

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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



Université Mohammed Seddik Benyahia- de Jijel  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de l'Environnement et des  
Sciences Agronomiques

جامعة محمد الصديق بن يحيى – جيجل  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم علوم المحيط والعلوم الفلاحية

Thèse

Présentée par

**SEBTI Lemya**

En vue de l'obtention du doctorat 3<sup>ème</sup> cycle (LMD)

**Filière :** Biologie

**Option :** Biologie, Environnement et Santé : Biodiversité et Ecotoxicologie

Thème

***Etude *in vitro*, *in vivo* et *in silico* des effets toxiques des mélanges  
de pesticides largement utilisés en Algérie.***

Soutenue publiquement le 16 Février 2023

Devant le jury :

<b>Pr. MAYACHE Boualem</b>	<b>(Université de Jijel)</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. LEGHOUCHI Essaid</b>	(Université de Jijel)	Rapporteur
<b>Dr. BOULDJEDRI Mohamed</b>	(Université de Jijel)	Examineur
<b>Pr. BENSEGUENI Abderrahmane</b>	(Université des Frères Mentouri Constantine 1)	Examineur
<b>Pr. BELKHIRI Lotfi</b>	(Université des Frères Mentouri Constantine 1)	Examineur

*À l'âme de mon père...*

*À ma mère et toute ma famille*

*À Mehdi Rostom*

## Remerciements

La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce au recours de plusieurs personnes, auxquelles je voudrai témoigner ici toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le professeur **Essaid LEGHOUCHI**, de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail de recherche. Pour ses précieux conseils, son écoute active et sa disponibilité.

J'exprime mes sincères remerciements aux honorables membres de jury :

Je remercie énormément Monsieur le professeur **MAYACHE Boualem**, de l'université de Jijel, d'avoir accepté d'être président de cette thèse.

Je remercie également, Monsieur le Professeur **BOULDJEDRI Mohamed**, de l'université de Jijel, d'avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail.

Je remercie énormément Monsieur le Professeur **BENSEGUENI Abderrahmane**, de l'université Frères Mentouri Constantine 1, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail et de participer à ce jury. Mais surtout d'avoir contribué aussi à ce que la partie *in silico* de cette thèse soit menée à bien, grâce à ses nombreux conseils.

Je remercie également, Monsieur le Professeur **BELKHIRI Lotfi**, de l'Université Frères Mentouri Constantine, d'avoir accepté de consacrer du temps à examiner ce travail et aussi pour les ateliers ou les discussions sur les outils informatiques, l'intelligence artificielle et le futur de la science étaient longues et intéressantes.

Je remercie tous les laborantins de la faculté SNV de l'Université de Jijel pour leur aide précieuse et leur disponibilité.

Je remercie également l'équipe du laboratoire de culture cellulaire de la faculté de médecine et de pharmacie de l'université de Rouen Normandie en France, ainsi que l'équipe du laboratoire de cytotoxicité et génotoxicité de l'université de Gaziantep en Turquie.

Mes sincères **remerciements** vont aussi à tous mes amis doctorants et docteurs des universités de Tlemcen, Oran, Sidi bel Abbes, Batna, Sétif et Constantine. Vous vous reconnaitrez certainement !

Enfin, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Avant-propos

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

### PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

**Sebti, L., & Leghouchi, E. (2021).** Alteration of biochemical markers of liver and kidney in rats, following exposure to pesticide mixtures. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*.

**Sebti, L., & Leghouchi, E. (2021).** *In vitro* cytotoxicity of single and combined pesticides and molecular docking study.

### COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

**Sebti L., Leghouchi, E. (2014)** *Etude de l'impact de l'exposition à un mélange de pesticides (moyen de lutte) à faible doses : cytotoxicité in vitro et évaluation de l'effet pro oxydant in vivo.* **Séminaire national sur la biodiversité faunistique, Alger.**

**Sebti L., Leghouchi, E. (2014)** *Etude de l'impact de l'exposition à un mélange de pesticides : sur des lignées cellulaires humaines et l'induction de stress oxydant chez des rats.* **Congrès Internationale de Biotoxicologie et Bioactivité, Oran.**

**Sebti L., Leghouchi, E. (2014)** *Effects of pesticides on biodiversity,* **BIOSEC.**

**Sebti L., Leghouchi, E. (2015)** *Néphrotoxicité d'un mélange de pesticides sur le rat Wistar.* **Séminaire national sur la Néphrotoxicité, Guelma.**

**Sebti L., Leghouchi, E. (2015)** *Evaluation des effets toxiques d'un mélange de quatre pesticides sur quelques paramètres biochimiques chez le rat Wistar.* **45<sup>ème</sup> Congrès du groupe français de pesticides, Versailles.**

**Sebti L., Leghouchi, E. (2015)** *Pesticides : des toxiques dans nos assiettes ! Evaluation des effets toxiques d'un mélange de pesticides utilisés en Algérie.* **Journées scientifiques à l'occasion de la commémoration du 42<sup>ème</sup> anniversaire de la création de l'USTHB, Alger.**

**Sebti L., Leghouchi, E. (2016)** *Etudes in vitro et in vivo des effets de mélanges de pesticides.* **Séminaire National Biotechnologie, Environnement et Santé, Jijel.**

**Sebti L., Sebti N., Benzeniar I., Leghouchi, E. (2018)** *Calcul et modélisation des interactions entre trois pesticides et trois enzymes impliquées dans le stress oxydatif à l'aide de techniques de « Docking moléculaire ».* **Séminaire National Biotechnologie, Environnement et Santé, Jijel.**

