposition des animaux afin de savoir si les perturbations fonctionnelles et moléculaires observées pourraient aboutir à l'apparition des pathologies. En parallèle, des études plus approfondies (étude de génotoxicité) permettront de savoir l'atteinte de l'expression des gènes suite à l'exposition aux pesticides, et de conclure ainsi sur la possibilité d'un lien direct avec le développement de pathologies comme le cancer.
- De tester ces pesticides sur le système reproductif (testicules) et de savoir l'action de ces molécules sur la vitesse, la concentration, la mobilité et au niveau de la morphologie des spermatozoïdes, afin de déterminer un lien avec la stérilité.
- De voir l'effet de la combinaison de ces deux molécules (métribuzine et mancozèbe) sur le métabolisme en général, afin de se rapprocher au maximum à la consommation alimentaire humaine.
- De suivre ces pesticides dans l'organisme et rechercher leurs voies d'élimination.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aboul-Soud MA, Al-Othman AM, El-Desoky GE, Al-Othman ZA, Yusuf K, Ahmad J, Al-Khedhairi AA (2011). Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats. *J Toxicol Sci.*;36:285-296.
2. Abuja PM, Albertini R (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin ChimActa* 306:1–17.
3. Adesiyan A, Titilola O, Oyejola A, SunnyO.Abarikwu A, Matthew O, Oyeyemi B, Ebenezer OF (2011). Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology* 63 : 201–207.
4. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J (2008). Overproduction of very low- density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1225-2136.
5. Aebi H (1974). Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*, 2nd : H U Bergmeyer Verlag Chemie GmbH, Weinheim. 2: 673–684.5- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme* 74 : 636–643.
6. Afonso Valéry, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin, Abderrahim Lomri (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme* 74 .636–643.
7. Ajiboye TO (2010). Redox status of the liver and kidney of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (DDVP) treated rats. *Chem Biol Interact.* 14;185-202.
8. Alavanja MC, Hoppin JA, Kamel F (2004). Health effects of chronic pesticide and childhood cancer and Neurotoxicity. *Annu Rev Public Health.* 25:155-197.
9. Al-Awthan YS, Al-Douis MA, El-Sokkary GH, Aqlan EM (2012). Dimethoate-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of Guinea pig and the protective effect of vitamin C and E. *Asian J. Biol. Sci.* 5:9-19
10. Albers JJ, Chen CH, Lacko AG (1986). Isolation, characterization, and assay of lecithin-cholesterol acyltransferase. *Methods Enzymol.* 129:763-783.
11. Alici HA, Ekinçi D, Beydemir S (2008). Intravenous anesthetics inhibit human paraoxonase-1 (PON1) activity in vitro and in vivo. *Clin. Biochem.* 41: 1384–1390.
12. Aligon D, Bonneau J, Garcia G, Gomez D (2010). Projet d'estimation des risques sanitaires. *Ecole des hautes études en santé publique.* P7.
13. Amine L (2009). Danger sur la santé des pesticides dans vos assiettes ! *Quotidien d'Oran.* P5.

14. Andersen HR., Vinggaard A M., Ras mussen TH, Gjermansen I. M, Bonnefeld-Jorgensen E C (2002). Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1 : 1-12.
15. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner M K (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308: 1466-1469.
16. Aouacheri, W, Saka, S, Djafer, R, (2009). The toxic effect of an insecticide (alphamethrin) on the activity of detoxifying glutathione enzymatic system. *Ann. Toxicol. Anal.* 21:25-129.
17. Astiz M, Alaniz MJ, Marra CA (2012). The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. *Neurochem Int.* 61:1231-1241.
18. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A (2005). Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*. 212:116–123.
19. Azéma C (1990). La triglycérine lipase hépatique: son action hydrolytique au sein des lipoprotéines de haute densité, son intérêt bioclinique. Thèse de l'université Paul Sabatier, Toulouse.
20. Baldi I, Cantagrel A, Lebailly P, Tison F, Dubroca B, Chrysostome V, Dartigues J F, Brochard P (2003). Association between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France. *Neuroepidemiology*. 22: 305-310.
21. Baligar PN, Kaliwal BB (2001). Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb. *Ind Health*. 39:235-43.
22. Baril A, Whiteside M, Boutin C (2005). Analysis of a database of pesticide residues on plants for wildlife risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry*. 24: 360-371.
23. Baskin SI , Salem H (1994). *Oxidant, Antioxidant and Free Radicals*. Academic press Inc. 363:25-62.
24. Battaglia V (2009). Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocytes primary cultures. *Int J Biochem Cell B*. 41:586–94.
25. Beaudeau JL, Dominique BR. (2005). Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. *Edition médicales. Internationales* p : 550.
26. Bencheikh S (2010). Les pesticides : définition, classification et données de toxicovigilance. *Toxicologie*. 4 : 1-16.
27. Berger M M (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 :48–53.
28. Bertrand P, Christine A, Béatrice J, Caroline D, Ronald B, Xavier C (1995). La triglycérine lipase hépatique: structure, régulation, rôles métaboliques et implications physiopathologiques. *Mini-revues Sang Thrombose Vaisseaux*. 7 : 165-74, .

29. Bhatti JS, Sidhu IPS, Bhatti GK, (2011). Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 353 : 139–149.
30. Bolognesi C (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring Studies. *Mutat Res.* 543: 251–572.
31. Bonnard ND, Jargot M, Falcy, Fastier A, Ouadar S, Rambourg MO (2011). Fiche établis par les services techniques et médicaux de l'INRS avec la participation de l'AFSSA.
32. Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudeau JL, Théron P, Legrand A, Delattre J (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose oxydative stress. *Nutrition clinique et métabolisme.* 16 : 260-267.
33. Bourguignon JP, Parent A S (2010). Early homeostatic disturbances of human growth and maturation by endocrine disrupters. *Current Opinion in Pediatrics.* 22 : 470-477.
34. Bouziani M (2007). L'usage immodéré des pesticides: De graves conséquences sanitaires. *Santemaghreb. Le guide de la médecine et de la santé.* pp8.
35. Bouziani M (2006). L'eau dans tous ces états : source de vie, ressource épuisable, maladies hydriques et pollution et chimiques. *Edition Dar el Gherb. Nov.Oran.* PP 265.
36. Bordjiba O, Ketif A (2009). Effet de Trois Pesticides (Hexaconazole, Bromuconazole et Fluazifop-p-butyl) sur quelques Métabolites Physio-Biochimiques du Blé dur : *Triticum durum*. *Desf. European Journal of Scientific Research ISSN.* pp.260-268.
37. Burstein M, Fine A, Atger V (1989). Rapid method for the isolation of two purified subfractions of high density lipoproteins by differential dextran sulfate magnesium chloride precipitation. *Biochem.* 71: 741-746.
38. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R (1970). Rapid method for the isolation of lipoproteins by precipitation with polyanions. *JLR.* 11: 583-595.
39. Bush SJ, Barnhart RL, Martin GA, Flanagan MA, Jackson RL (1990). Differential regulation of hepatic triglyceride lipase, and 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-CoA-reductase gene expression in a human hepatoma cell line, Hep G2. *JBiol Chem.* 265 : 22474-22479.
40. Calabresi L, Franceschini G (2010). Lecithin : cholesterol acyltransferase, high density lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends. Cardiovas. Med.* 20 :50-53.
41. Camard JP (2010). Produits phytosanitaires risques pour l'environnement et la santé. P11.
42. Campos-Pereira FD, Oliveira CA, Pigoso AA, Silva-Zacarin ECM, Barbieri R, Erika F. Spatti, M A. Marin M, Grasiela D.C, Severi-Aguiar (2012). Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: A morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* P :170-177.
43. Carisse D (2013). Comment bien utiliser ses fongicides – systémiques, translaminaires et cie – dans l'oignon. *Agriculture et agroalimentaire, Canada.* P2.

44. Ceyhun SB, Senturk M, Erdogan O, Kufrevioglu OI (2010). In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97: 177-181.
45. Charbonnel J (2003). Contribution de l'atmosphère à l'exposition aux pesticides par la consommation de produits de jardin. École nationale de la santé publique.P2.
46. Chiali FZ., Merzouk H, Merzouk SA, Medjdoub A, Narce M (2013). Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 106 : 38–44.
47. Choudhary N, Sharma M., Verma, P, Joshi SC (2003). Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. *J. Environ. Biol.* 24: 305-308.
48. Chubilleau C, Pubert M, Comte J, Giraud J (2011). Pesticides et santé. Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007. Rapport n° 136.
49. Cluzeau S, Patunelle MC, Lhoutellier C (2000). Index phytosanitaire. Association de coordination technique agricole, ACTA, Paris. 644 p.
50. Cillard P (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydatons. *OCL.* 1 : 24-29.
51. Coban TA, Beydemir S, Gulcin I, Ekinici D (2008). The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: An in vivo and in vitro study. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* 23: 266-270.
52. Cole DC, Carpio F, Julian J, Leon N (1998). Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides. *J Toxicol Environ Health A.* 55: 77-91.
53. Colvin PL, Auerbach BJ, Case LD, Hazzard WR, Applebaum-Bowden D(1991). A dose-response relationship between sex-hormone-induced change in hepatic triglyceride lipase and high density lipoprotein cholesterol in postmenopausal women. *Metabolism* ; 40 : 1052-1056.
54. Cravedi J P, Zalko D, Savouret J F, Menuet A, Jegou B (2007). The concept of endocrine disruption and human health. *Med Sci Paris.* 23: 198-204.
55. Cuzzocrea S, Mazzon E, dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D (2002). A rôle of superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol.* 16: 67–76.
56. Datta S, Dhar P, Mukherjee A, Ghosh S (2010). Influence of polyphenolic extracts from *Eurydra fluctuans* on oxidative stress induced by acephate in rats. *Food Chem Toxicol.* 48: 2766-2771.
57. Defraigne JO, Pincemail J (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liège.* 63 : 10-19.
58. Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspect biologique et pathologiques. Lavoisier édition TEC& DOC édition médicales internationales paris. 1_405p.

- 59.** Derache R (1986). Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation–Lavoisier : Paris. 299-321p.
- 60.** Domingues A, Barbisan LF, Martins PR, Spinardi-Barbisan AL (2011). Diuron exposure induces systemic and organ-specific toxicity following acute and sub-chronic exposure in male Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 31: 387-396.
- 61.** Dominique BR, Peynet J, Beaudeau JL, Théron P, Legrand A, Delattre J (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose Oxidative stress, vascular function and atherosclerosis. *Nutrition clinique et métabolisme* 16 : 260–267.
- 62.** Donadio C, Lucchesi A, Tramonti G, Bianchi C(1997). Créatinine clearance predicted from body cell mass is a good indicator of renal function, kidney. *Inter Suppl .* 63: 166–8.
- 63.** Draper H, Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:421-431.
- 64.** Ducros V, Favier A (2004). Métabolisme du sélénium. EMC-Endocrinologie. 1 : 19–28.
- 65.** Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine.* Gvozdkakova A (ed). P : 19-43.
- 66.** Duval M (2009). L’histoire des phytosanitaires de l’origine à 2030. Santé sécurité au travail. P64.
- 67.** ECH: European commission health (2009). Consumer protection directorate-general, Chemicals, contaminants and pesticides, Mancozeb. SANCO/4058/2001– Rev. 4.4 July.
- 68.** ECH: European commission health (2006). Consumer protection directorate-general, Chemicals, contaminants and pesticides, Metribuzin. SANCO/10051/2006 –Rev. 1.1 November.
- 69.** Eisenberg S, Gavish D, Oshry Y, Fainaru M, Deckelbaum R (1984). Abnormalities in very low, low and high density lipoproteins in hypertriglyceridaemia. Reversal toward normal with bezafibrate therapy. *J clin invest .* 74 : 470-482.
- 70.** Ekinici D, Beydemir S, (2009). Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON1: A major bioscavenger against cardiovascular diseases. *Eur J. Pharmacol.* 617: 84-89.
- 71.** Ekinici D, Beydemir S, Alim Z (2007). Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase_I and II. *Pharmacol. Rep.* 59: 580-587.
- 72.** El-Banna SG, Attia AM, Hafez AM, El-Kazaz SM (2009). Effect of garlic consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in rat males exposed to chlorpyrifos. *Slovak J. Anim. Sci.* 42: 111-117.
- 73.** El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH (2004). Role of alpha-tocopherol and beta-carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato-biochemical parameters, and semen quality of male rats. *J Environ Sci Health* 39: 443–459.

- 74.** El-Kady. AA, Sharaf HA, Mahmoud A A-D, Abbès S , Ben Salah-Abbès J, Naguib K, Oueslati R , Mosaad A. A-W (2009). Adsorption of Cd²⁺ ions on an Egyptian montmorillonite and toxicological effects in rats *Applied Clay Science* . 44 : 59–66.
- 75.** Ellman GL (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82: 70-77.
- 76.** Eschwège. P (2005). Quelles sont les informations fournies par la transplantation rénale sur la protection rénale ?. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 24 : 182–193.
- 77.** Esterbauer H, Stregl G, Puhl H, Rotheneder M (1989). Oxydation in vitro des lipoprotéines plasmatiques: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Biology Medical*. 6: 67 - 75.
- 78.** Even I, Berta JL, Volatier JL (2002). Evaluation de l'exposition théorique des nourrissons et des enfants en bas âge aux résidus de pesticides apportés par les aliments courants et infantiles. *Agence française de sécurité sanitaire des aliments*.p16.
- 79.** Fain O (2004). Vitamin C deficiency. *La revue de médecine interne* 25 :872–880.
- 80.** FAO (1992). “Food and Nutrition at the turn of the millennium”, (Document U259/E/1.092/100.500), Roma.
- 81.** Farombi EO, Abarikwu SO, Adedara IA, Curcumin Oyeyemi MO (2007). Kolaviron ameliorate di-n-butylphthalate-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 100: 43–48.
- 82.** Faudemay F, Griffaton G, Dupuy F, Rozen R, Lowy R (1976). Short term effects of diets with high levels of dithiocarbamates on carbohydrate and lipid metabolism of rat liver. *Ann Nutr Aliment*. 29: 371-94.
- 83.** Favier A (2003). Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. p 108 – 115.
- 84.** Fetoui H, Makni M, Garoui EM, Zeghal N (2010). Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: involvement of oxidative stress and protective role of Ascorbic acid. *Exp Toxicol Pathol*. 62: 593–9.
- 85.** Folch J, Lees M, Sloanes_ Stanley GH (1975). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol. Chem*. 226 : 1861_1868.
- 86.** Foltz CH, Ullman-Culleré MH (1999). Guidelines for assessing the health and condition of mice. *Lab Animal*. 28: 28-32.
- 87.** Fontaine E, Barnoud D, Schwebel C, Lerverve X (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*; 11 : 411-420.
- 88.** Foster WG, Neal M S, Younglai E.V (2004). Endocrine disrupters and ovarian function. *International Congress Series*. P : 126-132.
- 89.** Faraci S, Didion P (2004). *Vascular Protection Superoxide*

Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Thrombosis and Vascular Biology*. Vol

24. 1367 p.

90. Frayn KN (2005). Obesity and metabolic disease: is adipose tissue the culprit. *Proceedings of the Nutrition Society*. p 7-13.

91. Fréry N, Saoudi A, Garnier R, Zeghnoun A, Falq G (2011). Exposition de la population française aux substances chimiques de l'environnement. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire. p151.

92. Garoui EM, Fetoui H, Ayadi Makni F, Boudawara T, Zeghal N. Cobalt (2011). chloride induces hepatotoxicity in adult rats and their suckling pups. *Experimental and Toxicologic Pathology*. P 9-15.

93. Gagnon MC, Étienne M JC (2010). Pesticides et santé. Assemblée nationale sénat, constitution du 4 octobre 1958. N° 2463.P 819-833.

94. Godon D, Lajoie P, Thouez JP, Nadeau D (1989). Pesticides et cancers en milieu rural agricole au Québec: Interpretation géographique. P13

95. Gorse I (2005). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2001, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Envirodoq : No ENV/2005/0140, P70.

96. Grajewski O, Oberdisse E (1977). Increase of serum very low density lipoproteins in rats after administration of alpha-hexachlorocyclohexane. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* . 298(2):129-35.

97. Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 2175–2183.

98. Groussard C (2006). Oxidative stress and anaerobic exercise. *Science & Sports* 21 : 62–67.

99. Grun F, Blumberg B (2009). Endocrine disrupters as obesogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 304 : 19-29.

100. Grunfeld H T, Bonefeld-Jorgensen E C (2004). Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels. *Toxicology Letters*. 151 : 467-480.

101. GTPWOAUFSP (Guidelines To Promote The Wellbeing Of Animals Used For Scientific Purposes) (2008). Planning, conducting and reviewing research protocols to maximise wellbeing and minimise pain and distress in animals. Australian Government. 41p.

102. Guyton K, Xu Q, Holbrook N (1996). Induction of the mammalian stress response gene GADD 153 by oxidative stress : rôle of AP-1 element. *Biochem J*. 314 : 547-554.

103. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*; 62. 10 : 628-638.

- 104.** Halliwell B, Gutteridge JM (1990). Rôle of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1–85.
- 105.** Hamzaoui A (2009). Les antioxydants peuvent – ils prévenir les cancers? *Société Tunisienne de médecine interne.* p93.
- 106.** Hazarika A, Sarkar SN, Kataria M (2001). Subacute toxicity of anilofos, a new organophosphorus herbicide in male rats: effect on lipid peroxidation and ATPase activity. *Indian J Exp Biol;*39:1113–7.
- 107.** Heller FR, Harvengt C (1983). Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaeamic subjects. *Eur J Clinical Pharmacol.*25 : 57-63.
- 108.** Hong SK, Anestis DK, Valentovic MA, Ball JG, Brown PI, Rankin GO (1998). Gender differences in the potentiation of N-(3,5-dichlorophenyl) succinimide metabolite nephrotoxicity by Phenobarbital. *J Toxicol Environ Health A.* 54: 613-632.
- 109.** Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson V S, Hartig PC, Ankley GT (2008). Fifteen years after “Wingspread” – Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go. *Toxicological Sciences.* 105: 235-259.
- 110.** Howard BV (1987). Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 28: 613-628.
- 111.** Ibrahim NA, El-Gamal BA (2003). Effect of diazinon, an organophosphate insecticide, on plasma lipid constituents in experimental animals. *J Biochem Mol Biol.* 36: 499-504.
- 112.** INRA – Cemagref : Institut Nationale de la Recherche Agronomique- Centre national du Machinisme Agricole, du Génie Rural, des Eaux et des Forêts (2005) Pesticides, agriculture et environnement : réduire l’utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. *Rapports INRA.*
- 113.** Jacobsen H, Ostergaard G, Lam HR, Poulsen ME, Frandsen H, Ladefoged O, Meyer O (2004). Repeated dose 28-day oral toxicity study in Wistar rats with a mixture of five pesticides often found as residues in food: alphacypermethrin, bromopropylate, carbendazim, chlorpyrifos and mancozeb. *Food Chem Toxicol.* 42: 1269-1277.
- 114.** Jacota SK, Dani HM (1982) A new colorimetric technique for estimation of vitamine C using folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry.* 127(1):178-182.
- 115.** Jakubowski M, Trzcinka-Ochocka M (2005). Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health.* 47: 22-48.
- 116.** Jeffrey M, Charles C, Thomas R, Hanley JR, Ronald D, Wilson, Ravensnay BV, James B (2001). Developmental toxicity studies in rats and rabbits on 2,4 dichlorophenoxyacetic acid and its forms. *Toxicological sciences.* 60 : 121-131.