**Sebti L., Leghouchi, E. (2021)** **Contribution à la modélisation des interactions entre trois pesticides et une protéine enzymatique la glutathion s-transférase.** **Le 50<sup>ème</sup> congrès du groupe français de la recherche sur les pesticides. Webinaire.**

## Liste des figures

Figure 1 : Production mondiale totale de pesticides et leurs importations dans le monde entre 1940 et 2000 (Tillman et al., 2002).....	17
Figure 2: Utilisation des pesticides en Algérie (Moussaoui et al., 2005). .....	28
Figure 3 : Evolution du nombre de décisions d'homologation de pesticides en Algérie (MADR, 2006 in Mokhtari 2011). .....	29
Figure 4 : Spectre d'utilisation de pesticides durant l'année 2009 (Kheddam-Benadjal, 2012). .....	31
Figure 5 : Formules chimiques du sel de tétrazolium MTT et de sa forme réduite, le sel de Formazan. ....	39
Figure 6 : Localisation des cinq zones d'étude : Beni Belaid, Sidi Abdelaziz, El-Kannar, Djimar et El-Ouana (Image satellitaire non traitée).....	61
Figure 7 : Variations de la viabilité cellulaire de 4 pesticides avec les concentrations (0.002, 0.2, 0.4 et 1 mg/kg/5l de sang) sur les cellules HT29 différenciées après 24 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de correspondant au témoin négatif. ...	73
Figure 8 : Variations de la viabilité cellulaire de 4 pesticides avec les concentrations (0.002, 0.2, 0.4 et 1 mg/kg/5l de sang) sur les cellules HT29 différenciées après 48 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif. ....	73
Figure 9 : Variations de la viabilité cellulaire de 4 pesticides avec les concentrations (0.002, 0.2, 0.4 et 1 mg/kg/5l de sang) sur les cellules HT29 différenciées après 72 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif. ....	74
Figure 10 : Cytotoxicité des 4 pesticides (chlorpyrifos, cyperméthrine, lambda-cyhalothrine et propoxur) et leurs mélanges (M1, M2 et M3) sur les cellules HT29 différenciées après 24, 48 et 72 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif. ....	76
Figure 11 : (A) Cristaux de formazan dans les cellules pulmonaires A549 ; (B) Cristaux de formazan dans les cellules endothéliales HUVEC.....	78
Figure 12 : Cytotoxicité de trois mélanges de pesticides (M4, M5 et M6) sur les deux lignées cellulaires HUVEC et A549 après 48 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif. ....	78
Figure 13 : Evolution du poids corporel des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leurs DJA pendant 120 jours. ....	83
Figure 14: Poids relatifs du foie et des reins des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leurs DJA pendant 120 jours. ....	83
Figure 15 : Superposition de la géométrie du ligand obtenu par rayon-X (colorée en vert) et celle calculée par le Docking moléculaire avec Autodock Vina (colorée en orange) du complexe "Glutathion S-transférase - S-hexylglutathion". ....	92
Figure 16 : Superposition de la géométrie du ligand obtenu par rayon-X et celle calculée par le Docking moléculaire avec Autodock Vina du "la catalase –cyanide". ....	93

Figure 17 : Complémentarité géométrique entre la Lambda cyalothrine et la GST (mode surface/ligand représenté avec la couleur jaune). .....	97
Figure 18 : Représentation en 2D des interactions entre la lambda cyalothrine et le site actif de la GST et des acides aminés impliqués. ....	98
Figure 19 : Complémentarité géométrique entre la cyperméthrine et la GST (mode surface/ligand représenté avec la couleur jaune). .....	100
Figure 20 : Représentation en 2D des interactions entre la cyperméthrine et le site actif de la GST et des acides aminés impliqués. ....	101
Figure 21 : Complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la GST (mode surface/ligand représenté avec la couleur rouge). .....	103
Figure 22 : Représentation en 2D des interactions entre l'acétamipride et le site actif de la GST et des acides aminés impliqués. ....	104
Figure 23 : Complémentarité géométrique entre la Lambda cyalothrine et la CAT (mode surface/ligand représenté avec la couleur jaune). .....	106
Figure 24 : Représentation en 2D des interactions entre la lambda cyalothrine et la catalase et des acides aminés impliqués. ....	107
Figure 25 : Complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la CAT. ....	109
Figure 26 : Représentation en 2D des interactions entre l'acétamipride et le site actif de la catalase et des acides aminés impliqués. ....	110
Figure 27 : Complémentarité géométrique entre le diazinon et la CAT (mode surface/ligand représenté avec la couleur orange). ....	111
Figure 28: Représentation en 2D des interactions entre le diazinon et le site actif de la catalase et des acides aminés impliqués. ....	112
Figure 29 : Complémentarité géométrique entre la lambda cyalothrine et la SOD (mode surface/ligand représenté en couleur jaune). .....	114
Figure 30: Représentation en 2 D des interactions entre la lambda cyalothrine et le site actif de la SOD et des acides aminés impliqués. ....	115
Figure 31 : Complémentarité géométrique entre la cyperméthrine et la SOD (mode surface/ligand représenté en couleur bleu) .....	117
Figure 32: Représentation en 2D des interactions entre la cyperméthrine et le site actif de la SOD et des acides aminés impliqués. ....	118
Figure 33 : Complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la SOD (mode surface/ligand représenté en couleur verte). ....	120
Figure 34 : Représentation en 2D des interactions entre l'acétamipride et le site actif de la SOD et des acides aminés impliqués. ....	121
Figure 35 : Représentation du positionnement des 12 pesticides dans le site actif de la GST .....	125
Figure 36 : Représentation du positionnement des 12 pesticides dans le site actif de la CAT. ....	127
Figure 37 : Représentation du positionnement des 12 pesticides dans le site actif de la SOD. ....	129

## Liste des tableaux

Tableau 1: Années d'introduction des premiers pesticides utilisés dans le monde entre 1850 et 1990 (Ware, 1986 ; Tomlin, 2000 <i>In</i> Matthews, 2006).....	7
Tableau 2 : Evolution de la productivité du sol entre 2007 et 2011 (DSA, 2016).....	25
Tableau 3 : Taux des biomarqueurs hépatiques des différents groupes de rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leur valeur DJA pendant 120 jours. ....	85
Tableau 4 : Taux de biomarqueurs lipidiques des différents groupes des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leur valeur DJA pendant 120 jours. ....	87
Tableau 5 : Taux de marqueurs des stress oxydatif dans les différents groupes des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leur valeur DJA pendant 120 jours. ....	88
Tableau 6 : Les différents scores obtenus lors du Docking moléculaire des pesticides avec la GST(IK3Y).....	94
Tableau 7 : Les différents scores obtenus lors du Docking moléculaire des pesticides avec la catalase(1DGG).....	95
Tableau 8 : Les différents scores obtenus lors du Docking moléculaire des pesticides avec la SOD (5T30).....	96
Tableau 9: Les principales interactions entre lambda cyalothrine et la GST (1K3Y). ....	99
Tableau 10 : Les principales interactions entre la cyperméthrine et la GST (1K3Y). ....	102
Tableau 11: Les principales interactions entre l'acétamipride et la GST (1K3Y). ....	105
Tableau 12 : Les principales interactions entre la lambda cyalothrine et la catalase (1DGG). ....	108
Tableau 13 : Les principales interactions entre l'acétamipride et la catalase (1DGG).....	111
Tableau 14 : Les principales interactions entre le diazinon et la catalase (1DGG). ....	113
Tableau 15 : Les principales interactions entre la Lambda cyalothrine et la SOD (5T30). ...	116
Tableau 16 : Les principales interactions entre la cyperméthrine et la SOD (5T30).....	119
Tableau 17 : Principales interactions entre l'acétamipride et la SOD (5T30). ....	121
Tableau 18 : Tableau comparatif des résidus impliqués dans les interactions des mélanges M1, M2 et M3 avec la GST.....	126
Tableau 19 : Tableau comparatif des résidus impliqués dans les interactions des mélanges M1, M2 et M3 avec la CAT. ....	128
Tableau 20 : Tableau comparatif des résidus impliqués dans les interactions des mélanges M1, M2 et M3 avec la SOD. ....	130

## Table des matières

I. Chapitre I : Etat de l'art.....	5
1. Généralités sur les pesticides .....	5
1.1. Historique des pesticides .....	5
1.2. Définition des pesticides .....	8
1.3. Classification des pesticides.....	10
1.3.1. 1 <sup>er</sup> système de classification .....	11
1.4. Pesticides dans l'environnement.....	13
1.4.1. Distribution et dispersion des pesticides dans l'environnement .....	13
1.4.2. Dispersion atmosphérique .....	13
1.4.3. Rétention et dégradation des pesticides dans le sol .....	14
1.5. Relation entre les LMR et les risques .....	14
1.5.1. Définition des limites maximales des résidus .....	14
1.5.2. Dose journalière acceptable et appréciation des risques.....	14
1.5.3. Limite de détermination.....	16
1.6. Pesticides dans le monde.....	16
1.7. Voies d'exposition aux pesticides.....	17
1.7.1. Exposition cutanée .....	18
1.7.2. Exposition par la voie respiratoire .....	18
1.7.3. Exposition orale.....	18
1.7.4. Exposition aux pesticides par des sources indirectes .....	19
1.8. Mode d'action des pesticides .....	19
1.9. Toxicité des pesticides.....	19
1.10. Règlementation en Algérie .....	22
1.11. Homologation des pesticides et mise sur le marché en Algérie.....	22
1.12. Agriculture et utilisation des pesticides en Algérie .....	24
II. Chapitre II : Matériel et méthodes.....	34
1. Enquête et recueil d'information .....	34
1.1. Méthodologie de travail.....	34
1.1.1. L'enquête auprès des organismes d'agriculture de la wilaya de Jijel .....	35
1.1.2. L'enquête auprès des agriculteurs .....	35
1.1.3. L'enquête auprès des revendeurs de pesticides .....	36



1.2.	Echantillonnages et déroulement de l'enquête.....	36
2.	Etude <i>in vitro</i> .....	38
2.1.	Matériel et Méthodes .....	38
2.1.1.	Test de cytotoxicité (le test au MTT).....	38
2.1.2.	Matériel biologique .....	39
2.1.3.	Traitement des cellules .....	42
2.2.	Etude statistique .....	44
3.	Etude <i>in vivo</i> .....	47
3.1.	Matériels et méthodes .....	47
3.1.1.	Animaux d'expérimentation.....	47
3.1.2.	Traitement.....	47
3.1.3.	Préparation de l'homogénat des tissus.....	48
3.1.4.	Paramètres biochimiques .....	49
3.1.5.	Biomarqueurs du stress oxydatif dans le foie et les reins .....	50
3.2.	Etude statistique .....	51
4.	Etude <i>in silico</i> .....	53
4.1.	Méthodologie de travail utilisé dans l'étude <i>in silico</i> .....	53
4.1.1.	Préparation du récepteur .....	53
4.1.2.	Préparation des ligands .....	54
4.3.	Le test de re-docking.....	56
4.4.	Analyse visuelle .....	57
III.	Résultats et discussion.....	61
1.	Résultats de l'enquête.....	61
1.1.	Définition des zones d'étude.....	61
1.2.	Collecte d'information.....	61
	Spiromesifene .....	63
2.	Etude <i>in vitro</i> .....	71
2.1.	Etude 1 .....	72
2.2.	Etude 2.....	77
3.	Etude <i>in vivo</i> .....	82
3.1.	Toxicité des mélanges de pesticides.....	82
3.2.	Effet des mélanges sur le poids corporel des animaux et poids relatifs des organes ....	82
4.	Résultats de l'étude <i>in silico</i> .....	92