- 117.** Jennifer L. Rayner AC, Rolondo R, Enoch CL, Douglas C. Wolf B, Suzanne E, Fenton (2007). Atrazine-induced reproductive tract alterations after transplacental and/or lactational exposure in male Long–Evans rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 218 : 238–248.
- 118.** Kabbaj O, Yoon SR, Holm C, Rose J, Vitale ML, Pelletier MR (2003). Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustelavison*). *Biol Reprod*. 68:722–734.
- 119.** Kachar R, Mithilesh K, Srivastara, Rajendra BR (1997). Studies on rat thyroid after oral administration of mancozeb: evaluations. *J. Applied toxicol*.17 : 369-375.
- 120.** Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Açikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y (2005). Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 211: 197-206.
- 121.** Kamboj A, Kiran R, Sandhir R (2006). Carbofuran-induced neurochemical and neurobehavioural alterations in rats: attenuation by N-acetylcysteine. *Exp Brain Res*. 170: 567–575.
- 122.** Katagi T (2010). Bioconcentration, bioaccumulation and metabolism of pesticides in aquatic organisms. In: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York. pp. 1–132.
- 123.** Kehrer JP (1993). Free radcals as mediators of tissue injury and disease. *Critical review in toxicology*. 23: 21-48.
- 124.** Kinoshita M, Teramota T (2001). LCAT (lécithine : cholésterol acyltransferase). *Rinsho Byori Suppl*. 116 : 125-130.
- 125.** Koechlin-Ramonatxo C (2006). Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 : 165–177.
- 126.** Koner BC, Banerjee BD, Ray A (1998). Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian J Exp Biol*. 36: 395–398.
- 127.** Konstantinova SG, Russanov EM (1999). Studies on paraquat-induced oxidative stress in rat liver. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 24:107–111.
- 128.** Kumar JAR, Rajini PS (2009). Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: Role of gluconeogenesis. *Toxicology*. 257: 40-45.
- 129.** Ksheerasagar RL, Hiremath MB, Kaliwal BB (2011). Impairment of hepatic biochemical contents and enzymes activities during carbosulfan intoxication in albino mice, *Inter. Multidisc. Res. J*. 3: 6-15.
- 130.** Ksheerasagar RL, Kaliwal BB (2006). Histological and Biochemical Changes in the Liver of Albino Mice on Exposure to Insecticide, Carbosulfan. *Caspian J. Env. Sci*. 4 : 67-70.

- 131.** Lacan Bionov D (2001). Oxydants /Antioxydants : un équilibre important. .p4.
- 132.** Levine RL, Garland D, Oliver CN, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464–478.
- 133.** Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randall RI (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- 134.** Lucić A, Bradamante V, Radić B, Peraica M, Domijan AM, Fuchs R, Stavljenić-Rukavina A (2002). The effect of dichlorvos treatment on butyrylcholinesterase activity and lipid metabolism in rats. *Arh Hig Rada Toksikol.* 53: 275-281.
- 135.** Mahadevaswami MP, Jadaramkunti UC, Hiremath MB, Kaliwal BB (2000). Effect of mancozeb on ovarian compensatory hypertrophy and biochemical constituents in hemicastrated albino rat. *Reprod Toxicol.* 14: 127-134.
- 136.** Mallem l, keck G, franck M, boulakoud MS (2007). Effets du Manèbe sur la thyroïde et la fertilité du lapin. *Revue Méd. Vét.* 158 : 452-457.
- 137.** Manser CE (1992). The assessment of stress in laboratory animals. Harsham (United Kingdom): RSPCA. p208.
- 138.** Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, Tell G, Tiribelli C (2008). Molecular basis and mechanisms of progression of nonalcoholic steatohepatitis. *Trends Mol Med.* 14: 72–81.
- 139.** Mathé j p et climent M (2004). Elément d'évaluation et de gestion du risque sanitaire lié aux pesticides pour les consommateurs d'eaux et de fruits et légumes. Ecole national de la santé publique.
- 140.** Maurey C (2005). Sémiologie biologique urinaire Urinary biological semiology. EMC-Vétérinaire. 2 : 156–168.
- 141.** Mc Cauley LA, Anger WK, Keifer M, Langley R, Robson MG, Rohlman D (2006). Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides. *Environ Health Perspect.* 114: 953-960.
- 142.** Mc Lachlan J A, Simpson E, Martin M (2006). Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism.* 20 : 63-75.
- 143.** Mehta A, Verma RS, Srivastava N (2008). Chlorpyrifos-induced DNA damage in rat liver and brain. *Environ. Mol. Mutagen.* 49: 426-433.
- 144.** Meyer JW, Schmitt ME (2000).. A central rôle for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS lett.* 472:1–4.
- 145.** Momas I, Caillard JF, Lesaffre B (2004). Plan National Santé Environnement. Rapport de la Commission d'Orientation. La Documentation Française. p296.

- 146.** Moser VC (2007). Animal models of chronic pesticide neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol.* 26: 321-331.
- 147.** Morena M., Martin-Mateo M, Cristol JP, Canaud B (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie.* p. 201-208.
- 148.** Morigushi EH, Tamachi H, Goto Y (1990). Hepatic lipase activity and high density lipoproteins in familial hypercholesterolaemia : adaptational mechanisms for LDL-receptor deficient state. *Tokai. J Exp Clin Med.* 15 : 401-406.
- 149.** Multigner L (2005). Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. *Environnement, risques & santé.* 4: 187-194.
- 150.** Mulvihill EE, Assini JM, Lee JK, Allister EM, Sutherland BG, Koppes JB, Sawyez CG, Edwards JY, Telford DE, Charbonneau A, St-Pierre P, Marette A, Huff MW (2011). Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* 60: 1446-1457.
- 151.** Nakagawa Y, Tayama K (1997). Acute hepatotoxic potential of imazalil fungicide in rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 : 402–407.
- 152.** Nebbia C, Dacasto M, Valenza F, Burdino E, Ugazio G, Fink-Gremmels J (1995). Effects of the subchronic administration of zinc ethylene-bis-dithiocarbamate (zineb) to rabbits. *Vet Hum Toxicol.* 37:137-42.
- 153.** Nève J, Vertongen F, Peretz A, Carpentier YA (1989). Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge. *Ann Biol Clin.* 47 :138-143,
- 154.** Noriega GO, Gonzales S, Tomaro ML, Batlle AM (2002). Paraquat-generated oxidative stress in rat liver induces heme oxygenase-1 and amino levulinic acid synthase. *Free Radic Res.* 36: 633-639.
- 155.** Nwani,C.D.,Lakra,W.S.,Nagpure,N.S.,Kumar,R.,Kushwaha,B.,Srivastava,S.K., (2010) . Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the fresh waterfish *Channa punctatus* (Bloch).*Int.J.Environ.Res.PublicHealth.* 7 : 3298–3312
- 156.** OCDE: Organisation for Economic Co-operation and Development (2001). Guidance document on Acute Oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on testing and assessment. N : 24.
- 157.** OCDE: Organisation for Economic Co-operation and Development (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment. N: 19.

- 158.** Oerke E, Dehne H (1997). Global crop production and the efficacy of crop production current situation and futures trends. *European Journal of Plant Pathology*. 103 : 203- 215.
- 159.** OMS (1997). Guide pour le calcul prévisionnel des quantités des résidus de pesticide apportée par l'alimentation. P31.
- 160.** Onil S (2005). Votre santé vous préoccupe ? attention aux pesticides ! CRAAQ colloque sur la sericulture. P16.
- 161.** Onil, S et Louis S.L (2001). Guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraichères. P81.
- 162.** Padma VV, Lalitha G, Shirony NP, Baskaran R (2012). Effect of quercetin against lindane induced alterations in the serum and hepatic tissue lipids in wistar rats. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2: 910-915.
- 163.** Pasquier C (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*. N°276.
- 164.** Patel S, Singh V, Kumar A, Gupta YK, Singh MP (2006). Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: mechanism of neurodegeneration. *Brain Res*. 1081: 9-18.
- 165.** Pedraza-Chaverri J, Murali NS, Croatt AJ, Alam J, Grande JP, Nath KA (2006). Proteinuria as a determinant of renal expression of heme oxygenase-1: studies in models of glomerular and tubular proteinuria in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290: 196–204.
- 166.** Perlemuter L, Selam JL, Collin de L'hortet G (2003). *Diabète et maladies métaboliques*. 4ème édition. Paris Masson. P 313_316.
- 167.** Phillips KP, Tanphaichitr N (2008). Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 11 : 188-220.
- 168.** Picó Y, Font G, Mañes J (2004). *Handbook of food analysis*, 2nd Ed., L. M. L. Nollet (Ed). Marcel Dekker, New York, NY. p1072.
- 169.** Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO (1998). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*. 4: 1-4.
- 170.** Postic C, Girard J (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance ; lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*. 118 : 829-838.
- 171.** Prsamthi K, Muralidhara, Rajini PS (2005). Fenvalerate induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food Chem Toxicol*. 43: 299–306.
- 172.** Qiu W, Federico L, Naples M, Avramoglu RK, Meshkani R, Zhang J, Tsai J, Hussain M, Dai K, Iqbal J, Kontos CD, Horie Y, Suzuki A, Adeli K (2008). Phosphatase and tensin homolog (PTEN) regulates hepatic lipogenesis, microsomal triglyceride transfer protein, and the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Hepatology*. 48: 1799-1809.

- 173.** Quistad GB, Liang SN, Fisher H J, Nomura DK, Casida JE (2006). Eash lipase has a unique sensitivity profile for organophosphorus inhibitors. *Toxicol sci.* 91 : 166-172.
- 174.** Ragab A, Rittner U, Danet C, Ragab J, Chap H, Perret BP (1994). Competitive PCR as a tool to study hepatic lipase regulation in Hep G2 cells. *Mol Biol and Medicine*; in press.
- 175.** Rai D K, Rai P K, Gupta A, Geeta W, Bechan S (2009). Cartap and carbofuran induced alterations in serum lipid profile of wistar rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24 : 198-201.
- 176.** Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G (2010). A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol.* 53: 372–384.
- 177.** Ré DB, Nafia I, Nieoullon A, Kerkerian L, Had-Aissouni L (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d’Anesthésie et de Réanimation.* 24 : 502–509.
- 178.** Reed DJ, Fariss MW (1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev.* 36: – 33.
- 179.** Renugadevi J S, Milton P (2009). Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology.* 256 : 128–134.
- 180.** Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Moller W (1999). Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett,* , 448 : 120-122.
- 181.** Renugadevi J S, Milton P (2009). Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology .* 256 : 128–134.
- 182.** Repetto R, Baliga SS (1996). *Pesticides and the Immune System : The Public Health Risks*, World Ressources Institute, Washington DC. p5.
- 183.** Riox C (2009). Stress oxydatif et prevention des maladies chroniques. La supplementation s’impose t-elle ?. *médecine sociale t preventive faculté de medecine universut é la val Québec.*
- 184.** Ritz P, Sallé A, Couet C (2007). How can we explain weight stability following weight loss? *Revue Obésité.* 1: 72-78.
- 185.** Rodvall Y, Dich J, Wiklund K (2003). Cancer risk in offspring of male pesticide applicators in agriculture in Sweden. *Occup Environ Med.* 60: 798-801.
- 186.** Romao PR, Tovar J, Fonseca SG, Morales RH, Cruz AK, Hothersall JS (2006). Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz JMed Biol Res.* 39: 355–363.
- 187.** Saafi-Ben Salah EB, El Arem A, Louedi M, Saoudi M, Elfeki A, Zakhama A, Najjar MF, Hammami M, Achour L (2012). Antioxidant-rich date palm fruit extract inhibits oxidative stress and nephrotoxicity induced by dimethoate in rat. *J Physiol Biochem.* 68: 47-58.

- 188.** Salem MM (2011). Toxic effects of mancozeb containing formulations and neem pesticides on kidney function and ultrastructure of albino rats, Egypt. Acad. J. Biol. Sci. 3 (2011) 17–30.
- 189.** Salle BL, Laborie S, Dain E, Claris O (2002). Vitamine liposolubles et allaitement. *J Ndiatr Pu&iculture*. 15 : 454-462.
- 190.** Sankar P, Telang AG, Manimaran A (2012). Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol*. 64: 487-493.
- 191.** Schafer FQ, Buettner GR (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol Med*. 30:1191–1212.
- 193.** Schmitt B, Ferry C, Daniel N, Weill P, Kerhoas N, Legand P (2006). Effet d'un régime riche en acides gras ω 3 et en CLA9-cis, 11 trans sur l'insulinorésistance et les paramètres du diabète de type 2. *OCL Vol 13*. N°1 : 70-75.
- 194.** Senturk M, Ceyhun SB, Erdogan O, Kufrevioglu OI (2009). In vitro and in vivo effects of some pesticides on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *Pestic. Biochem. Physiol*. 95: 95-99.
- 195.** Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD (2005). Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology*. 215:173–181.
- 196.** Siddharth M, Datta SK, Bansal S, Mustafa M, Banerjee BD, Kalra OP, Tripathi AK (2012). Étude des concentrations de pesticides organochlorés chez les patients atteints de néphropathie chronique: association avec le taux de filtration glomérulaire estimé et le stress oxydatif. *J Biochem Mol Toxicol*. 26: 241-247.
- 197.** Siddiqui A, Ali B, Srivastava SP (1993). Effect of mancozeb on hepatic glutathione S-transferase in rat. *Toxicol Lett*. 68: 301-305.
- 198.** Singh M, Rajat S, Ravi K (2011). Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63 : 269–276.
- 199.** Singh M, Sandhir R, Kiran R (2006). Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides. *Indian J Exp Biol*. 44: 580–583.
- 200.** Sperry WM, Webb M (1950) Revision of cholesterol determination. *J Biol Chem*. 187:97-102.
- 201.** Srivastava AK, Srivastava PK, Al-Khedhairi AA, Musarrat J, Shukla Y (2012). Alléthrine la génotoxicité et du stress oxydatif dans des souris albinos suisses. *Mutat Res*. 747 : 22-28.
- 202.** Sultan F, Cardona-Sanclemente LE, Lagrange D, Lutton C, Griglio S (1990). Lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in a hypercholesterolaemic strain (RICO) of rat. *Biochem J*. 266 : 349-353.

- 203.** Szépvölgyi J, Nagy K, Sajgóné V K, Regöly-Mérei A, Soós K, Tóth K, Pintér A, Antal M (1989). Subacute toxicological examination of Dithane M-45. *Food Chem Toxicol.* 27: 531-538.
- 204.** Taylor F (1985) Flow-through pH-stat method for lipase activity. *Analytical Biochemistry.* 148: 149-153.
- 205.** Tekman B, Ozdemir H, Senturk M, Ciftci M (2008). Purification and Characterization of glutathione reductase from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 148: 117-121.
- 206.** Tellier S (2006). Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses, Direction des politiques en milieu terrestre, Service des pesticides, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. p90.
- 207.** Ter-Minassian A (2006). Cérébral metabolism and brain injury. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation.* 25 : 714–721.
- 208.** Tessier F, Marconnet P (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports.* 10 : 1-13.
- 209.** Thapar A, Sandhir R, Kiran R (2002). Acephate induced oxidative damage in erythrocytes. *Indian J Exp Biol.* 40: 963–966.
- 210.** Tietz NW, Astles JR, Shuey DF (1989) Lipase activity measured in serum by a continuous-monitoring pH-Stat technique-an update. *Clin Chem.* 35:1688-1693.
- 211.** Tomita M, Okuyama T, Katsuyama H, Ishikawa T (2006). Paraquat-induced gene expression in rat kidney. *Arch Toxicol.* 80: 687-693.
- 212.** Tron I, Piquet O, Cohuet S (2001). Effets chroniques des pesticides sur la santé : état actuel des connaissances. Observatoire Régional de la Santé (ORS) en Bretagne. 90p.
- 213.** Tsang MM, Trombetta LD (2007). The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes. *Toxicology and Industrial Health.* 7: 459–470.
- 214.** USEPA, Office of Water Report (2003). EPA 815-R-03-01352. P10.
- 215.** Valdemarsson S, Hansson P, Hedner P, Nilsson-Ehle P (1983). Relations between thyroid function, hepatic and lipoprotein lipase activities and plasma lipoprotein concentrations. *Acta Endocrinol.* 103 : 1-52.
- 216.** Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 44–48.
- 217.** Van-Linthout S, Spillmann F, Schultheiss HP, Tschöpe C (2010). High-density lipoprotein at the interface of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disorders. *Curr. Pharm.* 16: 1504-1516.

- 218.** vigourou_villard A (2006). Niveau d'imprégnation de la population générale aux pesticides : sélection des substances a mesuré en priorité. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et de travail.
- 219.** Wang H, Eckel RH (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297: 271-288.
- 220.** Wayland J, Edward R (1991). *Hand book of pesticide Toxicology, Classes of pesticide.* Academic Press, Inc. San Diego, California. USA. p1436- 1451.
- 222.** Wolff SP, Bascal ZA, Hunt JV (1989). .Autoxidative glycosylation. Free radicals and glycation thory. *Prog .clin Biol. Res.* 46: 129-139.
- 223.** Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134: 489–492.
- 224.** Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54 : 76-86.
- 225.** Yousef MI , Awad TI , Mohamed EH (2006). La deltaméthrine induite par les dommages oxydatifs et des altérations biochimiques chez le rat et son atténuation par la vitamine E. *Toxicologie.* 227: 240-247.
- 226.** Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Perkovic P (2006). Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology In Vitro.* 20: 923-935.
- 227.** Zhang X, Qi R, Xian X, Yang F, Blackstein M, Deng X, Fan J, Ross C, Karasinska J, Hayden MR, Liu G (2008). Spontaneous atherosclerosis in aged lipoprotein lipase–deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet. *Circ. Res.* 102: 250-256.
- 228.** Zou W, Yan M, Xu W, Huo H, Sun L, Zheng Z (2001). Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. *J Neurosci Res.* 64: 646–653.