4.1 Etude 1 .....	92
4.1.1. Le test de re-docking.....	92
4.1.2. Simulation des interactions des pesticides avec la GST, la CAT et la SOD par Docking moléculaire .....	93
4.1.2.1. Pour la GST .....	94
4.1.2.2. Pour la CAT .....	95
4.1.2.3. Pour la SOD .....	95
4.1.3. Etude des interactions "Enzymes –Pesticides" .....	96
4.1.3.1. Etude des interactions du complexe GST – lambda cyalothrine.....	96
4.1.3.2. Etude des interactions du complexe GST-Cyperméthrine.....	100
4.1.3.3. Etude des interactions du complexe GST– Acétamipride .....	103
4.1.3.4. Etude des interactions du complexe CAT– Lambda cyalothrine .....	105
4.1.3.5. Etude des interactions CAT – Acétamipride .....	109
4.1.3.6. Etude des interactions du complexe Catalase – Diazinon .....	111
4.1.3.7. Etude des interactions du complexe SOD – Lambda cyalothrine .....	114
4.1.3.8. Etude des interactions du complexe SOD – Cypermethrine .....	116
4.1.3.9. Etude des interactions du complexe SOD – Acétamipride.....	119
4.2. Etude 2.....	124
4.2.1. Etude comparative des interactions des différents pesticides avec la GST, la CAT et la SOD.....	124
4.2.1.1. Etude des interactions des pesticides avec la GST .....	125
4.2.1.2. Etude des interactions des pesticides avec la CAT .....	127
4.2.1.3. Etude des interactions des pesticides avec la SOD .....	129
IV. Conclusion .....	133
V. Références bibliographiques.....	135

## Liste des abréviations

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicologie

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ALAT : Alanine Aminotransférase

ANOVA : Analyses de Variance

ASAT : Aspartate Aminotransférase

CAT : Catalase

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DJA : Dose Journalière Admissible

DM : Dynamique Moléculaire

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium

DO : Densité Optique

DSA : Direction des Services Agricoles

EF : Facteur d'Enrichissement

ES : Standard Error

FAO : Food and Agriculture Organization

GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GPx : Glutathion Peroxydase

GSH : Glutathion

GST : Glutathion S-transférase

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell

INPV : Institut National de la Protection des Végétaux

J.C : Jésus Christ

LC-MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LDL : Lipoprotéines de basse densité

LMR : Limite Maximale de Résidu

LPO : Peroxydation Lipidique

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

MAE : Erreur Absolue Moyenne

NCBI : National Center for Biotechnology Information

OC : Organochloré

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OP : Organophosphoré

PBS : Tampon phosphate salin

PDB : Protein Data Bank

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

PNDAR : Plan National pour le Développement Agricole et Rural

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

S.A.U : Surface Agricole Utile

SE : Erreur Standard

SOD : Superoxyde Dismutase

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TBARS : Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique

# **Introduction**

---

## **Introduction générale**

Les pesticides font aujourd'hui partie des substances chimiques les plus utilisées dans notre environnement, ils sont principalement destinés à protéger les cultures contre les nuisibles et assurer de meilleurs rendements. L'utilisation accrue de pesticides dans l'agriculture conduit à la présence de résidus dans l'alimentation. En plus de la contamination professionnelle, la population générale est également exposée au travers de son alimentation et de son environnement.

Les pesticides comprennent une large gamme d'herbicides, d'insecticides, de fongicides, de rodenticides, de nématicides, etc. Au cours du développement agricole, les pesticides sont devenus un outil essentiel pour la protection des plantes et pour améliorer le rendement des cultures. Environ 45 % de la production alimentaire annuelle est perdue en raison d'une infestation de ravageurs ; par conséquent, une gestion efficace des ravageurs en utilisant une large gamme de pesticides est nécessaire pour lutter contre les ravageurs et augmenter la production agricole (Abhilash et Singh 2009 ; Eason et al., 2010 ; Crowell et al., 2013). Cependant, dans la dernière moitié du XIXe siècle, l'économie mondiale a connu une énorme croissance, notamment des secteurs industriels et agricoles. Celle-ci a conduit à l'augmentation progressive de la production et à l'utilisation accrue de produits chimiques dans l'agriculture. L'utilisation inconsidérée de pesticides et d'autres polluants organiques sur les sols agricoles a des répercussions dévastatrices dans l'avenir. La nature persistante et omniprésente des pesticides agricoles et autres polluants organiques a causé de sérieux dommages à l'humanité en raison de leurs propriétés de bioaccumulation et de leur toxicité élevée. Ces pesticides sont connus pour entraver le fonctionnement normal des systèmes endocrinien et reproducteur des organismes vivants (Vos et al, 2000). Ils ont également engendré un appauvrissement important du nombre et de la diversité des organismes bénéfiques tels que les prédateurs des ravageurs de culture, ce qui a conduit à une augmentation significative de l'utilisation de pesticides (Haubruge et Amichot, 1998).