ANNEXES

Tableau A1: Teneurs en cholestérol (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Sérum (g/L)	1,27±0,15 ^a	1,16±0,13 ^a	0,88±0,06 ^b	1,33±0,22 ^a	1,13±0,18 ^a	0,92±0,07 ^b	0,01
VLDL (g/L)	0,28±0,05 ^a	0,24±0,06 ^a	0,12±0,03 ^b	0,33±0,08 ^a	0,24±0,06 ^a	0,15±0,02 ^b	0,01
LDL (g/L)	0,42±0,06 ^a	0,40±0,06 ^a	0,27±0,03 ^b	0,45±0,07 ^a	0,39±0,03 ^a	0,29±0,02 ^b	0,01
HDL (g/l)	0,57±0,07	0,51±0,05	0,48±0,06	0,54±0,06	0,47±0,07	0,49±0,05	0,137
Mancozebe							
Sérum (g/L)	1,27±0,15	1,34±0,11	1,23±0,16	1,33±0,22	1,26±0,15	1,21±0,19	0,116
VLDL (g/L)	0,28±0,05	0,24±0,04	0,20±0,04	0,33±0,08	0,23±0,04	0,22±0,04	0,233
LDL (g/L)	0,42±0,06	0,48±0,05	0,46±0,04	0,45±0,07	0,47±0,05	0,40±0,06	0,165
HDL (g/L)	0,57±0,07	0,62±0,04	0,56±0,06	0,54±0,06	0,56±0,08	0,59±0,05	0,174

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

Tableau A2: Teneurs en triglycérides (g/L) du sérum et des lipoprotéines chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Sérum (g/L)	0,76±0,03 ^d	1,34±0,04 ^b	1,50±0,07 ^a	0,70±0,04 ^d	0,75±0,05 ^d	0,90±0,06 ^c	0,001
VLDL (g/L)	0,38±0,03 ^d	0,85±0,04 ^b	1,06±0,05 ^a	0,35±0,03 ^d	0,32±0,06 ^d	0,52±0,06 ^c	0,001
LDL (g/L)	0,22±0,04	0,31±0,06	0,27±0,05	0,20±0,05	0,20±0,06	0,23±0,04	0,234
HDL (g/L)	0,16±0,02	0,18±0,03	0,16±0,03	0,15±0,02	0,13±0,04	0,14±0,03	0,167
Mancozebe							
Sérum (g/L)	0,76±0,03 ^c	0,88±0,05 ^b	1,17±0,04 ^a	0,70±0,04 ^c	0,83±0,06 ^b	1,14±0,05 ^a	0,003
VLDL (g/L)	0,38±0,03 ^c	0,50±0,04 ^b	0,62±0,03 ^a	0,35±0,03 ^c	0,48±0,06 ^b	0,64±0,05 ^a	0,001
LDL (g/L)	0,22±0,04 ^b	0,22±0,02 ^b	0,38±0,03 ^a	0,20±0,05 ^b	0,20±0,04 ^b	0,36±0,02 ^a	0,01
HDL (g/L)	0,16±0,02	0,15±0,02	0,15±0,03	0,15±0,02	0,14±0,06	0,14±0,03	0,217

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

Tableau A3: Poids des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Foie (g)	12,05±1,24 ^a	11,73±1,75 ^a	11,03±1,79 ^a	8,37±0,39 ^b	8,33±0,49 ^b	8,23±0,59 ^b	0,01
Muscle (g)	4,29±0,28 ^a	3,33±0,17 ^b	2,90±0,12 ^c	4,49±0,33 ^a	3,43±0,13 ^b	2,36±0,14 ^c	0,01
Tissu adipeux (g)	4,85±0,40 ^b	5,13±0,38 ^b	6,93±0,29 ^a	4,43±0,35 ^b	4,66±0,40 ^b	6,33±0,25 ^a	0,01
Mancozebe							
Foie (g)	12,05±1,24 ^c	15,53±1,01 ^b	17,36±1,20 ^a	8,37±0,39 ^e	10,69±0,44 ^d	14,03±0,95 ^b	0,001
Muscle (g)	4,29±0,28 ^a	2,33±0,26 ^b	2,04±0,19 ^c	4,49±0,33 ^a	2,34±0,12 ^b	1,37±0,15 ^c	0,001
Tissu adipeux (g)	4,85±0,40	4,77±0,51	4,54±0,45	4,43±0,35	4,21±0,42	4,13±0,51	0,166

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

Tableau A4: Teneurs en lipides totaux (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Foie (mg/g)	122,40±14,17 ^c	139,80±11 ^c	177,40±23 ^b	117,20±16 ^c	123,82±17 ^c	255±40 ^a	0,01
Muscle (mg/g)	58,4±6,19 ^d	128±15,10 ^b	174±17,47 ^a	75,8±8,96 ^c	130,8±13 ^b	156±17 ^a	0,001
Tissu adipeux (mg/g)	233±23,57 ^a	208±20,35 ^b	159±12,59 ^c	230±26,6 ^a	185,8±17 ^b	134±21 ^c	0,001
Intestin (mg/g)	66,72±5,69 ^b	62,8±7,40 ^b	130,2±6,15 ^a	67,8±3,85 ^b	63,2±6,54 ^b	129±9,4 ^a	0,01
Mancozebe							
Foie (mg/g)	122,40±14,17 ^d	164,6±7,05 ^b	184±13,57 ^a	117,20±15,88 ^d	133,40±7,82 ^c	165,2±8,94 ^b	0,002
Muscle (mg/g)	58,4±6,19 ^c	119±9,31 ^c	146,8±8,58 ^a	75,8±8,96 ^d	113,9±7,39 ^c	132,2±9,76 ^b	0,001
Tissu adipeux (mg/g)	233±23,57 ^a	200,60±15,5 ^b	189±12,90 ^b	230±26,59 ^a	171,8±13,79 ^c	167,6±12,01 ^c	0,003
Intestin (mg/g)	66,72±5,69 ^c	137,4±8,04 ^b	182,8±5,38 ^a	67,8±3,85 ^c	133,8±8,26 ^b	177,60±7,26 ^a	0,01

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

Tableau A5: Teneurs en protéines totales (mg/g tissu) des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Foie (mg/g)	157,55±17,60 ^a	124,80±18 ^b	103±10 ^c	145±14,84 ^a	116,56±10 ^b	95,61±11 ^c	0,001
Muscle (mg/g)	98,2± 7,46 ^a	77± 5,82 ^b	54,22±3 ^c	73,24±5,74 ^a	54,62± 4,63 ^b	46,83±3,5 ^c	0,001
Tissu adipeux (mg/g)	19,53±5,64 ^a	14,6±4,80 ^b	8,2±2,35 ^c	16,68±3,23 ^a	10,6±3 ^b	7,21±1,64 ^c	0,001
Intestin (mg/g)	52,82±4,30	47,6±5,66	46,01±4,50	43,8±4,62	46,98±5,3	41,7±5,3	0,188
Mancozebe							
Foie (mg/g)	157,55±17,60	146,48±10,30	140,55±16,80	145±14,84	128,91±16,61	139,18±18,63	0,215
Muscle (mg/g)	98,2±4,46 ^a	81,95±3,38 ^b	70,4±2,49 ^d	75,24±3,74 ^c	66,87±3,40 ^e	60,2±2,39 ^f	0,004
Tissu adipeux (mg/g)	19,53±5,64 ^d	30,4±2,87 ^b	38,75±3,44 ^a	16,68±3,23 ^d	25,4±3,72 ^c	32,37±2,44 ^b	0,003
Intestin (mg/g)	52,82±4,30 ^a	26,54±2,07 ^c	23,4±2,60 ^c	43,8±4,62 ^b	23,57±2,67 ^c	20,69±1,59 ^d	0,004

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

Tableau A 6: Activités des enzymes lipases des organes chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
HTGL Foie (U/g/min)	273 ±25,32 ^c	357 ±61,54 ^b	456 ±22,97 ^a	257 ±27,60 ^c	341 ±38,28 ^b	494 ±38,02 ^a	0,001
LPL Muscle (U/g/min)	109 ±13,84 ^c	162,22±10,6 ^b	255,81±19 ^a	102 ±8,50 ^c	177±10,80 ^b	243,4±7,71 ^a	0,001
LPL Tissu adipeux (U/g/min)	162±13,41 ^b	165 ±17,72 ^b	331±36,19 ^a	166,6±19,52 ^b	158 ±17,87 ^b	371±26,07 ^a	0,01
LPL Intestin (U/g/min)	58,22±6,45 ^b	54,23±7,36 ^b	140,82±20 ^a	62±3,79 ^b	69,61±6,55 ^b	170,8±36,17 ^a	0,01
LHS Tissu adipeux (U/g/min)	148,84±17,56	143,2±13,65	154±16,75	141±18,05	145±11,15	132 ±29,13	0,152
Mancozebe							
HTGL Foie (U/g/min)	273 ±25,32	285,05±29,83	270,60±25,97	257 ±27,60 ^c	269,22±25,20	279,2±26,21	0,218
LPL Muscle (U/g/min)	109 ±13,84 ^c	153,53±19,15 ^d	194,62±20,85 ^c	102 ±8,50 ^c	229,6±12,69 ^b	286,21±19,3 ^a	0,001
LPL Tissu adipeux (U/g/min)	162±13,41	184,15±22,13	191,17±28,94	166,6±19,52	183,80±22,86	170,10±29,82	0,215
LPL Intestin (U/g/min)	58,22±6,45	57,92±6,52	59,2±7,41	62±3,79	63,20±4,70	66,6±7,03	0,227
LHS Tissu adipeux (U/g/min)	148,84±17,56 ^c	218±10,77 ^b	282,40±11,71 ^a	141±8,05 ^c	233,4±7,39 ^b	293,69±8,25 ^a	0,005

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

Tableau A7: Activité de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			<i>P</i> (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
LCAT (nmol/ml/h)	70,03±3,8 ^b	57,61±4,82 ^c	40,03±5,62 ^d	133,12±3,26 ^a	58,52±6,93 ^c	42,83±3,31 ^d	0,002
Mancozebe							
LCAT (nmol/ml/h)	70,03±3,80 ^c	71,10±3,53 ^c	55,01±2,60 ^d	133,12±3,26 ^a	96,4±7,71 ^b	45,95±2,13 ^e	0,002

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

Tableau A 8: Teneurs en vitamine C sérique et en glutathion érythrocytaire et activité de l'enzyme érythrocytaire catalase chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
Vitamine C ($\mu\text{mol/l}$)	26,36 \pm 1,65 ^a	27,13 \pm 2,90 ^a	19,28 \pm 1,39 ^b	25,30 \pm 1,38 ^a	2,26 \pm 1,46 ^a	17,03 \pm 1,87 ^b	0,01
Glutathion ($\mu\text{mol/l}$)	1,63 \pm 0,15 ^b	0,46 \pm 0,04 ^c	0,35 \pm 0,03 ^d	2,88 \pm 0,29 ^a	0,47 \pm 0,04 ^c	0,32 \pm 0,02 ^d	0,001
Catalase (U/min/ml)	113,19 \pm 7,96 ^a	86,18 \pm 3,42 ^b	59,27 \pm 2,74 ^c	79,27 \pm 2,74 ^c	69,67 \pm 4,53 ^d	60,07 \pm 1,98 ^e	0,001
Mancozebe							
Vitamine C ($\mu\text{mol/l}$)	26,36 \pm 1,65	25,80 \pm 3,86	24,81 \pm 1,35	25,30 \pm 1,38	27,8 \pm 3,81	26,10 \pm 2,76	0,133
Glutathion ($\mu\text{mol/l}$)	1,63 \pm 0,15 ^b	0,66 \pm 0,03 ^c	0,41 \pm 0,04 ^d	2,88 \pm 0,29 ^a	0,68 \pm 0,06 ^c	0,34 \pm 0,03 ^e	0,001
Catalase (U/min/ml)	113,19 \pm 7,96 ^b	99,74 \pm 7,15 ^b	160,66 \pm 9,62 ^a	79,27 \pm 2,74 ^c	90,80 \pm 4,03 ^c	158,02 \pm 2,02 ^a	0,001

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

Tableau A 9: Marqueurs du statut oxydant du plasma chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	0,34 \pm 0,03 ^e	0,78 \pm 0,04 ^d	1,52 \pm 0,19 ^b	0,29 \pm 0,04 ^e	1,28 \pm 0,11 ^c	1,90 \pm 0,17 ^a	0,0001
Protéines carbonylées ($\mu\text{mol/l}$)	0,47 \pm 0,03 ^c	1,15 \pm 0,04 ^b	1,43 \pm 0,06 ^a	0,34 \pm 0,05 ^d	1,17 \pm 0,03 ^b	1,52 \pm 0,13 ^a	0,001
DCI ($\mu\text{mol/l}$)	9,94 \pm 1,31 ^c	16,12 \pm 1,32 ^b	28,54 \pm 3,23 ^a	9,76 \pm 1,88 ^c	17,41 \pm 2,30 ^b	29,44 \pm 2,89 ^a	0,001
Taux d'oxydation Lp	1,31 \pm 0,06 ^c	2,36 \pm 0,18 ^b	3,64 \pm 0,14 ^a	1,25 \pm 0,05 ^c	2,44 \pm 0,14 ^b	3,54 \pm 0,12 ^a	0,001
Mancozebe							
MDA ($\mu\text{mol/l}$)	0,34 \pm 0,03 ^d	0,52 \pm 0,04 ^c	0,67 \pm 0,05 ^b	0,29 \pm 0,04 ^d	0,57 \pm 0,03 ^c	0,78 \pm 0,03 ^a	0,004
Protéines carbonylées ($\mu\text{mol/l}$)	0,47 \pm 0,03 ^d	0,84 \pm 0,03 ^c	2,16 \pm 0,19 ^b	0,34 \pm 0,05 ^e	2,25 \pm 0,13 ^b	2,86 \pm 0,08 ^a	0,002
DIC ($\mu\text{mol/l}$)	9,94 \pm 1,31 ^c	17,22 \pm 2,20 ^b	26,33 \pm 3,28 ^a	9,76 \pm 1,88 ^c	15,14 \pm 2,17 ^b	26,32 \pm 1,45 ^a	0,005
Taux d'oxydation Lp	1,31 \pm 0,06 ^d	2,28 \pm 0,07 ^c	3,08 \pm 0,04 ^b	1,25 \pm 0,05 ^d	2,34 \pm 0,04 ^c	3,58 \pm 0,06 ^a	0,004

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

Tableau A10: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du foie chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
MDA (nmol/g)	2,57±0,25 ^d	4,08±0,26 ^c	9,62±0,47 ^a	2,29±0,37 ^e	6,66±0,30 ^b	10,16±0,65 ^a	0,0001
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,75±0,05 ^e	1,50±0,12 ^c	1,95±0,15 ^b	1,08±0,06 ^d	1,38±0,11 ^c	2,35±0,16 ^a	0,0001
Glutathion (µmol/g)	1,41±0,19 ^b	1,05±0,04 ^c	0,47±0,05 ^d	1,84±0,08 ^a	1,08±0,05 ^c	0,54±0,05 ^d	0,001
Mancozebe							
MDA (nmol/g)	2,57±0,25	2,32±0,27	2,55±0,24	2,29±0,37	2,58±0,29	2,54±0,38	0,255
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,75±0,05 ^d	1,53±0,12 ^b	1,87±0,10 ^a	1,08±0,06 ^c	1,48±0,10 ^b	1,78±0,11 ^a	0,002
Glutathion (µmol/g)	1,41±0,19 ^b	0,68±0,03 ^c	0,42±0,05 ^e	1,84±0,08 ^a	0,72±0,04 ^c	0,57±0,02 ^d	0,001

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

Tableau A 11: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du muscle chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
MDA (nmol/g)	1,06±0,06 ^c	3,29±0,38 ^b	5,77±0,53 ^a	0,62±0,04 ^d	3,68±0,50 ^b	6,20±0,67 ^a	0,001
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,64±0,06 ^f	1,18±0,14 ^d	1,78±0,12 ^b	0,82±0,07 ^e	1,37±0,14 ^c	2,17±0,12 ^a	0,0001
Glutathion (µmol/g)	0,38±0,04	0,34±0,06	0,35±0,05	0,32±0,06	0,31±0,06	0,28±0,05	0,126
Mancozebe							
MDA (nmol/g)	1,06±0,06 ^d	1,47±0,10 ^c	1,92±0,03 ^a	0,62±0,04 ^e	1,56±0,08 ^c	1,81±0,05 ^b	0,004
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,64±0,06 ^f	1,75±0,05 ^d	2,13±0,14 ^b	0,82±0,07 ^e	1,94±0,03 ^c	2,39±0,13 ^a	0,0001
Glutathion (µmol/g)	0,38±0,04 ^a	0,28±0,03 ^b	0,21±0,02 ^c	0,32±0,06 ^a	0,24±0,05 ^b	0,15±0,03 ^d	0,005

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

Tableau A12: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant du tissu adipeux chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
MDA (nmol/g)	0,56±0,04 ^c	1,40±0,14 ^b	2,60±0,16 ^a	0,38±0,04 ^d	1,43±0,10 ^b	2,73±0,10 ^a	0,001
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,27±0,02 ^d	1,15±0,15 ^b	1,40±0,12 ^a	0,25±0,03 ^d	0,69±0,06 ^c	1,37±0,15 ^a	0,001
Glutathion (µmol/g)	0,25±0,03	0,28±0,06	0,30±0,05	0,29±0,04	0,29±0,03	0,31±0,05	0,134
Mancozebe							
MDA (nmol/g)	0,56±0,04 ^b	0,77±0,05 ^a	0,79±0,06 ^a	0,38±0,04 ^c	0,73±0,06 ^a	0,79±0,05 ^a	0,005
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,27±0,02 ^c	1,34±0,25 ^b	1,41±0,14 ^b	0,25±0,03 ^c	1,82±0,11 ^a	1,94±0,13 ^a	0,005
Glutathion (µmol/g)	0,25±0,03	0,24±0,05	0,21±0,04	0,29±0,04	0,25±0,02	0,30±0,05	0,204

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

Tableau A13: Marqueurs du statut oxydant/antioxydant de l'intestin chez les rats témoins et les différents lots de rats consommant la métribuzine et le mancozebe.

Métribuzine	Rats mâles			Rats femelles			P (ANOVA)
	Témoins	D1	D2	Témoins	D1	D2	
MDA (nmol/g)	1,30±0,05 ^c	2,49±0,15 ^b	2,49±0,15 ^b	1,24±0,07 ^c	2,58±0,10 ^b	3,20±0,07 ^a	0,001
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,58±0,06 ^d	1,34±0,16 ^c	1,86±0,17 ^b	0,55±0,04 ^d	1,95±0,10 ^b	2,25±0,13 ^a	0,001
Glutathion (µmol/g)	0,51±0,06	0,47±0,06	0,45±0,05	0,42±0,05	0,46±0,07	0,43±0,04	0,123
Mancozebe							
MDA (nmol/g)	1,30±0,05	1,27±0,10	1,26±0,12	1,24±0,07	1,18±0,06	1,22±0,14	0,155
Protéines carbonylées (nmol/g)	0,58±0,06	0,69±0,06	0,65±0,06	0,55±0,04	0,61±0,06	0,54±0,05	0,216
Glutathion (µmol/g)	0,51±0,06	0,53±0,08	0,56±0,04	0,42±0,05	0,44±0,06	0,40±0,08	0,132

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

ملخص:

المبيدات ، مواد كيميائية سامة تستخدم على نطاق واسع في الزراعة لزيادة غلة المحاصيل. وترتبط هذه الجزيئات مع تطور الاضطرابات الأيضية، السرطانية، مشكلة أعصاب و الخصوبة. البطاطا من الخضروات المستهلكة على نطاق واسع من قبل الجزائريين الملوثة ولا سيما عن طريق المبيدات. أهداف هذا العمل هي دراسة التسممات الناتجة عن بعض المبيدات المستخدمة عادة لمعالجة زراعة البطاطا (منطقة الغرب الجزائري)، metribuzin (مبيدات الأعشاب الضارة) و mancozeb (مبيد الفطريات). في التقرير المجرة من آثار المبيدات في الجرعات المنخفضة وطويلة الأجل (90 يوما) على أيض الدهون والبروتينات، وحالة نشاط الأوكسدة / المضادة للأوكسدة من بعض الانزيمات والمقاطع النسيجية من مختلف الاعضاء لمعرفة الاضطرابات الهيكلية في الفئران الذكور والإناث. أظهرت النتائج أن العلاج بالمبيدات يؤدي الى سقوط وزن الجسم (ALT AST) مما يؤدي إلى انخفاض في كمية الطاقة اليومية، انخفاض الوزن لعضلة الساق ، ارتفاع السكر في الدم، وزيادة اليوريا والكرياتينين والترانساميناسات (malondialdéhydes والدهون. وبالإضافة إلى ذلك، لوحظ تغيير في حالة نشاط الأوكسدة / المضادة للأوكسدة في هذه الفئران أظهرت زيادة مستويات البلازما والأنسجة (CAT)) مخفضة، نشاط الكاتالاز (Glut) وعلامات من أكسدة البروتين الدهني ، مع الحد من الجلوتاثيون (PCAR)، بروتين الكاربونيل (DIC)، الدايبينات مترافق (MDA) الأنسجة. وإلى جانب هذه (lipase) يتناقص مع زيادة النشاط الليباز لCAT الأوكسدة واضحة. النشاط الأنزيمي من الليبيثين الكولسترول أسيل ترانسفيراز (C) وفيتامين التغييرات، مقاطع خلايا الأنسجة اظهرت وجود التهابات التسلل وتعطيل الأنسجة الخلوية. في الجرعات mancozeb و metribuzin ولذلك فمن الضروري لدعم حالات الشذوذ الأيضي وجود الاوكسدة العالية مع تغيرات في عمارة الأنسجة بعد العلاج بالمبيدات،

، البطاطا، والجلوكوز، والدهون، والبروتينات، والبروتينات الدهنية والهيئات والفئران، وحالة الأوكسدة / المضادة mancozeb ، metribuzin كلمات البحث: المبيدات، للأوكسدة. المقاطع الأنسجة.

Résumé

Les pesticides, produits chimiques toxiques, sont très utilisés en agriculture pour l'augmentation des rendements agricoles. Ces molécules sont associées à l'apparition des troubles métaboliques, cancérogènes, neurotoxiques et problème de fertilité. La pomme de terre, légume très consommé par la population Algérienne est particulièrement contaminée par les pesticides. Les objectifs de ce travail sont d'étudier les toxicités de certains pesticides couramment utilisés pour le traitement phytosanitaire de la culture des pommes de terre (région de l'ouest Algérien), la métribuzine (herbicide) et le mancozebe (fongicide). La détermination in vivo des effets des pesticides à faible doses et à long terme (90 jours) sur le métabolisme des lipides et des protéines, le statut oxydant/antioxydant, l'activité de quelques enzymes et l'histologie des différents organes permet de voir les perturbations fonctionnelles et structurales chez les rats wistar mâles et femelles. Les résultats montrent que le traitement aux pesticides induit une chute du poids corporel consécutive à une diminution de l'apport énergétique quotidien, une chute du poids de muscle gastrocnémien, une hyperglycémie, une augmentation du taux d'urée, de la créatinine et des transaminases (ALT, AST) et une hyperlipidémie. De plus, une altération du statut oxydant/antioxydant est notée chez ces rats avec augmentation des teneurs plasmatiques et tissulaires en malondialdéhydes (MDA), diènes conjugués (DIC), protéines carbonylées (PCAR) et réduction du glutathion réduit, des activités de la catalase et de la vitamine C en faveur d'un stress oxydatif évident. L'activité enzymatique de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) est diminuée alors que l'activité lipase tissulaire est augmentée. A coté de ces altérations, l'histologie des différents organes est marquée par la présence d'un infiltrat inflammatoire et une désorganisation de l'architecture tissulaire suite aux pesticides.

Il est donc nécessaire de prendre en charge les anomalies métaboliques, le stress oxydatif élevé et les perturbations de l'architecture tissulaire suite au traitement par les pesticides, mancozebe et métribuzine, à des doses faibles.

Mots clés : pesticides, métribuzine, mancozebe, pomme de terre, glucose, lipides, protéines, lipoprotéines, organes, rat, statut oxydant/antioxydant, coupes histologiques.

Abstract

Pesticides, toxic chemicals are widely used in agriculture to increase crop yields. These molecules are associated with the development of metabolic disorders, carcinogenic, neurotoxic and fertility problem. Potato, vegetable widely consumed by the Algerian population is particularly contaminated by pesticides. The objectives of this work are to study the toxicity of some pesticides commonly used for the treatment of potatoes (region of wester Algeria), metribuzin (herbicide) and mancozeb(fungicide). The in vivo effects of low doses of pesticides for a long-term period (90 days) on lipid and protein metabolisms, oxidant/antioxidant status and histology of various organs were determined to see structural and functional disturbances in male and female wistar rats. The results showed that pesticide treatment induces a fall in body weight induced by a decrease in daily energy intake, in gastrocnemius muscle weight, hyperglycemia, increased levels of urea, creatinine and transaminases (ALT AST) and hyperlipidemia. In addition, alterations of oxidant / antioxidant status were observed in these rats with increased plasma and tissue levels malondialdehydes (MDA), conjugated dienes (DIC), protein carbonyls (PCAR) and reduction in reduced glutathione levels, catalase activity and vitamin C in favor of the presence of oxidative stress. The enzymatic activity of lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) decreased while tissue lipase activity increased. Besides these changes, the histology of different organs was denoted by the presence of an inflammatory infiltrate and disruption of tissue architecture. It is therefore necessary to support the metabolic abnormalities, the oxidative stress and tissue architectural damages following treatment with pesticides, mancozeb and metribuzin at low doses.

Keywords: pesticides, metribuzin, mancozeb, potato, glucose, lipids, proteins, lipoproteins, organs, rat, oxidant / antioxidant status, histology.



Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats

F.Z. Chiali^a, H. Merzouk^{a,*}, S.A. Merzouk^b, A. Medjdoub^a, M. Narce^c

^aLaboratory of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe, University Abou-Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria

^bDepartment of Technical Sciences, Faculty of Engineering, University Abou-Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria

^cINSERM UMR 866, "Lipids Nutrition Cancer", University of Burgundy, Faculty of Sciences, 6 Boulevard Gabriel, Dijon 21000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2012

Accepted 30 March 2013

Available online 8 April 2013

Keywords:

Metabolism

Metribuzin

Organs

Oxidative stress

Rat

ABSTRACT

In this work we evaluated the *in vivo* effects of chronic metribuzin exposure at doses that mimic human exposure through diet. Male and female rats were fed a potato diet containing metribuzin at low doses (D1, 1.3 mg/kg or D2, 13 mg/kg) for 3 months. Plasma biochemical parameters (glucose, lipid, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)), as well as lipid and protein contents, markers of oxidative stress in different organs (liver, adipose tissue, muscle, intestine) were determined.

Our results showed that exposure to metribuzin induced a significant reduction in body weight, food intake and adverse alterations in biochemical parameters such as an increase in plasma glucose, triglyceride, urea, creatinine, ALT and AST levels. Total protein and lipid contents of organs were also altered with a concomitant presence of oxidative stress.

In conclusion, chronic metribuzin exposure is associated to underfeeding and has adverse effects on organ functions leading to physiological impairment even at low concentrations. The nutritional management appears of the first importance.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Metribuzin (4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one) is a herbicide used on vegetable crops to selectively control broadleaf weeds and grassy weed species. Metribuzin is commonly applied to soybeans, potatoes, lentils, peas and tomatoes.

Exposure of the general population to this pesticide may occur through consumption of foods treated with pesticides. The presence of pesticides in food is a great public concern since they may have both acute and chronic effects on health [1,2]. Chronic exposure to pesticides is associated with an increased frequency of neurodegenerative diseases, cancer, endocrine, immunological abnormalities, adverse reproductive and developmental effects [1,3–6]. Several authors have attempted to investigate the mechanism of pesticide toxicity by using animal models.

Different doses have been used to observe the subchronic and the chronic effects of metribuzin in rats. Studies of metribuzin tox-

icity, for instance, have reported effects on body weight, liver enzyme activities and histopathological changes. Wistar rats, exposed to metribuzin through their diet at 37.5 mg/kg for 3-months, exhibited a significant reduction in body weight gain, and increased liver and thyroid weights [7]. Another 2-year feeding study using a higher dose (70 mg/kg) of metribuzin reported histopathological changes in the liver, and adrenal and thyroid glands in males and in female rats [8]. The highest concentrations of metribuzin and/or its metabolites are found in the liver followed by other tissues (fat, muscle, plasma) [9,10].

Evidence indicates that glucuronidation and sulfation do not play a major role in metabolism or excretion. In contrast, conjugation with reduced glutathione (GSH) followed by conversion to mercapturic acid derivatives appears to play a major role in detoxification and excretion [11].

The GSH content of the liver decreased progressively with increasing doses of metribuzin [10]. There is evidence that at very high levels, or in the absence of non-protein sulfhydryls (e.g., glutathione), metribuzin metabolites can bind to proteins. GSH, a sulphhydryl glutathione tripeptide (gamma glutamyl cysteinyl glycine), is an important intracellular antioxidant which plays a central role in the defense against oxidative damage and toxins. Alterations in GSH contents are observed in several pathologies, including, cancer, neurodegenerative disorders and aging [12].

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BSA, bovine serum albumin; MDA, malondialdehyde; NOAELs, dose with no-observed adverse effect levels; LD 50, lethal dose 50; GSH, reduced glutathione; CV, coefficient of variation; TBA, thiobarbituric acid; HPLC, high-performance liquid chromatography; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author.

E-mail address: hafidamerzouk_2@hotmail.com (H. Merzouk).

Oxidative stress, which affect cellular function and modify cell signaling, is considered to play a major role [13,14]. Some studies have shown that herbicides induce oxidative stress in plants [15,16]. We have previously reported that *in vitro* metribuzin exposure induced oxidative stress, reflected by high hydroperoxides (lipid peroxidation marker) and carbonyl proteins (protein oxidation marker) and low GSH levels in human and rat lymphocytes [17].

However, the *in vivo* effects of low doses of metribuzin on the different organs and the molecular mechanism of metribuzin toxicity are still not clear. To the best of our knowledge, there are no reports in the literature of the induction of intracellular oxidative stress in different organs by metribuzin.

The aim of our work was to evaluate *in vivo* the chronic effects of metribuzin at low doses. We tested the hypothesis that low metribuzin doses increase metabolic alterations and oxidative stress in rat tissues. We then tried to examine how low metribuzin residues in food can still have an impact on the health. Potatoes are the most vegetables consumed in Algeria. Furthermore, in order to mimic the consumer's exposure to metribuzin through food, we chose to give rats a potato diet containing metribuzin at low doses (dose with no-observed adverse effect levels (NOAEL) and lethal dose 50 divided by 100 (LD 50/100)) [18]. We examined the *in vivo* effects of chronic exposure through diet (3 months) on serum biochemical parameters (glucose, lipid, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)), as well as lipid and protein contents, markers of oxidative stress in target organs (liver, adipose tissue, muscle, intestine) in male and female rats.

The results of this study should increase our understanding of the long-term effects of low dose of metribuzin and the physiological changes that occur in rats.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of the diet

Potatoes used in this study were provided from untreated parcels by any pesticide located in Tlemcen area (INRAA, ALGERIA). Potatoes were washed, peeled and cut into pieces. They were put in a pot, cover with water and boiled for 10 min. After removing water, potatoes were mashed. Potato puree was prepared every day and was mixed to standard chow (ONAB, Algeria) (w/w) with corn oil (1 ml for 7 g puree and 7 g standard chow) to meet the nutritional requirements for rats. This mixture constituted the control diet (Table 1).

To prepare experimental diets, appropriate concentrations of metribuzin (Metribuzin 98% TECH; CAS No: 21087-64-9; purchased from China Leading Manufacturer and supplier by INRAA, ALGERIA) were dissolved in corn oil (1 ml) and added to 7 g of potato puree according to the rat weight. This puree was mixed to standard chow (w/w). The dose of mitribuzin given daily was adjusted each three days for changes in body weight of rats. Each diet was analyzed for metribuzin concentration using high-performance liquid chromatography (HPLC) to assure that the proper dose of metribuzin was delivered. Control diet was also analyzed to verify the absence of metribuzin.

2.2. Animals and experimental protocol

All aspects of the experiment were conducted according to the guidelines provided by the ethical committee of the experimental animal care at Tlemcen University. Adult Wistar rats were obtained from Animal Resource Centre (Algeria). Female and male rats were housed individually in wood-chip-bedded plastic cages at a constant temperature (25 °C) and humidity (60 ± 5%) with a 12 h

Table 1
Composition of control diet.

Control diet (C)	
<i>Energy sources (g/100 g)</i>	
Protein	14
Carbohydrate	52
Fat	4
Cellulose	5
Vitamins mix	2
Minerals mix	3
Humidity	20
Total polyphenols (mg/100 g)	64
B carotene (mg/100 g)	1
α Tocopherol (mg/100 g)	5
Vitamin C (mg/100 g)	10
Energy content (kcal/100 g)	303
<i>Fatty acid composition (% fatty acids)</i>	
SFA	30
C18:1 n-9	12
C18:2 n-6	45
C18:3 n-3	8
C20:4 n-6	4

SFA: saturated fatty acids. The composition of the diet was analyzed by a private technical laboratory (GETALAB, Tlemcen, ALGERIA). Minor polyunsaturated fatty acids were not presented (<0.5%).

light/dark cycle. The rats had free access to water and were assigned to three dietary groups of equal average body weight. One group (control, $n = 8$ males and 8 females) fed the control diet (without metribuzin). The second and the third groups (D1 and D2, $n = 8$ males and 8 females) were fed the diets containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day (D1, NOAEL) or at 13 mg/kg/day (D2, 1/100 LD 50) for 3 months. The rats received 14 g of each diet every day in the morning at 8H. In the afternoon, after controlling food consumption, control diet was given to all rats (14–30 g) until the next morning. This procedure helped to insure a consistent dosage over the course of the study.

The weight and food consumption of each animal were measured daily.

At the end of the experimental period (3 months) and after overnight fasting, rats were anaesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg of body weight). The blood was drawn from the abdominal aorta into heparinized tubes, and plasma was used for biochemical determinations. After removal of plasma, erythrocytes were washed three times with 2 volumes of isotonic saline. Erythrocytes were lysed with ice-cold distilled water (1/4) and stored at 4 °C for 15 min. The cell debris was removed by centrifugation (2000g for 15 min). Erythrocyte lysates were assayed for antioxidant catalase activity and glutathione contents. Tissues (liver, gastrocnemius muscle, perirenal adipose tissue, intestine) were collected, and immediately placed on dry ice. An aliquot of each tissue was homogenized in an Ultraturax homogenizer (Bioblock Scientific) for lipid extraction. A second aliquot of tissues was homogenized in 10 volumes of ice-cold 10 mmol/l phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 1.15% KCL. The homogenate was subjected to a 6000g centrifugation at 4 °C for 15 min. The supernatant fractions were collected and used for biochemical and redox marker determinations.

2.3. Chemical analysis

Plasma glucose was measured using the Trinder glucose kit (Sigma). Plasma triglyceride and cholesterol were measured using colorimetric enzymatic kits (Roche Diagnostics). For these enzymatic methods, the interassay CV (coefficient of variance) was in the range of 1.7–3%. Plasma creatinine and urea were measured using enzymatic colorimetric methods (Kits from BioAssay Sys-

tems, CA), with an interassay CV of 1.3–2.5%. Plasma aspartate aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2) activities were determined by the colorimetric method using Randox Diagnostic kits (Randox Laboratories Ltd, Co Antrim, UK), with an interassay CV of 2.8%. Liver, muscle, intestine and fat tissue lipid levels were measured using the method of Folch et al. [19]. Protein contents of plasma and tissue homogenates were determined by the method of Lowry et al. [20], with BSA as the standard.

Plasma vitamin C levels were determined using dinitrophenylhydrazine, thiourea and copper sulfate according to the method of Roe and Kuether [21], with an interassay CV of 3.4%. Erythrocyte catalase (EC 1.11.1.6) activity was measured by spectrophotometric analysis of the rate of H₂O₂ decomposition at 240 nm [22], with an interassay CV of 4%. Erythrocyte reduced glutathione (GSH) was determined using 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB or Ellman reagent) with an interassay CV of 3.6% [23].

2.4. Determination of tissue oxidant/antioxidant status

The tissue malondialdehyde (MDA) levels, a marker of lipid peroxidation, were determined in tissue supernatants by the method of Draper and Hadley [24] using thiobarbituric acid (TBA), with an interassay CV of 5%. Carbonyl proteins (markers of protein oxidation) were assayed by the 2,4-dinitrophenyl hydrazine reaction as described previously [25], with an interassay CV of 4.5%. Tissue GSH contents were determined using Ellman reagent.

2.5. Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard deviation (SD). The results were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. Data not normally distributed were logarithmically transformed. Significant differences among the groups were analyzed statistically by a one-way analysis of variance (ANOVA). When significant changes were observed in ANOVA tests, Fisher least significant difference tests were applied to locate the source of significant difference. Significant differences between males and females in the same group were assessed using a Student's *t* test. The significance level was set at $P < 0.05$. These calculations were performed using STATISTICA version 4.1 (STATSOFT, Tulsa, OK).

3. Results

3.1. Body weight, weight gain and energy intake in control and experimental rats

Throughout the 90 day experimental period no abnormalities or death was reported in any of the experimental group or the control. Wistar rats, exposed to metribuzin through their diet at 1.30 mg/kg for 3-months (D1 rats), both males and females, showed a significant reduction in body weight and in weight gain compared to control rats (Table 2). This was due to a significant decrease in food and energy intakes in both sexes. Rats fed the diet containing higher level of metribuzin (13 mg/kg for 3-months; D2 rats), both males and females, showed also decreased body weight, weight gain, food and energy intakes compared to controls. Additionally, the lowest values were apparent in D2 groups. Water intake was similar for all groups.

Female rats were significantly smaller than male rats, in each group. The weight gain, the food and energy intakes were significantly less in females compared with males, in either control or treated rats.

3.2. Plasma biochemical parameters in control and experimental rats

The administration of metribuzin resulted in the increase in plasma glucose, triglyceride, urea and creatinine levels, in both male and female rats, with the highest effective concentration being 13 mg/kg (D2) (Table 3).

No significant change was observed in plasma cholesterol levels of animals after exposure to D1 metribuzin. However, the administration of D2 metribuzin induced a significant reduction in plasma cholesterol concentrations in both sexes compared to control values.