Les effets nocifs des pesticides ont enclenché une prise de conscience dans les pays développés. En 1972, les organochlorés étaient interdits d'utilisation aux Etats-Unis et en Europe et des réglementations concernant les produits phytosanitaires ont été mises en place à partir des années 80.

Dans les pays en développement, le recours aux pesticides et la généralisation de leur utilisation augmentent rapidement depuis plusieurs années. Ces augmentations vont de pair avec l'omniprésence de ces produits dans tous les compartiments de l'environnement.

Pendant des années, l'Afrique n'a représenté qu'une petite fraction du marché mondiale des pesticides, mais cela n'a pas duré, en 2018, l'Afrique a importé près de 7 500 tonnes de ces produits chimiques, dont 25 substances dangereuses interdites en Europe depuis des années, tels le thiaméthoxame, le propiconazole, le chlorothalonil et la pymétozine (Gaberell et al., 2020). Le manque de conscience publique sur les risques liés aux expositions à ces produits couplé au manque de sensibilisation sur leurs dangers, ainsi que l'absence de réglementations régissant leur utilisation et les mesures protectrices presque inexistantes, font aujourd'hui, que les pesticides soient une menace importante pour la santé de l'homme et l'environnement.

L'exposition de l'homme aux pesticides relève de trois types de voies : orale (alimentation), respiratoire (air) et cutanée. Les chiffres de l'OMS indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent environ 90 % de l'exposition des consommateurs à l'alimentation dont 10 % à l'eau et une part moindre à l'air (Chevalier et al., 2003).

Plusieurs études ont évoqué l'implication des pesticides dans diverses pathologies chez des personnes exposées professionnellement à ces produits, en particulier des pathologies cancéreuses, des maladies neurologiques et des troubles de la reproduction (Gangemi et al., 2016 ; Yan et al., 2018 ; De Graaf et al., 2022). En revanche, plusieurs études se sont intéressées à l'exposition de l'ensemble de la population générale, en étudiant les effets des pesticides à faibles doses (les faibles doses désignent les doses inférieures aux doses utilisées dans les tests d'évaluation en toxicologie.) (Bellinger et al., 1992).

Les pesticides sont employés en mélange pour cibler plusieurs types de ravageur, une même culture peut donc être réceptrice de plusieurs pesticides différents et expose ainsi le consommateur à une multitude de produits chimiques.

L'étude des interactions des pesticides au sein d'un mélange avec différentes cibles aux niveaux cellulaire et moléculaire est une problématique très complexe. Il est difficile de prévoir les interactions des substances chimiques dans les mélanges et de connaître leurs modes d'action possibles, notamment leurs effets à long terme. Il convient donc d'approfondir les recherches en utilisant des modèles reproduisant l'exposition réelle. Il existe aujourd'hui peu de données de littérature sur les risques sur la santé en lien avec l'exposition aux pesticides en Algérie. Les effets toxicologiques des mélanges de pesticides ne peuvent être prédits à partir des effets des composés pris individuellement. Ces effets peuvent être

cumulatifs, antagonistes, additifs ou synergiques. Ainsi, il est indispensable d'évaluer les effets de mélanges de pesticides pour une meilleure évaluation des risques du consommateur.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier et d'expliquer les effets néfastes que peuvent avoir les pesticides, les plus utilisés en Algérie, sur la santé des individus qui leurs sont exposés. Et ce, en essayant d'évaluer les effets toxicologiques des mélanges de pesticides représentatifs des produits phytosanitaires les plus utilisés sur les fruits et légumes du marché Algérien, tout en essayant de se rapprocher au mieux de la réalité de l'exposition.

L'ensemble de cette étude nous a permis de mettre en évidence les risques sanitaires liés à l'exposition aux pesticides, en ayant précédé comme suit ;

Après avoir défini les pesticides et exposé les risques en lien avec ces produits dans une partie introductive, une description de la méthodologie et du déroulement des enquêtes menées dans différentes zones d'étude et qui ont permis de répertorier les pesticides auxquels, consommateurs et utilisateurs sont exposés, sera abordée.

Une partie « matériel et méthodes » nous a aidé à présenter, par la suite, l'ensemble des études *in vitro*, *in vivo* et *in silico*, dont l'objectif principale pour chacune d'entre elles était d'étudier les associations entre l'exposition aux pesticides utilisés en agriculture et les risques qui en découlent.

Dans les deux premières études, différents modèles animaux et cellulaires ont été utilisés pour étudier les effets combinés des pesticides sur la cytotoxicité et sur plusieurs marqueurs biologiques. Ces techniques ont été utilisées pour mimer des phénomènes d'exposition reflétant l'exposition réelle des utilisateurs ou des consommateurs de ces produits. Dans la dernière étude, la technique du Docking moléculaire a été appliquée, afin de rationaliser et modéliser le mode d'interaction entre les pesticides et les enzymes étudiées. La modélisation moléculaire est une alternative pour la prédiction des interactions protéiques. Elle permet d'obtenir des informations sur les modes d'interactions des protéines sur le plan structural. Faire appel à ce type d'approches semble, aujourd'hui, être de première importance.

Les résultats seront ensuite discutés dans la partie dédiée à l'analyse et la discussion des résultats obtenus dans les différentes parties de l'étude. Enfin, après avoir apporté les éléments de réponses nécessaires à la compréhension des effets des pesticides, nous concluons notre travail en évoquant les différentes perspectives qui en découlent.