Plasma AST and ALT activities were sensitive to the effects of metribuzin which resulted in a significant increase in AST and ALT activities and the effect was more pronounced with D2 (Table 3).

There were no sex significant differences in plasma cholesterol, total proteins, creatinine and ALT in each group. Females showed lower glucose and AST levels than in males in control group. In treated rats, females had lower glucose, triglycerides and higher urea levels than in males.

3.3. Tissue total lipid and protein contents in control and experimental rats

D1 and D2 metribuzin exposure caused a significant elevation in liver and muscle total lipid contents, the pronounced effect being with D2 in both male and female rats (Table 4). Intestine lipids were increased only after D2 metribuzin exposure; D1 did not alter these contents. However, metribuzin exposure induced a significant reduction in adipose tissue lipid contents in both male and female rats.

Liver, muscle and adipose tissue protein contents were significantly decreased after metribuzin treatment in both male and female rats (Table 4). However, intestine protein contents remained unchanged by metribuzin exposure in rats.

Females had significantly greater muscle lipids than did males in control group. In D2 treated rats, liver lipids were increased in females compared to males. Muscle total protein levels were reduced in females compared to males in each group.

3.4. Plasma and erythrocyte antioxidant status in control and experimental rats

There were significant alterations in plasma and erythrocyte antioxidant status in rats exposed to metribuzin in comparison to controls as indicated by a significant decrease of plasma vitamin C, erythrocyte GSH levels and erythrocyte catalase activity in both sexes, the highest effective concentration being D2 metribuzin (Fig. 1).

In control group, females had greater GSH amounts and lower catalase activity compared to male values. In D1 group, females had also lower catalase activity than males.

3.5. Organ oxidant/antioxidant status in control and experimental rats

Liver MDA and carbonyl protein levels were significantly increased while liver GSH contents were decreased in male and female rats after metribuzin exposure, the effect was more pronounced with D2 (Fig. 2).

In muscle, adipose tissue and intestine, a significant increase in MDA and carbonyl protein levels was induced by metribuzin treatment. However, GSH contents of these organs were not significantly different between control and treated rats (Fig. 2).

In control group, females showed less muscle and adipose tissue MDA levels than in males. In treated rats, females had higher

Table 2

Body weight, weight gain and energy intake in control and experimental rats.

	Male rats				Female rats			
	Controls	D1	D2	P (ANOVA)	Controls	D1	D2	P (ANOVA)
Initial body weight (g)	275 ± 30	255 ± 22	225 ± 20	0.102	210 ± 15*	208 ± 12*	183 ± 17*	0.113
Final body weight (g)	421 ± 27.39 ^a	343 ± 16.92 ^b	285 ± 14.9 ^c	0.001	303 ± 12.98 ^{a,*}	273.66 ± 8.62 ^{b,*}	228.66 ± 1 ^{c,*}	0.001
Weight gain (g)	139 ± 13.69 ^a	85.66 ± 4.10 ^b	60.66 ± 3.66 ^c	0.001	95.66 ± 5.58 ^{a,*}	68.33 ± 3.80 ^{b,*}	46.33 ± 4.62 ^{c,*}	0.003
Food intake (g/d/rat)	43.99 ± 1.94 ^a	33.25 ± 1.15 ^b	26.34 ± 1.62 ^c	0.004	30.80 ± 1 ^{a,*}	25.05 ± 1.60 ^{b,*}	20.84 ± 1.06 ^{c,*}	0.006
Energy intake (kcal/day/rat)	132 ± 7.20 ^a	99.97 ± 2.85 ^b	79.06 ± 3.51 ^c	0.005	92.43 ± 2.36 ^{a,*}	75.15 ± 2.9 ^{b,*}	62.46 ± 1.08 ^{c,*}	0.008
Water intake (ml/day/rat)	80 ± 8.50	76.30 ± 8	70.45 ± 7.50	0.123	70.33 ± 10	72 ± 8.46	68.31 ± 8.50	0.151

Values are presented as means ± SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

Table 3

Plasma biochemical parameters in control and experimental rats.

	Male rats				Female rats			
	Controls	D1	D2	P (ANOVA)	Controls	D1	D2	P (ANOVA)
Glucose (g/L)	1.14 ± 0.05 ^c	2.41 ± 0.14 ^b	2.86 ± 0.12 ^a	0.001	0.98 ± 0.06 ^{c,*}	2.37 ± 0.16 ^b	2.67 ± 0.12 ^{a,*}	0.001
Triglyceride (g/L)	0.76 ± 0.03 ^c	1.34 ± 0.04 ^b	1.50 ± 0.07 ^a	0.001	0.70 ± 0.04 ^b	0.75 ± 0.05 ^{b,*}	0.90 ± 0.06 ^{a,*}	0.01
Cholesterol (g/L)	1.27 ± 0.15 ^a	1.16 ± 0.13 ^a	0.88 ± 0.06 ^b	0.01	1.33 ± 0.22 ^a	1.13 ± 0.18 ^a	0.92 ± 0.07 ^b	0.01
Total proteins (g/L)	64.55 ± 3.11	65.03 ± 3.64	62.25 ± 2.12	0.251	62.55 ± 4.03	62.83 ± 3.76	63.44 ± 4.08	0.238
Urea (g/L)	0.23 ± 0.03 ^c	0.50 ± 0.04 ^b	0.65 ± 0.03 ^a	0.01	0.25 ± 0.04 ^c	0.52 ± 0.04 ^b	0.75 ± 0.06 ^{a,*}	0.01
Creatinine (g/L)	10.23 ± 1.12 ^c	17.03 ± 1.33 ^b	28.21 ± 1.42 ^a	0.01	10.27 ± 1.31 ^c	18.44 ± 1.26 ^b	27.04 ± 1.55 ^a	0.01
ALT (IU/L)	28 ± 1.23 ^c	30.24 ± 1.68 ^b	46.12 ± 2.26 ^a	0.01	26.36 ± 2.15 ^c	32.22 ± 2.42 ^b	44.12 ± 1.88 ^a	0.01
AST (IU/L)	34.53 ± 1.35 ^b	35.28 ± 2.03 ^b	57.38 ± 2.02 ^a	0.03	32.82 ± 1.38 ^{c,*}	36.14 ± 2.08 ^b	61.02 ± 2.19 ^a	0.01

Values are presented as means ± SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day; D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

Table 4

Tissue total lipid and protein contents in control and experimental rats.

	Male rats				Female rats			
	Controls	D1	D2	P (ANOVA)	Controls	D1	D2	P (ANOVA)
<i>Total lipids (mg/g)</i>								
Liver	122.40 ± 14.17 ^b	139.80 ± 11 ^b	177.40 ± 23 ^a	0.02	117.20 ± 16 ^b	123.82 ± 17 ^b	255 ± 40 ^{a,*}	0.01
Muscle	58.40 ± 6.19 ^c	128 ± 15.10 ^b	174 ± 17.47 ^a	0.004	75.8 ± 8.96 ^{c,*}	130.8 ± 13 ^b	156 ± 17 ^a	0.005
Adipose tissue	233 ± 23.57 ^a	208 ± 20.35 ^b	159 ± 12.59 ^c	0.001	230 ± 26.6 ^a	185.8 ± 17 ^b	134 ± 21 ^c	0.001
Intestine	66.72 ± 5.69 ^b	62.8 ± 7.40 ^b	130 ± 6.15 ^a	0.01	67.8 ± 3.85 ^b	63.2 ± 6.54 ^b	129 ± 9.4 ^a	0.01
<i>Total proteins (mg/g)</i>								
Liver	157.55 ± 17.60 ^a	124.80 ± 18 ^b	103 ± 10 ^c	0.001	145 ± 14.84 ^a	116.56 ± 10 ^b	95.61 ± 11 ^c	0.001
Muscle	98.2 ± 7.46 ^a	77 ± 5.82 ^b	54.22 ± 3 ^c	0.002	73.24 ± 5.74 ^{a,*}	54.62 ± 4.63 ^{b,*}	46.83 ± 3.5 ^{c,*}	0.004
Adipose tissue	19.53 ± 5.64 ^a	14.6 ± 4.80 ^b	8.2 ± 2.35 ^c	0.003	16.68 ± 3.23 ^a	10.6 ± 3 ^b	7.21 ± 1.64 ^c	0.005
Intestine	52.82 ± 4.30	47.6 ± 5.66	46.01 ± 4.50	0.176	43.8 ± 4.62	46.98 ± 5.3	41.7 ± 5.3	0.159

Values are presented as means ± SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

liver and intestine MDA and carbonyl proteins but lower adipose carbonyl proteins than males.

4. Discussion

Human pesticide exposure was strongly associated with increased incidence of many diseases and physiological impairments. Metribuzin, a widely used herbicide, is considered as not very toxic to mammals [10]. Although the effects of chronic exposure to atrazine, another s-triazine herbicide, have been well documented, there is a dearth of data on the chronic exposure to metribuzin at environmentally realistic concentrations. In fact, no report is available about the metabolic and physiologic effects of low doses of metribuzin. Therefore, we examined the chronic effects of low doses of metribuzin (NOEL, LD 50/100) on metabolic parameters including oxidative stress markers in the rat.

The administration of metribuzin resulted in the loss of body weight. The reduction in body weight was pronounced in animals

treated with D2 (13 mg/kg) compared to D1 (1.3 mg/kg) in both male and female rats. The decrease in the body weight following metribuzin administration was in accordance with reports on pesticides exposure [26–28]. In our study, the decrease in the body weight after metribuzin administration was due to reduced diet intake.

The administration of metribuzin at low doses induced several metabolic changes. Biochemical investigations like plasma urea and creatinine are used to assess renal functions. Metribuzin exposure through the diet resulted in the increase in plasma urea and creatinine in both male and female rats, suggesting renal failure. Similar findings have also been recorded by other pesticides [29,30]. On the other hand, urea is synthesized by hepatocytes from ammonia generated by amino acid catabolism from protein digestion in the intestines or from endogenous tissue proteins. The rate of urea production is dependent on endogenous protein catabolism since organ protein contents (liver, muscle and adipose tissue) were decreased in metribuzin treated rats compared to

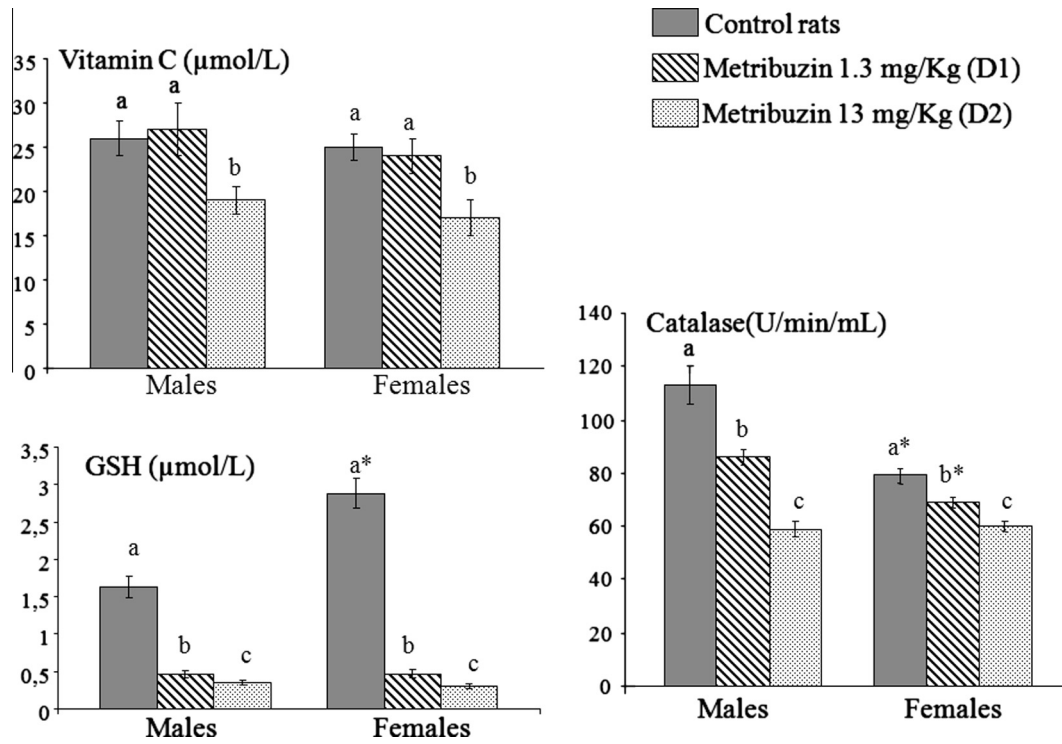


Fig. 1. Plasma and erythrocyte antioxidant status in control and experimental rats. Values are presented as means \pm SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

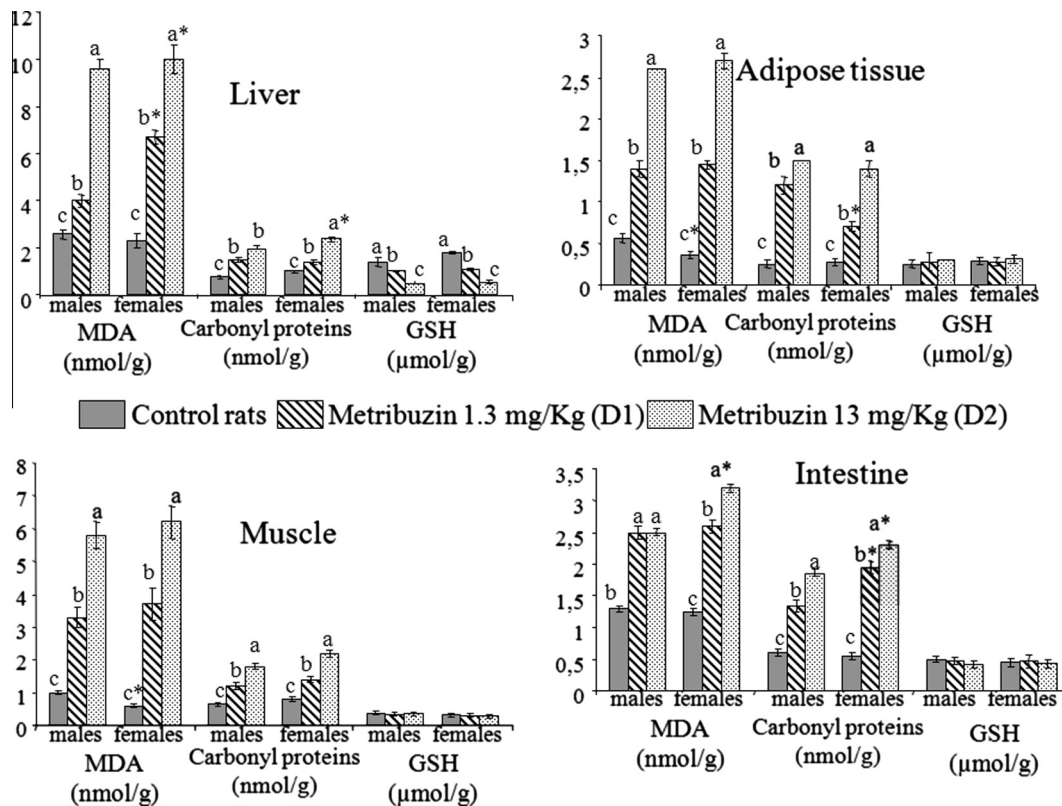


Fig. 2. Liver, muscle, intestine and adipose tissue oxidant/antioxidant status in control and experimental rats. Values are presented as means \pm SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

controls. Increased protein catabolism was previously reported after pesticide exposure [31]. These findings are comparable to those obtained in food restriction which induced a protein catabolic state [32].

Our results showed that metribuzin treatment increase the plasma enzyme activities (ALT, AST). The transaminase enzymes are considered as indicator for tissue damage that is explained by the degree of exposure and the severity of toxic symptoms. The significant increase in AST and ALT activities in treated rats may be explained by destructive changes in hepatic cells induced by metribuzin. This caused permeability alterations and leakage of lysosomal enzymes and enhanced release of enzymes. These results have confirmed those recorded by many authors working on different pesticides at high doses [27,28,33]. However, the transaminase enzymes are also found in other organs such as heart, muscle, kidney ... In our study, AST and ALT release might be elevated also in other organ injury.

Plasma glucose levels were increased in both male and female rats fed metribuzin treated diets. This finding could result from increased hepatic glycogen catabolism, as showed for other pesticides [34,35]. This metabolic change is similar to that observed in chronic undernutrition [32]. It is possible that increased plasma glucose levels in treated rats may be due to reduced glucose utilization and impaired tissue function.

Our data showed a significant increase in plasma triglyceride levels in rats treated with D1 and D2 doses of metribuzin compared to control rats. This abnormality could be a result of overproduction and/or decreased catabolism, as reported previously for other pesticides [36]. An increase in liver lipid levels with a concomitant decrease in adipose tissue lipids was observed in rats exposed to metribuzin. These findings suggested increased flux of plasma fatty acids from the mobilization of adipose tissue fat. This resulted in overproduction and secretion of plasma triglyceride rich lipoproteins by the liver. Despite this, metribuzin induced fatty liver in rats, as shown by other pesticides [35,37]. However, metribuzin exposed rats displayed decreased plasma levels of cholesterol. This might result from a reduction in cholesterol synthesis, or from decreased food intake or from tissue accumulation of cholesterol. Plasma cholesterol levels were considered as valuable indicator of drug-induced disruption of lipid metabolism. Previous studies show increased synthesis and accumulation of cholesterol in the liver, kidney and testis and impaired biliary function [35,38]. In our study, increased total lipid contents of liver, intestine and muscle were induced by metribuzin in both male and female rats. The accumulation of cholesterol in the liver might be due to inhibition of enzymes involved in cholesterol break up resulting into cholesterol deposition in the cell [35].

Our results showed that metribuzin exposure resulted in increased oxidative stress and altered antioxidant status in both male and female rats. Undernutrition is also associated with increased oxidative stress [39]. The decrease in vitamin C and GSH levels and in catalase activity might be due to their increased utilization in response to oxidative stress in treated rats. Alla et al. [40] observed a decrease in the formation of proteins in plants treated with metribuzin. The effect of metribuzin on protein synthesis could also exist in rats and could be responsible for a decrease in catalase activity. The increased lipid MDA and protein carbonyl contents observed after metribuzin exposure indicated an increased oxidative stress in metribuzin-induced organ toxicity. Exposure of experimental animals to pesticides is known to induce lipid peroxidation in various tissues, which is responsible for the adverse biological effects [26–28].

MDA is the main oxidation product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. It represents an important index of lipid peroxidation. Administration of metribuzin significantly increased liver, intestine, muscle and adipose tissue MDA levels in rats. The effect

was more pronounced with the highest dose, in agreement with previous studies [27,28].

GSH is not an enzymatic scavenger of free radicals. It acts as a substrate or cofactor for glutathione-dependent enzyme reactions. GSH also acts as a reactant in conjunction with electrophilic substances. Thus, a change in GSH levels may be an important indicator of the detoxification ability of an organism [41]. Its depletion can result in cell degeneration due to oxidative stress caused by pollutants [42]. Results of our experiments showed that GSH content in the liver of the metribuzin administered rats were significantly decreased as compared to control group. This indicated pro-oxidant conditions in the liver, as previously reported for other pesticides [11,27,28]. The reduced levels of GSH in treated rats could be the result of increased utilization of GSH for conjugation and/or its participation as an antioxidant against free radicals induced by metribuzin toxicity. The liver is major site for detoxification of these compounds.

In the present study, we observed that several of the parameters measured had significant gender differences. Compared with male control rats, oxidative stress was decreased in control females. This may be attributed to a decrease in body weight and food intake, a decrease in plasma glucose levels, and an increase in GSH levels and estrogen protection as previously reported [43]. However, in treated rats, oxidative stress is enhanced in females which showed high organ MDA and carbonyl protein levels and low catalase activity compared with males. It is possible that increased oxidative stress in treated females may be due to the lack of gender protection.

In summary, our results showed that chronic metribuzin exposure at low doses is associated to underfeeding and has adverse effects on organ functions leading to physiological impairments. In addition, metribuzin exposure resulted in increased oxidative stress and altered antioxidant status in different organs. In the light of these observations, it is recommended that metribuzin should be used with caution. It causes detrimental effects even at low doses. The nutritional management now appears of the first importance. Nutritional supplementation in pesticide exposure could improve nutritional status. However, more data are needed in order to assess its effect on metabolic changes induced by herbicides.

Acknowledgments

This work was supported by the French Foreign Office [International Research Extension Grant TASSILI 08MDU723]; and by the Algerian Research Project (PNR, 2011).

The authors thank INRAA (Sidi Bel Abbes, Algeria) for providing pesticides (Metribuzin) and potatoes used in this study.

References

- [1] M.C. Alavanja, J.A. Hoppin, F. Kamel, Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity, *Annu. Rev. Public Health* 25 (2004) 155–197.
- [2] K.L. Bassil, C. Vakil, M. Sanborn, D.C. Cole, J.S. Kaur, K.J. Kerr, Cancer health effects of pesticides: systematic review, *Can. Fam. Physician* 53 (2007) 1704–1711.
- [3] E. Corsini, I. Codecà, S. Mangiaratti, S. Birindelli, C. Minoia, R. Turci, B. Viviani, A. Facchi, N. Vitelli, L. Lucchi, C.L. Galli, M. Marinovich, C. Colosio, Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: *in vivo* and *in vitro* exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222 (2007) 202–210.
- [4] L.A. McCauley, W.K. Anger, M. Keifer, R. Langley, M.G. Robson, D. Rohlman, Studying health outcomes in farm worker populations exposed to pesticides, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 953–960.
- [5] P.J. Mink, H.O. Adami, D. Trichopoulos, N.L. Britton, J.S. Mandel, Pesticides and prostate cancer: a review of epidemiologic studies with specific agricultural exposure information, *Eur. J. Cancer Prev.* 17 (2008) 97–110.
- [6] G. Van Maele-Fabry, S. Duhayon, C. Mertens, D. Lison, Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: a review and meta-analysis of cohort studies, *Environ. Res.* 106 (2008) 121–137.

- [7] E. Loser, G. Kimmerle, Acute and subchronic toxicity of Sencor active ingredient, *Pflanzenschutz-Nachr.* 25 (1972) 186–188.
- [8] W.R. Christenson, B.S. Wahle, Technical grade metribuzin (Sencor®): a combined chronic toxicity/oncogenicity feeding toxicity study in the rat, Unpublished report to EPA by Miles Inc., 1993, MRID 42672501.
- [9] A.G. Bayer, [5-14C]Metribuzin (¹⁴C) study of metabolites in the organs of rats, Bayer AG institute of pharmacokinetics, *Pharmacol. Rep.* (1981) 10142.
- [10] M.S. Bleeke, M.T. Smith, J.E. Casida, Metabolism and toxicity of metribuzin in mouse liver, *Pestic. Biochem. Physiol.* 23 (1985) 123–130.
- [11] W. Aouacheri, S. Saka, R. Djafer, The toxic effect of an insecticide (alphamethrin) on the activity of detoxifying glutathione enzymatic system, *Ann. Toxicol. Anal.* 21 (2009) 125–129.
- [12] D.M. Townsend, K.D. Tew, H. Tapiero, The importance of glutathione in human disease, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 145–155.
- [13] N. Lédircac, S. Antherieu, A.D. d'Uby, J.C. Caron, R. Rahmani, Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species, *Toxicol. Sci.* 86 (2005) 444–452.
- [14] D.A. Drechsel, M. Patel, Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease, *Free Radical Biol. Med.* 44 (2008) 1873–1886.
- [15] R. Rajabi, R.A. Khavari-Nejad, F. Ghanati, F. Najafi, Effects of stress induced by post-emergence application of metribuzin herbicide on wheat, *Afr. J. Biotechnol.* 11 (2012) 3773–3778.
- [16] M.M. Nemat Alla, A.M. Hassan, Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments, *Plant Physiol. Biochem.* 44 (2006) 202–210.
- [17] A. Medjdoub, S.A. Merzouk, H. Merzouk, F.Z. Chiali, M. Narce, Effects of Mancozeb and Metribuzin on *in vitro* proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens, *Pestic. Biochem. Physiol.* 101 (2011) 27–33.
- [18] EFSA Scientific Report, Conclusion regarding the peer reviews of the pesticide risk assessment of the active substance metribuzin, *EFSA J.* 88 (2006) 1–74.
- [19] J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 1861–1869.
- [20] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [21] J.H. Roe, C.A. Kuether, The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of dehydroascorbic acid, *J. Biol. Chem.* 147 (1943) 399–407.
- [22] H. Aebi, Catalase, *Methods of enzymatic analysis*, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), second ed., vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp. 673–684.
- [23] G. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [24] H. Draper, M. Hadley, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 421–431.
- [25] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [26] Y. Sharma, S. Bashir, M. Irshad, T.C. Nag, T.D. Dogra, Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure, *Toxicology* 215 (2005) 173–181.
- [27] J.S. Bhatti, I.P.S. Sidhu, G.K. Bhatti, Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes, *Mol. Cell. Biochem.* 353 (2011) 139–149.
- [28] M. Singh, R. Sandhir, R. Kiran, Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E, *Exp. Toxicol. Pathol.* 63 (2011) 269–276.
- [29] N. Benjamin, A. Kush wah, R.K. Sharma, A.K. Katiyar, Histopathological changes in liver kidney and muscle of pesticides exposed malnourished and diabetic rats, *Ind. J. Exp. Biol.* 44 (2006) 228–232.
- [30] M.M. Salem, Toxic effects of mancozeb containing formulations and neem pesticides on kidney function and ultrastructure of albino rats, *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* 3 (2011) 17–30.
- [31] R.L. Ksheerasagar, M.B. Hiremath, B.B. Kaliwal, Impairment of hepatic biochemical contents and enzymes activities during carbosulfan intoxication in albino mice, *Int. Multidisc. Res. J.* 3 (2011) 6–15.
- [32] P.W. Emery, Metabolic changes in malnutrition, *Eye* 19 (2005) 1029–1034.
- [33] N. Choudhary, M. Sharma, P. Verma, S.C. Joshi, Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan, *J. Environ. Biol.* 24 (2003) 305–308.
- [34] J.A.R. Kumar, P.S. Rajini, Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis, *Toxicology* 257 (2009) 40–45.
- [35] R.L. Ksheerasagar, B.B. Kaliwal, Histological and biochemical changes in the liver of albino mice on exposure to insecticide, carbosulfan, *Caspian J. Env. Sci.* 4 (2006) 67–70.
- [36] K. Begum, P.S. Rajini, Monocrotophos augments the early alterations in lipid profile and organ toxicity associated with experimental diabetes in rats, *Pestic. Biochem. Physiol.* 99 (2011) 33–38.
- [37] Y. Nakagawa, K. Tayama, Acute hepatotoxic potential of imazalil fungicide in rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (1997) 402–407.
- [38] M.K.J. Siddiqui, F. Anjum, M. Mahboob, M. Mustafa, Effects of dimethoate on hepatic cytochrome P-450 and glutathione S-transferase activity in pigeon and rat, *Indian J. Exp. Biol.* 29 (1991) 1071–1073.
- [39] F.F. Akinola, O.O. Oguntibeju, O.O. Alabi, Effects of severe malnutrition on oxidative stress in Wistar rats, *Sci. Res. Essays* 5 (2010) 1145–1149.
- [40] M.M. Alla, A.M. Badawi, N.M. Hassan, Z.M. El-bataswisy, E.G. Badran, Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings, *Pestic. Biochem. Physiol.* 90 (2008) 8–18.
- [41] C.C.C. Cheung, G.J. Zheng, A.M.Y. Li, B.J. Richardson, P.K.S. Lam, Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, *Aquat. Toxicol.* 52 (2001) 189–203.
- [42] X. Zhang, F. Yang, X. Zhang, Y. Xu, T. Liao, S. Song, H. Wang, Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rareminnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD), *Aquat. Toxicol.* 86 (2008) 4–11.
- [43] A.A. Miller, T.M. De Silva, K.A. Jackman, C.G. Sobey, Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 (2007) 1037–1043.



Chronic low level metribuzin exposure induces metabolic alterations in rats

F.Z. Chiali^a, H. Merzouk^{a,*}, S.A. Merzouk^b, A. Medjdoub^a, M. Narce^c

^aLaboratory of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe, University Abou-Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria

^bDepartment of Technical Sciences, Faculty of Engineering, University Abou-Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria

^cINSERM UMR 866, "Lipids Nutrition Cancer", University of Burgundy, Faculty of Sciences, 6 Boulevard Gabriel, Dijon 21000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2012

Accepted 30 March 2013

Available online 8 April 2013

Keywords:

Metabolism

Metribuzin

Organs

Oxidative stress

Rat

ABSTRACT

In this work we evaluated the *in vivo* effects of chronic metribuzin exposure at doses that mimic human exposure through diet. Male and female rats were fed a potato diet containing metribuzin at low doses (D1, 1.3 mg/kg or D2, 13 mg/kg) for 3 months. Plasma biochemical parameters (glucose, lipid, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)), as well as lipid and protein contents, markers of oxidative stress in different organs (liver, adipose tissue, muscle, intestine) were determined.

Our results showed that exposure to metribuzin induced a significant reduction in body weight, food intake and adverse alterations in biochemical parameters such as an increase in plasma glucose, triglyceride, urea, creatinine, ALT and AST levels. Total protein and lipid contents of organs were also altered with a concomitant presence of oxidative stress.

In conclusion, chronic metribuzin exposure is associated to underfeeding and has adverse effects on organ functions leading to physiological impairment even at low concentrations. The nutritional management appears of the first importance.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Metribuzin (4-amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one) is a herbicide used on vegetable crops to selectively control broadleaf weeds and grassy weed species. Metribuzin is commonly applied to soybeans, potatoes, lentils, peas and tomatoes.

Exposure of the general population to this pesticide may occur through consumption of foods treated with pesticides. The presence of pesticides in food is a great public concern since they may have both acute and chronic effects on health [1,2]. Chronic exposure to pesticides is associated with an increased frequency of neurodegenerative diseases, cancer, endocrine, immunological abnormalities, adverse reproductive and developmental effects [1,3–6]. Several authors have attempted to investigate the mechanism of pesticide toxicity by using animal models.

Different doses have been used to observe the subchronic and the chronic effects of metribuzin in rats. Studies of metribuzin tox-

icity, for instance, have reported effects on body weight, liver enzyme activities and histopathological changes. Wistar rats, exposed to metribuzin through their diet at 37.5 mg/kg for 3-months, exhibited a significant reduction in body weight gain, and increased liver and thyroid weights [7]. Another 2-year feeding study using a higher dose (70 mg/kg) of metribuzin reported histopathological changes in the liver, and adrenal and thyroid glands in males and in female rats [8]. The highest concentrations of metribuzin and/or its metabolites are found in the liver followed by other tissues (fat, muscle, plasma) [9,10].

Evidence indicates that glucuronidation and sulfation do not play a major role in metabolism or excretion. In contrast, conjugation with reduced glutathione (GSH) followed by conversion to mercapturic acid derivatives appears to play a major role in detoxification and excretion [11].

The GSH content of the liver decreased progressively with increasing doses of metribuzin [10]. There is evidence that at very high levels, or in the absence of non-protein sulfhydryls (e.g., glutathione), metribuzin metabolites can bind to proteins. GSH, a sulphhydryl glutathione tripeptide (gamma glutamyl cysteinyl glycine), is an important intracellular antioxidant which plays a central role in the defense against oxidative damage and toxins. Alterations in GSH contents are observed in several pathologies, including, cancer, neurodegenerative disorders and aging [12].

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BSA, bovine serum albumin; MDA, malondialdehyde; NOAELs, dose with no-observed adverse effect levels; LD 50, lethal dose 50; GSH, reduced glutathione; CV, coefficient of variation; TBA, thiobarbituric acid; HPLC, high-performance liquid chromatography; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author.

E-mail address: hafidamerzouk_2@hotmail.com (H. Merzouk).

Oxidative stress, which affect cellular function and modify cell signaling, is considered to play a major role [13,14]. Some studies have shown that herbicides induce oxidative stress in plants [15,16]. We have previously reported that *in vitro* metribuzin exposure induced oxidative stress, reflected by high hydroperoxides (lipid peroxidation marker) and carbonyl proteins (protein oxidation marker) and low GSH levels in human and rat lymphocytes [17].

However, the *in vivo* effects of low doses of metribuzin on the different organs and the molecular mechanism of metribuzin toxicity are still not clear. To the best of our knowledge, there are no reports in the literature of the induction of intracellular oxidative stress in different organs by metribuzin.

The aim of our work was to evaluate *in vivo* the chronic effects of metribuzin at low doses. We tested the hypothesis that low metribuzin doses increase metabolic alterations and oxidative stress in rat tissues. We then tried to examine how low metribuzin residues in food can still have an impact on the health. Potatoes are the most vegetables consumed in Algeria. Furthermore, in order to mimic the consumer's exposure to metribuzin through food, we chose to give rats a potato diet containing metribuzin at low doses (dose with no-observed adverse effect levels (NOAEL) and lethal dose 50 divided by 100 (LD 50/100)) [18]. We examined the *in vivo* effects of chronic exposure through diet (3 months) on serum biochemical parameters (glucose, lipid, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)), as well as lipid and protein contents, markers of oxidative stress in target organs (liver, adipose tissue, muscle, intestine) in male and female rats.

The results of this study should increase our understanding of the long-term effects of low dose of metribuzin and the physiological changes that occur in rats.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of the diet

Potatoes used in this study were provided from untreated parcels by any pesticide located in Tlemcen area (INRAA, ALGERIA). Potatoes were washed, peeled and cut into pieces. They were put in a pot, cover with water and boiled for 10 min. After removing water, potatoes were mashed. Potato puree was prepared every day and was mixed to standard chow (ONAB, Algeria) (w/w) with corn oil (1 ml for 7 g puree and 7 g standard chow) to meet the nutritional requirements for rats. This mixture constituted the control diet (Table 1).

To prepare experimental diets, appropriate concentrations of metribuzin (Metribuzin 98% TECH; CAS No: 21087-64-9; purchased from China Leading Manufacturer and supplier by INRAA, ALGERIA) were dissolved in corn oil (1 ml) and added to 7 g of potato puree according to the rat weight. This puree was mixed to standard chow (w/w). The dose of mitribuzin given daily was adjusted each three days for changes in body weight of rats. Each diet was analyzed for metribuzin concentration using high-performance liquid chromatography (HPLC) to assure that the proper dose of metribuzin was delivered. Control diet was also analyzed to verify the absence of metribuzin.

2.2. Animals and experimental protocol

All aspects of the experiment were conducted according to the guidelines provided by the ethical committee of the experimental animal care at Tlemcen University. Adult Wistar rats were obtained from Animal Resource Centre (Algeria). Female and male rats were housed individually in wood-chip-bedded plastic cages at a constant temperature (25 °C) and humidity (60 ± 5%) with a 12 h

Table 1
Composition of control diet.

	Control diet (C)
<i>Energy sources (g/100 g)</i>	
Protein	14
Carbohydrate	52
Fat	4
Cellulose	5
Vitamins mix	2
Minerals mix	3
Humidity	20
Total polyphenols (mg/100 g)	64
B carotene (mg/100 g)	1
α Tocopherol (mg/100 g)	5
Vitamin C (mg/100 g)	10
Energy content (kcal/100 g)	303
<i>Fatty acid composition (% fatty acids)</i>	
SFA	30
C18:1 n-9	12
C18:2 n-6	45
C18:3 n-3	8
C20:4 n-6	4

SFA: saturated fatty acids. The composition of the diet was analyzed by a private technical laboratory (GETALAB, Tlemcen, ALGERIA). Minor polyunsaturated fatty acids were not presented (<0.5%).

light/dark cycle. The rats had free access to water and were assigned to three dietary groups of equal average body weight. One group (control, $n = 8$ males and 8 females) fed the control diet (without metribuzin). The second and the third groups (D1 and D2, $n = 8$ males and 8 females) were fed the diets containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day (D1, NOAEL) or at 13 mg/kg/day (D2, 1/100 LD 50) for 3 months. The rats received 14 g of each diet every day in the morning at 8H. In the afternoon, after controlling food consumption, control diet was given to all rats (14–30 g) until the next morning. This procedure helped to insure a consistent dosage over the course of the study.

The weight and food consumption of each animal were measured daily.

At the end of the experimental period (3 months) and after overnight fasting, rats were anaesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg of body weight). The blood was drawn from the abdominal aorta into heparinized tubes, and plasma was used for biochemical determinations. After removal of plasma, erythrocytes were washed three times with 2 volumes of isotonic saline. Erythrocytes were lysed with ice-cold distilled water (1/4) and stored at 4 °C for 15 min. The cell debris was removed by centrifugation (2000g for 15 min). Erythrocyte lysates were assayed for antioxidant catalase activity and glutathione contents. Tissues (liver, gastrocnemius muscle, perirenal adipose tissue, intestine) were collected, and immediately placed on dry ice. An aliquot of each tissue was homogenized in an Ultraturax homogenizer (Bioblock Scientific) for lipid extraction. A second aliquot of tissues was homogenized in 10 volumes of ice-cold 10 mmol/l phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 1.15% KCL. The homogenate was subjected to a 6000g centrifugation at 4 °C for 15 min. The supernatant fractions were collected and used for biochemical and redox marker determinations.

2.3. Chemical analysis

Plasma glucose was measured using the Trinder glucose kit (Sigma). Plasma triglyceride and cholesterol were measured using colorimetric enzymatic kits (Roche Diagnostics). For these enzymatic methods, the interassay CV (coefficient of variance) was in the range of 1.7–3%. Plasma creatinine and urea were measured using enzymatic colorimetric methods (Kits from BioAssay Sys-

tems, CA), with an interassay CV of 1.3–2.5%. Plasma aspartate aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2) activities were determined by the colorimetric method using Randox Diagnostic kits (Randox Laboratories Ltd, Co Antrim, UK), with an interassay CV of 2.8%. Liver, muscle, intestine and fat tissue lipid levels were measured using the method of Folch et al. [19]. Protein contents of plasma and tissue homogenates were determined by the method of Lowry et al. [20], with BSA as the standard.