# CHAPITRE I

---

## ETAT DE L'ART

## **I. Chapitre I : Etat de l'art**

L'usage des pesticides permet de limiter les dégâts dus aux ravageurs sur les cultures. Les progrès dans la protection des plantes ont largement contribué à l'augmentation des rendements et à la régularité de la production. Facilement accessibles et peu coûteux, les pesticides ont depuis longtemps contribué à protéger les cultures contre les bioagresseurs, à protéger contre certains vecteurs de maladies humaines et animales et à accroître les rendements agricoles et permettre d'atteindre une sécurité alimentaire dans plusieurs pays. Cependant, le revers de la médaille n'a pas tardé à se révéler ; le recours à ces produits chimiques a été très vite remis en question. Une quantité appliquée trop abondante est nocive pour la plante, l'environnement, et l'ensemble des êtres vivants.

### **1. Généralités sur les pesticides**

#### **1.1. Historique des pesticides**

Au cours de la préhistoire et longtemps après le moyen Âge, la destruction des plantes était attribuée à des causes magiques ou surnaturelles et les mesures protectrices étaient basées sur des pratiques magiques, rituelles, ou religieuses. L'usage de produits chimiques minéraux dans la lutte contre les insectes pourrait remonter à l'antiquité gréco-romaine (Derache, 1989).

- 2000 avant J.-C., les humains utilisaient des pesticides pour protéger leurs cultures. Le premier pesticide connu était le saupoudrage de soufre élémentaire utilisé dans l'ancienne Sumer, il y a environ 4 500 ans, dans l'ancienne Mésopotamie.
- 1000 ans avant J.C Homère connaissait les propriétés fongicides du soufre.
- 500 ans avant J.C Démocrite protégeait les plantes par pulvérisation d'huile d'olive.
- 50 ans avant J.C Pline recommandait l'arsenic pour tuer les insectes.

L'usage des insecticides remonte à la haute Antiquité, les anciens perses avaient découvert les propriétés insecticides des fleurs broyées d'une plante de la famille des Astéracées, le pyrèthre. Les premières tentatives de lutte chimique effectuées contre les fourmis à l'aide de sels arsenicaux remontent au moyen Âge. Dès 1690, un horticulteur français songea à utiliser une décoction de tabac pour lutter contre le « Tigre » du poirier.

Cependant, les véritables débuts de la lutte chimique contre les insectes nuisibles remontent au milieu de XIX<sup>e</sup> siècle.

Dans la seconde moitié du XIX<sup>e</sup> siècle avec les débuts du développement de la monoculture organisée de façon quasi industrielle aux États-Unis, l'utilisation des pesticides s'est généralisée. Dans la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle, l'utilisation de pesticides a connu une expansion considérable avec la découverte d'un nombre important de familles chimiques de pesticides de synthèse. Les pesticides utilisés depuis les débuts de l'agriculture jusqu'au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, étaient principalement des minéraux, l'arsenic et le soufre notamment. Au XIX<sup>e</sup> siècle, la production de masse de fongicides à base de mercure et de sulfate de cuivre a notablement augmenté. C'est à cette époque que la bouillie bordelaise a été inventée, composée d'un mélange de sulfate de cuivre et de chaux, elle était destinée à lutter contre certaines maladies cryptogamiques de la vigne et de la pomme de terre (Jas, 2010).

Les pesticides d'origine synthétiques ne se sont développés que pendant et après la seconde guerre mondiale, qui a révolutionné le contrôle des parasites, ravageurs et tout organisme considéré comme nuisible. Les chimistes cherchaient donc des produits peu coûteux, résistants au soleil, présentant une faible toxicité et qui devaient réagir rapidement après leur application. C'est en 1938 que Muller a démontré que le DDT, considéré à l'époque comme une découverte majeure avait toutes ces qualités. (Ramade, 2005 ; Matthews, 2006 ; Oturan et Mouchel, 2007). C'est au cours des deux décennies suivantes, qu'un certain nombre de nouveaux pesticides a fait son apparition. Cette nouvelle génération de pesticides était plus efficace à faibles doses et plus stable à la lumière car bien étudiés et fondés sur une meilleure compréhension de mécanismes biochimiques et biologiques.

**Tableau 1:** Années d'introduction des premiers pesticides utilisés dans le monde entre 1850 et 1990 (Ware, 1986 ; Tomlin, 2000 *In* Matthews, 2006).

<b>Année</b>	<b>Type de pesticide</b>	<b>Nom de pesticide</b>
<b>1850</b>	Herbicide	Sulphate ferreux
<b>1882</b>	Fongicide	Bordeaux mixture
<b>1930</b>	Herbicide	DNOC
<b>1931</b>	Fongicide	Thiram
<b>1939</b>	Insecticide	DDT (commercialisé en 1944)
<b>1943</b>	Fongicide	Zineb
<b>1944</b>	Insecticide	HCH (lindane)
<b>1946</b>	Insecticide	Parathion
<b>1948</b>	Insecticide	Aldrin, Dieldrin
<b>1949</b>	Fongicide	Captan
<b>1952</b>	Insecticide	Diazinon
<b>1953</b>	Herbicide	Mecoprop
<b>1955</b>	Herbicide	Paraquat (commercialisé en 1962)
<b>1956</b>	Insecticide	Carbaryl
<b>1965</b>	Nematicide	Aldicarb
<b>1968</b>	Fongicide	Benomyl
<b>1971</b>	Herbicide	Glyphosate

<b>1972</b>	Insecticide	Diflubenzuron
<b>1973</b>	Insecticide	Permethrin
<b>1990</b>	Insecticide	Imidacloprid
<b>1990</b>	Fongicide	Azoxystrobin
	Insecticide	Spinosad

L'utilisation des pesticides s'est généralisée au cours des dernières décennies et a grandement contribué au développement de systèmes de production intensifs. En permettant une réponse aux besoins conséquents des populations, l'agriculture s'est principalement construite autour de l'utilisation de ces produits.