Plasma vitamin C levels were determined using dinitrophenylhydrazine, thiourea and copper sulfate according to the method of Roe and Kuether [21], with an interassay CV of 3.4%. Erythrocyte catalase (EC 1.11.1.6) activity was measured by spectrophotometric analysis of the rate of H₂O₂ decomposition at 240 nm [22], with an interassay CV of 4%. Erythrocyte reduced glutathione (GSH) was determined using 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB or Ellman reagent) with an interassay CV of 3.6% [23].

2.4. Determination of tissue oxidant/antioxidant status

The tissue malondialdehyde (MDA) levels, a marker of lipid peroxidation, were determined in tissue supernatants by the method of Draper and Hadley [24] using thiobarbituric acid (TBA), with an interassay CV of 5%. Carbonyl proteins (markers of protein oxidation) were assayed by the 2,4-dinitrophenyl hydrazine reaction as described previously [25], with an interassay CV of 4.5%. Tissue GSH contents were determined using Ellman reagent.

2.5. Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard deviation (SD). The results were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. Data not normally distributed were logarithmically transformed. Significant differences among the groups were analyzed statistically by a one-way analysis of variance (ANOVA). When significant changes were observed in ANOVA tests, Fisher least significant difference tests were applied to locate the source of significant difference. Significant differences between males and females in the same group were assessed using a Student's *t* test. The significance level was set at $P < 0.05$. These calculations were performed using STATISTICA version 4.1 (STATSOFT, Tulsa, OK).

3. Results

3.1. Body weight, weight gain and energy intake in control and experimental rats

Throughout the 90 day experimental period no abnormalities or death was reported in any of the experimental group or the control. Wistar rats, exposed to metribuzin through their diet at 1.30 mg/kg for 3-months (D1 rats), both males and females, showed a significant reduction in body weight and in weight gain compared to control rats (Table 2). This was due to a significant decrease in food and energy intakes in both sexes. Rats fed the diet containing higher level of metribuzin (13 mg/kg for 3-months; D2 rats), both males and females, showed also decreased body weight, weight gain, food and energy intakes compared to controls. Additionally, the lowest values were apparent in D2 groups. Water intake was similar for all groups.

Female rats were significantly smaller than male rats, in each group. The weight gain, the food and energy intakes were significantly less in females compared with males, in either control or treated rats.

3.2. Plasma biochemical parameters in control and experimental rats

The administration of metribuzin resulted in the increase in plasma glucose, triglyceride, urea and creatinine levels, in both male and female rats, with the highest effective concentration being 13 mg/kg (D2) (Table 3).

No significant change was observed in plasma cholesterol levels of animals after exposure to D1 metribuzin. However, the administration of D2 metribuzin induced a significant reduction in plasma cholesterol concentrations in both sexes compared to control values.

Plasma AST and ALT activities were sensitive to the effects of metribuzin which resulted in a significant increase in AST and ALT activities and the effect was more pronounced with D2 (Table 3).

There were no sex significant differences in plasma cholesterol, total proteins, creatinine and ALT in each group. Females showed lower glucose and AST levels than in males in control group. In treated rats, females had lower glucose, triglycerides and higher urea levels than in males.

3.3. Tissue total lipid and protein contents in control and experimental rats

D1 and D2 metribuzin exposure caused a significant elevation in liver and muscle total lipid contents, the pronounced effect being with D2 in both male and female rats (Table 4). Intestine lipids were increased only after D2 metribuzin exposure; D1 did not alter these contents. However, metribuzin exposure induced a significant reduction in adipose tissue lipid contents in both male and female rats.

Liver, muscle and adipose tissue protein contents were significantly decreased after metribuzin treatment in both male and female rats (Table 4). However, intestine protein contents remained unchanged by metribuzin exposure in rats.

Females had significantly greater muscle lipids than did males in control group. In D2 treated rats, liver lipids were increased in females compared to males. Muscle total protein levels were reduced in females compared to males in each group.

3.4. Plasma and erythrocyte antioxidant status in control and experimental rats

There were significant alterations in plasma and erythrocyte antioxidant status in rats exposed to metribuzin in comparison to controls as indicated by a significant decrease of plasma vitamin C, erythrocyte GSH levels and erythrocyte catalase activity in both sexes, the highest effective concentration being D2 metribuzin (Fig. 1).

In control group, females had greater GSH amounts and lower catalase activity compared to male values. In D1 group, females had also lower catalase activity than males.

3.5. Organ oxidant/antioxidant status in control and experimental rats

Liver MDA and carbonyl protein levels were significantly increased while liver GSH contents were decreased in male and female rats after metribuzin exposure, the effect was more pronounced with D2 (Fig. 2).

In muscle, adipose tissue and intestine, a significant increase in MDA and carbonyl protein levels was induced by metribuzin treatment. However, GSH contents of these organs were not significantly different between control and treated rats (Fig. 2).

In control group, females showed less muscle and adipose tissue MDA levels than in males. In treated rats, females had higher

Table 2

Body weight, weight gain and energy intake in control and experimental rats.

	Male rats				Female rats			
	Controls	D1	D2	P (ANOVA)	Controls	D1	D2	P (ANOVA)
Initial body weight (g)	275 ± 30	255 ± 22	225 ± 20	0.102	210 ± 15*	208 ± 12*	183 ± 17*	0.113
Final body weight (g)	421 ± 27.39 ^a	343 ± 16.92 ^b	285 ± 14.9 ^c	0.001	303 ± 12.98 ^{a,*}	273.66 ± 8.62 ^{b,*}	228.66 ± 1 ^{c,*}	0.001
Weight gain (g)	139 ± 13.69 ^a	85.66 ± 4.10 ^b	60.66 ± 3.66 ^c	0.001	95.66 ± 5.58 ^{a,*}	68.33 ± 3.80 ^{b,*}	46.33 ± 4.62 ^{c,*}	0.003
Food intake (g/d/rat)	43.99 ± 1.94 ^a	33.25 ± 1.15 ^b	26.34 ± 1.62 ^c	0.004	30.80 ± 1 ^{a,*}	25.05 ± 1.60 ^{b,*}	20.84 ± 1.06 ^{c,*}	0.006
Energy intake (kcal/day/rat)	132 ± 7.20 ^a	99.97 ± 2.85 ^b	79.06 ± 3.51 ^c	0.005	92.43 ± 2.36 ^{a,*}	75.15 ± 2.9 ^{b,*}	62.46 ± 1.08 ^{c,*}	0.008
Water intake (ml/day/rat)	80 ± 8.50	76.30 ± 8	70.45 ± 7.50	0.123	70.33 ± 10	72 ± 8.46	68.31 ± 8.50	0.151

Values are presented as means ± SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

Table 3

Plasma biochemical parameters in control and experimental rats.

	Male rats				Female rats			
	Controls	D1	D2	P (ANOVA)	Controls	D1	D2	P (ANOVA)
Glucose (g/L)	1.14 ± 0.05 ^c	2.41 ± 0.14 ^b	2.86 ± 0.12 ^a	0.001	0.98 ± 0.06 ^{c,*}	2.37 ± 0.16 ^b	2.67 ± 0.12 ^{a,*}	0.001
Triglyceride (g/L)	0.76 ± 0.03 ^c	1.34 ± 0.04 ^b	1.50 ± 0.07 ^a	0.001	0.70 ± 0.04 ^b	0.75 ± 0.05 ^{b,*}	0.90 ± 0.06 ^{a,*}	0.01
Cholesterol (g/L)	1.27 ± 0.15 ^a	1.16 ± 0.13 ^a	0.88 ± 0.06 ^b	0.01	1.33 ± 0.22 ^a	1.13 ± 0.18 ^a	0.92 ± 0.07 ^b	0.01
Total proteins (g/L)	64.55 ± 3.11	65.03 ± 3.64	62.25 ± 2.12	0.251	62.55 ± 4.03	62.83 ± 3.76	63.44 ± 4.08	0.238
Urea (g/L)	0.23 ± 0.03 ^c	0.50 ± 0.04 ^b	0.65 ± 0.03 ^a	0.01	0.25 ± 0.04 ^c	0.52 ± 0.04 ^b	0.75 ± 0.06 ^{a,*}	0.01
Creatinine (g/L)	10.23 ± 1.12 ^c	17.03 ± 1.33 ^b	28.21 ± 1.42 ^a	0.01	10.27 ± 1.31 ^c	18.44 ± 1.26 ^b	27.04 ± 1.55 ^a	0.01
ALT (IU/L)	28 ± 1.23 ^c	30.24 ± 1.68 ^b	46.12 ± 2.26 ^a	0.01	26.36 ± 2.15 ^c	32.22 ± 2.42 ^b	44.12 ± 1.88 ^a	0.01
AST (IU/L)	34.53 ± 1.35 ^b	35.28 ± 2.03 ^b	57.38 ± 2.02 ^a	0.03	32.82 ± 1.38 ^{c,*}	36.14 ± 2.08 ^b	61.02 ± 2.19 ^a	0.01

Values are presented as means ± SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day; D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

Table 4

Tissue total lipid and protein contents in control and experimental rats.

	Male rats				Female rats			
	Controls	D1	D2	P (ANOVA)	Controls	D1	D2	P (ANOVA)
<i>Total lipids (mg/g)</i>								
Liver	122.40 ± 14.17 ^b	139.80 ± 11 ^b	177.40 ± 23 ^a	0.02	117.20 ± 16 ^b	123.82 ± 17 ^b	255 ± 40 ^{a,*}	0.01
Muscle	58.40 ± 6.19 ^c	128 ± 15.10 ^b	174 ± 17.47 ^a	0.004	75.8 ± 8.96 ^{c,*}	130.8 ± 13 ^b	156 ± 17 ^a	0.005
Adipose tissue	233 ± 23.57 ^a	208 ± 20.35 ^b	159 ± 12.59 ^c	0.001	230 ± 26.6 ^a	185.8 ± 17 ^b	134 ± 21 ^c	0.001
Intestine	66.72 ± 5.69 ^b	62.8 ± 7.40 ^b	130 ± 6.15 ^a	0.01	67.8 ± 3.85 ^b	63.2 ± 6.54 ^b	129 ± 9.4 ^a	0.01
<i>Total proteins (mg/g)</i>								
Liver	157.55 ± 17.60 ^a	124.80 ± 18 ^b	103 ± 10 ^c	0.001	145 ± 14.84 ^a	116.56 ± 10 ^b	95.61 ± 11 ^c	0.001
Muscle	98.2 ± 7.46 ^a	77 ± 5.82 ^b	54.22 ± 3 ^c	0.002	73.24 ± 5.74 ^{a,*}	54.62 ± 4.63 ^{b,*}	46.83 ± 3.5 ^{c,*}	0.004
Adipose tissue	19.53 ± 5.64 ^a	14.6 ± 4.80 ^b	8.2 ± 2.35 ^c	0.003	16.68 ± 3.23 ^a	10.6 ± 3 ^b	7.21 ± 1.64 ^c	0.005
Intestine	52.82 ± 4.30	47.6 ± 5.66	46.01 ± 4.50	0.176	43.8 ± 4.62	46.98 ± 5.3	41.7 ± 5.3	0.159

Values are presented as means ± SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: * $P < 0.01$.

liver and intestine MDA and carbonyl proteins but lower adipose carbonyl proteins than males.

4. Discussion

Human pesticide exposure was strongly associated with increased incidence of many diseases and physiological impairments. Metribuzin, a widely used herbicide, is considered as not very toxic to mammals [10]. Although the effects of chronic exposure to atrazine, another s-triazine herbicide, have been well documented, there is a dearth of data on the chronic exposure to metribuzin at environmentally realistic concentrations. In fact, no report is available about the metabolic and physiologic effects of low doses of metribuzin. Therefore, we examined the chronic effects of low doses of metribuzin (NOEL, LD 50/100) on metabolic parameters including oxidative stress markers in the rat.

The administration of metribuzin resulted in the loss of body weight. The reduction in body weight was pronounced in animals

treated with D2 (13 mg/kg) compared to D1 (1.3 mg/kg) in both male and female rats. The decrease in the body weight following metribuzin administration was in accordance with reports on pesticides exposure [26–28]. In our study, the decrease in the body weight after metribuzin administration was due to reduced diet intake.

The administration of metribuzin at low doses induced several metabolic changes. Biochemical investigations like plasma urea and creatinine are used to assess renal functions. Metribuzin exposure through the diet resulted in the increase in plasma urea and creatinine in both male and female rats, suggesting renal failure. Similar findings have also been recorded by other pesticides [29,30]. On the other hand, urea is synthesized by hepatocytes from ammonia generated by amino acid catabolism from protein digestion in the intestines or from endogenous tissue proteins. The rate of urea production is dependent on endogenous protein catabolism since organ protein contents (liver, muscle and adipose tissue) were decreased in metribuzin treated rats compared to

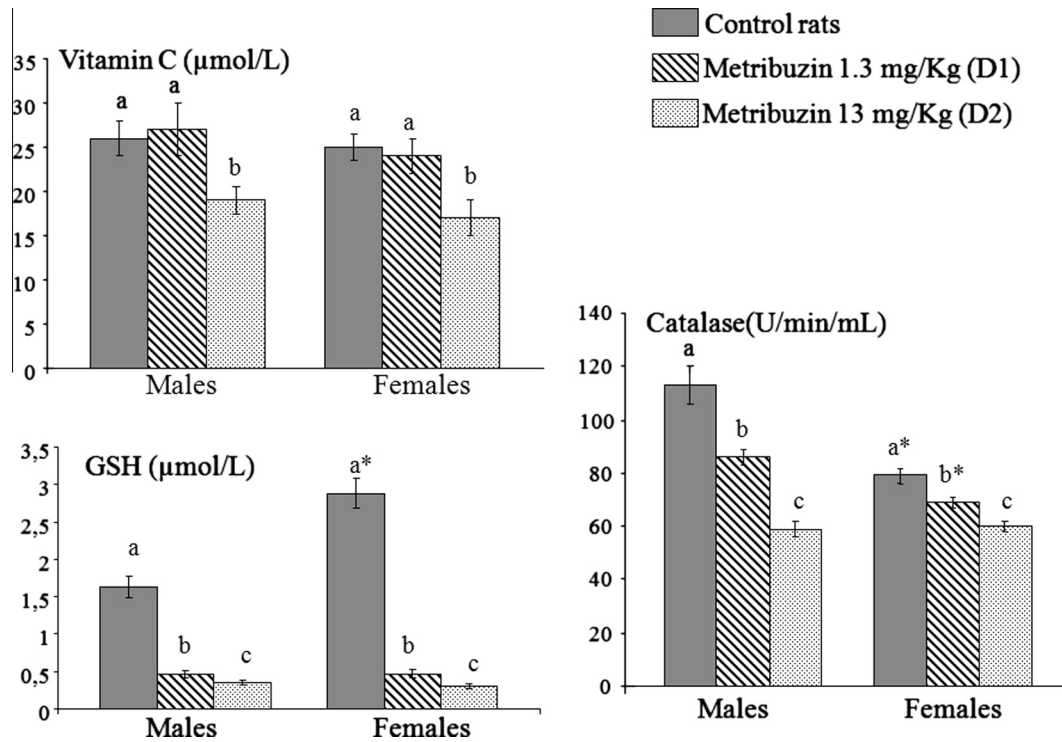


Fig. 1. Plasma and erythrocyte antioxidant status in control and experimental rats. Values are presented as means \pm SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: $*P < 0.01$.

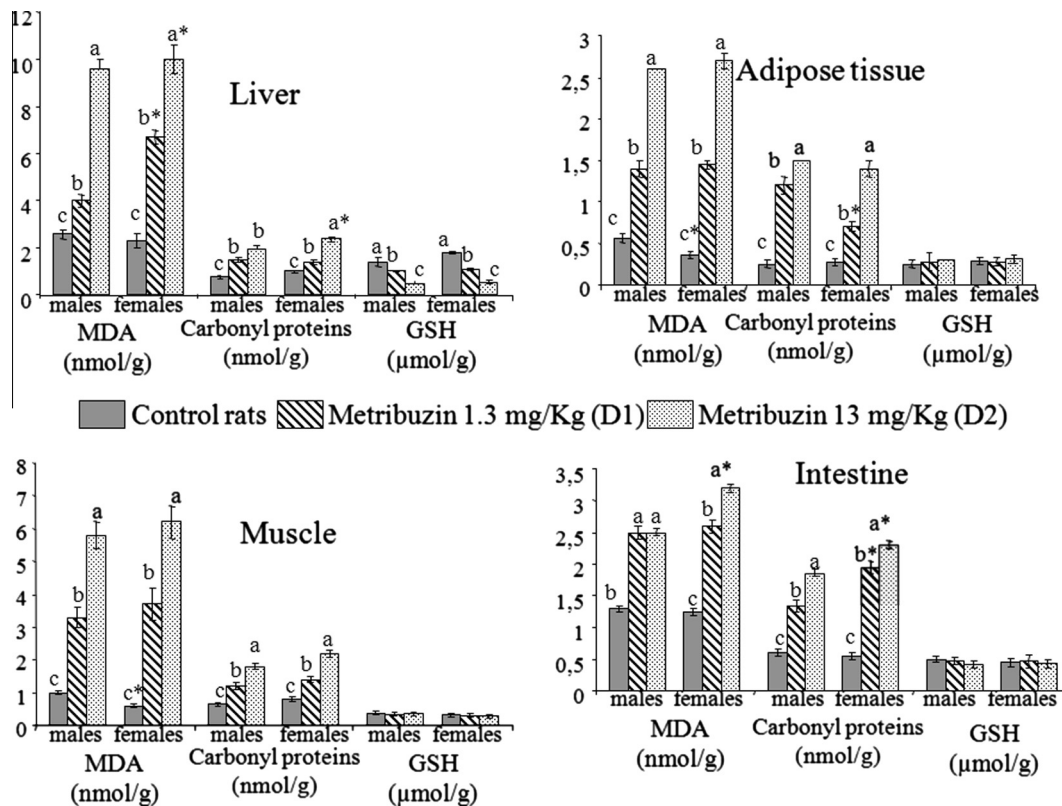


Fig. 2. Liver, muscle, intestine and adipose tissue oxidant/antioxidant status in control and experimental rats. Values are presented as means \pm SD. D1: rats fed the diet containing metribuzin at 1.30 mg/kg/day. D2: rats fed the diet containing metribuzin at 13 mg/kg/day. Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different between groups for the same gender ($P < 0.05$). Significant differences between male and female rats in each group are indicated by: $*P < 0.01$.

controls. Increased protein catabolism was previously reported after pesticide exposure [31]. These findings are comparable to those obtained in food restriction which induced a protein catabolic state [32].