## 1.2. Définition des pesticides

Le mot « pesticide » vient de la contraction de deux mots latins *cida* ou *caedo* qui signifient : « tuer » et *pest* (animal, insecte ravageur ou plante nuisible) ou *pestis* qui signifie « fléau, maladie contagieuse, épidémie, peste ».

Le mot « pesticide » est une appellation générique utilisée pour décrire une substance (ou mélange de substances) ou produit (formulation) qui détruit un organisme nuisible, prévient ou réduit les dommages causés par ce dernier. Les pesticides peuvent également inclure toute substance utilisée pour modifier la croissance d'une plante (contrôleur), provoquer la chute prématurée des feuilles d'un végétal (défoliant) ou agir comme desséchant (déshydratant). Les pesticides sont habituellement des produits chimiques, mais ils peuvent également être fabriqués à partir de matières naturelles telles que des animaux, des plantes ou des bactéries.

Les pesticides peuvent être utilisés en agriculture ; et dans ce milieu, ils peuvent aussi être désignés par : produits phytosanitaires, produits phytopharmaceutiques ou encore produits agro-pharmaceutiques, ou destinés à des usages non agricoles et sont dénommés produits biocides. Ces derniers sont réservés à certains usages domestiques tels la lutte contre les rats, la protection des bois contre les champignons, la désinfection ou encore dans l'hygiène publique.

Au sens de la loi Algérienne n° 87-17 du 1<sup>er</sup> août 1987 relative à la protection phytosanitaire qui a été rééditée en 2002, les « pesticides » ou les « Produits phytosanitaires »

sont « les substances ou mélange de substances destinés à repousser, détruire ou combattre les organismes nuisibles, en vue de la protection végétale. Le terme comprend les agents biologiques, les régulateurs de croissance, les correcteurs de carence, les défoliants, les agents de dessiccation, les agents d'éclaircissage ainsi que les substances appliquées sur les cultures avant ou après récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport. »

Dans les textes du code international de conduite pour l'utilisation des pesticides (FAO), les pesticides ont été définis comme suit : " Pesticide : toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux pour combattre les insectes, les arachnides et d'autres parasites dans ou sur le corps. Le terme comprend les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance des plantes, comme défoliant, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée des fruits, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, soit avant, soit après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport". En ce qui concerne les définitions en relation étroite avec le terme « pesticide », et qui pourront faciliter la compréhension de ce qui va suivre dans ce manuscrit, nous retenons celles trouvées dans les textes de la loi algérienne n° 87-17 n° 87-17 du 1<sup>er</sup> août 1987 concernant la protection phytosanitaire :

« **Formulation** : mélange de substances à priorités diverses donnant un produit dans un état physique et sous forme adaptée à l'usage prévu. Ce mélange contient généralement une matière active plus des adjuvants. »

« **Matière active** : constituant biologiquement actif de la formation auquel est attribuée, en tout ou en partie, son efficacité. »

« **Adjuvant** : substance dépourvue d'activité biologique mais capable d'améliorer les qualités physico-chimiques de la formulation. »

« **Résidus** : substances spécifiques laissées par un pesticide dans les produits agricoles.

Le terme comprend tous les dérivés de pesticides et les impuretés jugées importantes du point de vue toxicologique de source inconnue ou inévitable ou résultant des utilisations connues du produit chimique. »

Tout au long de ce manuscrit, le terme « pesticide » sera employé pour désigner les produits phytosanitaires, substances actives, préparations ou formulations de pesticides.

Il est à signaler que notre étude sera limitée aux produits utilisés dans la protection des cultures.

### **1.3. Classification des pesticides**

Les pesticides commercialisés sont difficiles à classer car ils sont caractérisés par une grande variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activités. Certains auteurs séparent les pesticides minéraux des pesticides organiques eux-mêmes divisés en organophosphorés et organochlorés au moment où d'autres préfèrent les classer à l'intérieur de chaque catégorie : Insecticides, Herbicides, Fongicides, etc.

Il existe alors plusieurs possibilités de classification selon le critère considéré :

✓ Selon le mode de pénétration du produit dans le ravageur ; on distingue ainsi les Insecticides de contact, les Insecticides d'ingestion, les Insecticides d'inhalation et les insecticides systémiques qui sont absorbés par les végétaux dont la sève devient toxique pour le prédateur. De la même façon, on sépare les Herbicides de contact qui ne détruisent que les parties du végétal touchées, les Herbicides de translocation interne, qui sont absorbés par les racines ou les feuilles et qui se répartissent de façon homogène ou hétérogène dans l'organisme, et les Herbicides résiduels qui sont appliqués dans le sol où ils persistent assez longtemps avant de pénétrer dans le végétal au moment de la germination,

✓ Selon l'effet obtenu qui peut porter soit sur un grand nombre de ravageurs (Insecticides ou Fongicides polyvalents, Herbicides totaux) soit sur un nombre plus réduit d'espèces (produits sélectifs ou spécifiques),

✓ Selon l'activité biologique, on parle alors de composés à action purement physique (destruction des cuticules, obturation des pores), ou de produits à action physiologique ou biochimique (perturbation de processus métaboliques fondamentaux),

✓ Selon leur utilisation soit en traitement préventif (prophylactique) soit en traitement curatif (thérapeutique) dont l'effet peut être local (topique), ou général (systémique),

✓ Selon l'époque d'application, ceci concerne essentiellement les Herbicides qui sont ainsi classés en Herbicides de pré ou post-semis et de pré ou post-levé.