Our results showed that metribuzin treatment increase the plasma enzyme activities (ALT, AST). The transaminase enzymes are considered as indicator for tissue damage that is explained by the degree of exposure and the severity of toxic symptoms. The significant increase in AST and ALT activities in treated rats may be explained by destructive changes in hepatic cells induced by metribuzin. This caused permeability alterations and leakage of lysosomal enzymes and enhanced release of enzymes. These results have confirmed those recorded by many authors working on different pesticides at high doses [27,28,33]. However, the transaminase enzymes are also found in other organs such as heart, muscle, kidney ... In our study, AST and ALT release might be elevated also in other organ injury.

Plasma glucose levels were increased in both male and female rats fed metribuzin treated diets. This finding could result from increased hepatic glycogen catabolism, as showed for other pesticides [34,35]. This metabolic change is similar to that observed in chronic undernutrition [32]. It is possible that increased plasma glucose levels in treated rats may be due to reduced glucose utilization and impaired tissue function.

Our data showed a significant increase in plasma triglyceride levels in rats treated with D1 and D2 doses of metribuzin compared to control rats. This abnormality could be a result of overproduction and/or decreased catabolism, as reported previously for other pesticides [36]. An increase in liver lipid levels with a concomitant decrease in adipose tissue lipids was observed in rats exposed to metribuzin. These findings suggested increased flux of plasma fatty acids from the mobilization of adipose tissue fat. This resulted in overproduction and secretion of plasma triglyceride-rich lipoproteins by the liver. Despite this, metribuzin induced fatty liver in rats, as shown by other pesticides [35,37]. However, metribuzin exposed rats displayed decreased plasma levels of cholesterol. This might result from a reduction in cholesterol synthesis, or from decreased food intake or from tissue accumulation of cholesterol. Plasma cholesterol levels were considered as valuable indicator of drug-induced disruption of lipid metabolism. Previous studies show increased synthesis and accumulation of cholesterol in the liver, kidney and testis and impaired biliary function [35,38]. In our study, increased total lipid contents of liver, intestine and muscle were induced by metribuzin in both male and female rats. The accumulation of cholesterol in the liver might be due to inhibition of enzymes involved in cholesterol break up resulting into cholesterol deposition in the cell [35].

Our results showed that metribuzin exposure resulted in increased oxidative stress and altered antioxidant status in both male and female rats. Undernutrition is also associated with increased oxidative stress [39]. The decrease in vitamin C and GSH levels and in catalase activity might be due to their increased utilization in response to oxidative stress in treated rats. Alla et al. [40] observed a decrease in the formation of proteins in plants treated with metribuzin. The effect of metribuzin on protein synthesis could also exist in rats and could be responsible for a decrease in catalase activity. The increased lipid MDA and protein carbonyl contents observed after metribuzin exposure indicated an increased oxidative stress in metribuzin-induced organ toxicity. Exposure of experimental animals to pesticides is known to induce lipid peroxidation in various tissues, which is responsible for the adverse biological effects [26–28].

MDA is the main oxidation product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. It represents an important index of lipid peroxidation. Administration of metribuzin significantly increased liver, intestine, muscle and adipose tissue MDA levels in rats. The effect

was more pronounced with the highest dose, in agreement with previous studies [27,28].

GSH is not an enzymatic scavenger of free radicals. It acts as a substrate or cofactor for glutathione-dependent enzyme reactions. GSH also acts as a reactant in conjunction with electrophilic substances. Thus, a change in GSH levels may be an important indicator of the detoxification ability of an organism [41]. Its depletion can result in cell degeneration due to oxidative stress caused by pollutants [42]. Results of our experiments showed that GSH content in the liver of the metribuzin administered rats were significantly decreased as compared to control group. This indicated pro-oxidant conditions in the liver, as previously reported for other pesticides [11,27,28]. The reduced levels of GSH in treated rats could be the result of increased utilization of GSH for conjugation and/or its participation as an antioxidant against free radicals induced by metribuzin toxicity. The liver is major site for detoxification of these compounds.

In the present study, we observed that several of the parameters measured had significant gender differences. Compared with male control rats, oxidative stress was decreased in control females. This may be attributed to a decrease in body weight and food intake, a decrease in plasma glucose levels, and an increase in GSH levels and estrogen protection as previously reported [43]. However, in treated rats, oxidative stress is enhanced in females which showed high organ MDA and carbonyl protein levels and low catalase activity compared with males. It is possible that increased oxidative stress in treated females may be due to the lack of gender protection.

In summary, our results showed that chronic metribuzin exposure at low doses is associated to underfeeding and has adverse effects on organ functions leading to physiological impairments. In addition, metribuzin exposure resulted in increased oxidative stress and altered antioxidant status in different organs. In the light of these observations, it is recommended that metribuzin should be used with caution. It causes detrimental effects even at low doses. The nutritional management now appears of the first importance. Nutritional supplementation in pesticide exposure could improve nutritional status. However, more data are needed in order to assess its effect on metabolic changes induced by herbicides.

Acknowledgments

This work was supported by the French Foreign Office [International Research Extension Grant TASSILI 08MDU723]; and by the Algerian Research Project (PNR, 2011).

The authors thank INRAA (Sidi Bel Abbes, Algeria) for providing pesticides (Metribuzin) and potatoes used in this study.

References

- [1] M.C. Alavanja, J.A. Hoppin, F. Kamel, Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity, *Annu. Rev. Public Health* 25 (2004) 155–197.
- [2] K.L. Bassil, C. Vakil, M. Sanborn, D.C. Cole, J.S. Kaur, K.J. Kerr, Cancer health effects of pesticides: systematic review, *Can. Fam. Physician* 53 (2007) 1704–1711.
- [3] E. Corsini, I. Codecà, S. Mangiaratti, S. Birindelli, C. Minoia, R. Turci, B. Viviani, A. Facchi, N. Vitelli, L. Lucchi, C.L. Galli, M. Marinovich, C. Colosio, Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: *in vivo* and *in vitro* exposure, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222 (2007) 202–210.
- [4] L.A. McCauley, W.K. Anger, M. Keifer, R. Langley, M.G. Robson, D. Rohlman, Studying health outcomes in farm worker populations exposed to pesticides, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 953–960.
- [5] P.J. Mink, H.O. Adami, D. Trichopoulos, N.L. Britton, J.S. Mandel, Pesticides and prostate cancer: a review of epidemiologic studies with specific agricultural exposure information, *Eur. J. Cancer Prev.* 17 (2008) 97–110.
- [6] G. Van Maele-Fabry, S. Duhayon, C. Mertens, D. Lison, Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: a review and meta-analysis of cohort studies, *Environ. Res.* 106 (2008) 121–137.

- [7] E. Loser, G. Kimmerle, Acute and subchronic toxicity of Sencor active ingredient, *Pflanzenschutz-Nachr.* 25 (1972) 186–188.
- [8] W.R. Christenson, B.S. Wahle, Technical grade metribuzin (Sencor®): a combined chronic toxicity/oncogenicity feeding toxicity study in the rat, Unpublished report to EPA by Miles Inc., 1993, MRID 42672501.
- [9] A.G. Bayer, [5-14C]Metribuzin (¹⁴C) study of metabolites in the organs of rats, Bayer AG institute of pharmacokinetics, *Pharmacol. Rep.* (1981) 10142.
- [10] M.S. Bleeke, M.T. Smith, J.E. Casida, Metabolism and toxicity of metribuzin in mouse liver, *Pestic. Biochem. Physiol.* 23 (1985) 123–130.
- [11] W. Aouacheri, S. Saka, R. Djafer, The toxic effect of an insecticide (alphamethrin) on the activity of detoxifying glutathione enzymatic system, *Ann. Toxicol. Anal.* 21 (2009) 125–129.
- [12] D.M. Townsend, K.D. Tew, H. Tapiero, The importance of glutathione in human disease, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 145–155.
- [13] N. Lédircac, S. Antherieu, A.D. d'Uby, J.C. Caron, R. Rahmani, Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species, *Toxicol. Sci.* 86 (2005) 444–452.
- [14] D.A. Drechsel, M. Patel, Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease, *Free Radical Biol. Med.* 44 (2008) 1873–1886.
- [15] R. Rajabi, R.A. Khavari-Nejad, F. Ghanati, F. Najafi, Effects of stress induced by post-emergence application of metribuzin herbicide on wheat, *Afr. J. Biotechnol.* 11 (2012) 3773–3778.
- [16] M.M. Nemat Alla, A.M. Hassan, Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments, *Plant Physiol. Biochem.* 44 (2006) 202–210.
- [17] A. Medjdoub, S.A. Merzouk, H. Merzouk, F.Z. Chiali, M. Narce, Effects of Mancozeb and Metribuzin on *in vitro* proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens, *Pestic. Biochem. Physiol.* 101 (2011) 27–33.
- [18] EFSA Scientific Report, Conclusion regarding the peer reviews of the pesticide risk assessment of the active substance metribuzin, *EFSA J.* 88 (2006) 1–74.
- [19] J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 1861–1869.
- [20] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [21] J.H. Roe, C.A. Kuether, The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of dehydroascorbic acid, *J. Biol. Chem.* 147 (1943) 399–407.
- [22] H. Aebi, Catalase, *Methods of enzymatic analysis*, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), second ed., vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp. 673–684.
- [23] G. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70–77.
- [24] H. Draper, M. Hadley, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 421–431.
- [25] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478.
- [26] Y. Sharma, S. Bashir, M. Irshad, T.C. Nag, T.D. Dogra, Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure, *Toxicology* 215 (2005) 173–181.
- [27] J.S. Bhatti, I.P.S. Sidhu, G.K. Bhatti, Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes, *Mol. Cell. Biochem.* 353 (2011) 139–149.
- [28] M. Singh, R. Sandhir, R. Kiran, Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E, *Exp. Toxicol. Pathol.* 63 (2011) 269–276.
- [29] N. Benjamin, A. Kush wah, R.K. Sharma, A.K. Katiyar, Histopathological changes in liver kidney and muscle of pesticides exposed malnourished and diabetic rats, *Ind. J. Exp. Biol.* 44 (2006) 228–232.
- [30] M.M. Salem, Toxic effects of mancozeb containing formulations and neem pesticides on kidney function and ultrastructure of albino rats, *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* 3 (2011) 17–30.
- [31] R.L. Ksheerasagar, M.B. Hiremath, B.B. Kaliwal, Impairment of hepatic biochemical contents and enzymes activities during carbosulfan intoxication in albino mice, *Int. Multidisc. Res. J.* 3 (2011) 6–15.
- [32] P.W. Emery, Metabolic changes in malnutrition, *Eye* 19 (2005) 1029–1034.
- [33] N. Choudhary, M. Sharma, P. Verma, S.C. Joshi, Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan, *J. Environ. Biol.* 24 (2003) 305–308.
- [34] J.A.R. Kumar, P.S. Rajini, Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis, *Toxicology* 257 (2009) 40–45.
- [35] R.L. Ksheerasagar, B.B. Kaliwal, Histological and biochemical changes in the liver of albino mice on exposure to insecticide, carbosulfan, *Caspian J. Env. Sci.* 4 (2006) 67–70.
- [36] K. Begum, P.S. Rajini, Monocrotophos augments the early alterations in lipid profile and organ toxicity associated with experimental diabetes in rats, *Pestic. Biochem. Physiol.* 99 (2011) 33–38.
- [37] Y. Nakagawa, K. Tayama, Acute hepatotoxic potential of imazalil fungicide in rats, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (1997) 402–407.
- [38] M.K.J. Siddiqui, F. Anjum, M. Mahboob, M. Mustafa, Effects of dimethoate on hepatic cytochrome P-450 and glutathione S-transferase activity in pigeon and rat, *Indian J. Exp. Biol.* 29 (1991) 1071–1073.
- [39] F.F. Akinola, O.O. Oguntibeju, O.O. Alabi, Effects of severe malnutrition on oxidative stress in Wistar rats, *Sci. Res. Essays* 5 (2010) 1145–1149.
- [40] M.M. Alla, A.M. Badawi, N.M. Hassan, Z.M. El-bataswisy, E.G. Badran, Effect of metribuzin, butachlor and chlorimuron-ethyl on amino acid and protein formation in wheat and maize seedlings, *Pestic. Biochem. Physiol.* 90 (2008) 8–18.
- [41] C.C.C. Cheung, G.J. Zheng, A.M.Y. Li, B.J. Richardson, P.K.S. Lam, Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*, *Aquat. Toxicol.* 52 (2001) 189–203.
- [42] X. Zhang, F. Yang, X. Zhang, Y. Xu, T. Liao, S. Song, H. Wang, Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rareminnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD), *Aquat. Toxicol.* 86 (2008) 4–11.
- [43] A.A. Miller, T.M. De Silva, K.A. Jackman, C.G. Sobey, Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34 (2007) 1037–1043.

ملخص:

المبيدات ، مواد كيميائية سامة تستخدم على نطاق واسع في الزراعة لزيادة غلة المحاصيل. وترتبط هذه الجزيئات مع تطور الاضطرابات الأيضية، السرطانية، مشكلة أعصاب و الخصوبة. البطاطا من الخضروات المستهلكة على نطاق واسع من قبل الجزائريين الملوثة ولا سيما عن طريق المبيدات. أهداف هذا العمل هي دراسة التسممات الناتجة عن بعض المبيدات المستخدمة عادة لمعالجة زراعة البطاطا (منطقة الغرب الجزائري)، metribuzin (مبيدات الأعشاب الضارة) mancozeb (مبيد الفطريات).

في التقرير المجراة من آثار المبيدات في الجرعات المنخفضة وطويلة الأجل (90 يوما) على أبيض الدهون والبروتينات، وحالة نشاط الأوكسدة / المضادة للأوكسدة من بعض الانزيمات والمقاطع النسيجية من مختلف الاعضاء لمعرفة الاضطرابات الهيكلية في الفئران الذكور والإناث. أظهرت النتائج أن العلاج المبيدات يؤدي الى سقوط وزن الجسم مما يؤدي إلى انخفاض في كمية الطاقة اليومية، انخفاض الوزن لعضلة الساق ، ارتفاع السكر في الدم، وزيادة اليوريا والكرياتينين (والدهون. وبالإضافة إلى ذلك، لوحظ تغيير في حالة نشاط الأوكسدة / المضادة للأوكسدة في هذه الفئران أظهرت زيادة مستويات ALT AST والترانساميناسات (وعلامات من أكسدة البروتين الدهني ، مع الحد من PCAR)، بروتين الكاربونيل (DIC)، الدايبينات مترافق (MDA) malondialdéhydes البلازما والأنسجة (يتناقص LCAT الأوكسدة واضحة. النشاط الأنزيمي من الليسيثين الكولسترول أسيل ترانسفيراز (C وفيتامين CAT)) مخفضة، نشاط الكاتالاز (Glut الجلوتاثيون) الأنسجة. وإلى جانب هذه التغييرات، مقاطع خلايا الانسجة اظهرت وجود التهابات التسلل وتعطيل الأنسجة الخلوية. (lipase) (مع زيادة النشاط الليباز في metribuzin وmancozeb ولذلك فمن الضروري لدعم حالات الشذوذ الأيضي وجود الاكسدة العالية مع تغييرات في عمارة الأنسجة بعد العلاج بالمبيدات، الجرعات المنخفضة.

، البطاطا، والجلوكوز، والدهون، والبروتينات، والبروتينات الدهنية والهيئات والفئران، وحالة الأوكسدة / mancozeb ، metribuzin كلمات البحث: المبيدات، المضادة للأوكسدة. المقاطع الأنسجة.

Résumé

Les pesticides, produits chimiques toxiques, sont très utilisés en agriculture pour l'augmentation des rendements agricoles. Ces molécules sont associées à l'apparition des troubles métaboliques, cancérogènes, neurotoxiques et problème de fertilité. La pomme de terre, légume très consommé par la population Algérienne est particulièrement contaminée par les pesticides. Les objectifs de ce travail sont d'étudier les toxicités de certains pesticides couramment utilisés pour le traitement phytosanitaire de la culture des pommes de terre (région de l'ouest Algérien), la métribuzine (herbicide) et le mancozebe (fongicide). La détermination in vivo des effets des pesticides à faible doses et à long terme (90 jours) sur le métabolisme des lipides et des protéines, le statut oxydant/antioxydant, l'activité de quelques enzymes et l'histologie des différents organes permet de voir les perturbations fonctionnelles et structurales chez les rats wistar mâles et femelles. Les résultats montrent que le traitement aux pesticides induit une chute du poids corporel consécutive à une diminution de l'apport énergétique quotidien, une chute du poids de muscle gastrocnémien, une hyperglycémie, une augmentation du taux d'urée, de la créatinine et des transaminases (ALT, AST) et une hyperlipidémie. De plus, une altération du statut oxydant/antioxydant est notée chez ces rats avec augmentation des teneurs plasmatiques et tissulaires en malondialdéhydes (MDA), diènes conjugués (DIC), protéines carbonylées (PCAR) et réduction du glutathion réduit, des activités de la catalase et de la vitamine C en faveur d'un stress oxydatif évident. L'activité enzymatique de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) est diminuée alors que l'activité lipase tissulaire est augmentée. A coté de ces altérations, l'histologie des différents organes est marquée par la présence d'un infiltrat inflammatoire et une désorganisation de l'architecture tissulaire suite aux pesticides.

Il est donc nécessaire de prendre en charge les anomalies métaboliques, le stress oxydatif élevé et les perturbations de l'architecture tissulaire suite au traitement par les pesticides, mancozebe et métribuzine, à des doses faibles.

Mots clés : pesticides, métribuzine, mancozebe, pomme de terre, glucose, lipides, protéines, lipoprotéines, organes, rat, statut oxydant/antioxydant, coupes histologiques.

Abstract

Pesticides, toxic chemicals are widely used in agriculture to increase crop yields. These molecules are associated with the development of metabolic disorders, carcinogenic, neurotoxic and fertility problem. Potato, vegetable widely consumed by the Algerian population is particularly contaminated by pesticides. The objectives of this work are to study the toxicity of some pesticides commonly used for the treatment of potatoes (region of wester Algeria), metribuzin (herbicide) and mancozeb(fungicide).

The in vivo effects of low doses of pesticides for a long-term period (90 days) on lipid and protein metabolisms, oxidant/antioxidant status and histology of various organs were determined to see structural and functional disturbances in male and female wistar rats. The results showed that pesticide treatment induces a fall in body weight induced by a decrease in daily energy intake, in gastrocnemius muscle weight, hyperglycemia, increased levels of urea, creatinine and transaminases (ALT AST) and hyperlipidemia. In addition, alterations of oxidant / antioxidant status were observed in these rats with increased plasma and tissue levels malondialdehydes (MDA), conjugated dienes (DIC), protein carbonyls (PCAR) and reduction in reduced glutathione levels, catalase activity and vitamin C in favor of the presence of oxidative stress. The enzymatic activity of lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) decreased while tissue lipase activity increased. Besides these changes, the histology of different organs was denoted by the presence of an inflammatory infiltrate and disruption of tissue architecture.

It is therefore necessary to support the metabolic abnormalities, the oxidative stress and tissue architectural damages following treatment with pesticides, mancozeb and metribuzin at low doses.

Keywords: pesticides, metribuzin, mancozeb, potato, glucose, lipids, proteins, lipoproteins, organs, rat, oxidant / antioxidant status, histology.