Ces modes de classification pour pratiques qu'ils soient, ne sont pas entièrement satisfaisants et les frontières sont floues (Derache, 1989).

Nous retenons les deux systèmes de classifications ci-dessous, dont la première repose sur le type de parasites à contrôler et le second s'établit en fonction de la nature chimique des groupements fonctionnels qui composent les pesticides.

### 1.3.1. 1<sup>er</sup> système de classification

Il est nécessaire de trouver quelle substance est appropriée pour lutter contre un ravageur donné. Cette recherche peut être facilitée par l'utilisation d'une classification suivant l'usage ou l'activité biologique des pesticides qui sont classés en fonction de l'organisme nuisible à détruire (Calvet, 2005).

• **Les insecticides** : Un insecticide chimique est un produit issu de la synthèse chimique (composé synthétique ou héli-synthétique) qui a la propriété de tuer les insectes. A court ou à long terme. Les insecticides organiques de synthèse sont des molécules carbonées synthétisées et se distinguent des insecticides inorganiques ou minéraux (Regnault-Roger et al., 2005).

• **Les fongicides** : Le traitement des graines par les fongicides est très important pour la protection de jeunes semis. Les fongicides agricoles permettent de combattre les champignons phytopathogènes qui sont des eucaryotes susceptibles de provoquer des dégâts sur les plantes cultivées et sur les récoltes. Ils représentent environ 30% du chiffre d'affaires mondial des pesticides (Regnault-Roger et al., 2005 ; Matthews, 2006).

• **Les herbicides** : Les herbicides sont des substances qui, généralement, détruisent leurs plantes cibles, nommées adventices ou mauvaises herbes. Quelques-uns ne sont pas létaux à leur dose d'utilisation ; cependant, ils freinent suffisamment la croissance et le développement des plantes touchées pour les empêcher de nuire à la culture. En outre, lorsque celle-ci est semée à forte densité (Regnault-Roger et al., 2005).



• Outre les herbicides, les fongicides et les insecticides les pesticides regroupent aussi les nématocides, les acaricides, les rodenticides, les molluscides et les algicides (Penel et Vansteene, 2007).

### 1.3.2. Deuxième système de classification

Le deuxième système de classification tient compte de la nature chimique de la substance active majoritaire qui compose le pesticide.

La nature chimique d'un pesticide est donnée par sa composition élémentaire, sa composition fonctionnelle et par sa structure, c'est-à-dire par l'arrangement dans l'espace des atomes qui constituent les molécules. Il faut souligner la très grande diversité chimique des pesticides due, à la fois, aux éléments chimiques qu'ils contiennent, mais aussi aux diverses fonctions chimiques présentes dans les molécules. Elle permet d'avoir une meilleure compréhension de l'étendue des propriétés et des usages des pesticides (Testud et Grillet, 2007).

• **Les pesticides inorganiques** : Ils sont peu nombreux mais certains sont utilisés en très grandes quantités comme le soufre et le cuivre.

IL n'existe plus d'insecticides inorganiques et un seul herbicide est encore employé aujourd'hui comme désherbant total, le chlorate de sodium. L'essentiel des pesticides inorganiques sont des fongicides à base de soufre et de cuivre sous diverses formes dont une des plus utilisées est la bouillie bordelaise ( $[\text{Cu}(\text{OH})_2]_x$ ,  $\text{CaSO}_4$ ) employé pour traiter la vigne, les arbres fruitiers, la pomme de terre et de nombreuses cultures maraîchères.

• **Les pesticides organo-métalliques** : Ce sont des fongicides dont la molécule est constituée par un complexe d'un métal tel que le zinc et le manganèse et d'un anion organique dithiocarbamate. On peut citer parmi ces pesticides le mancozèbe (avec le zinc) et le manèbe (avec le manganèse).

• **Les pesticides organiques** : Ils sont multiples, nombreux et appartiennent à diverses familles chimiques.

Les principaux groupes chimiques sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les triazines et les urées substituées.

• **Les organochlorés (OC)** : Ils forment un groupe hétérogène d'hydrocarbures aromatiques et polycycliques chlorés, sans réelle communauté de structure mais qui partagent,

à des degrés divers, une lipophilie marquée et une très et une très grande stabilité moléculaire. Cette dernière propriété leur confère une biodégradabilité extrêmement lente, tant dans l'environnement – la demi-vie sur le sol et dans l'eau dépasse dix ans pour certains dérivés – que chez les organismes vivants (la demi-vie du DDT chez l'homme est de 3 à 4 ans).

- **Les organophosphorés (OP) :** Ce sont des amides ou des esters des acides phosphoriques, phosphoniques, thiophosphoriques et thiophosphoniques.

Il convient de noter qu'il est possible que certaines familles chimiques de pesticides contiennent des substances ayant plusieurs cibles. A titre d'exemple, certains pesticides possèdent des propriétés insecticides et fongicides à la fois.

#### **1.4. Pesticides dans l'environnement**

A la différence de tous les autres types de polluants, les pesticides sont les seuls à être intentionnellement dispersés dans l'environnement (Ramade, 2005). La dispersion systématique de grandes quantités de pesticides sur les terres cultivées entraîne leur présence dans les différents compartiments.

##### **1.4.1. Distribution et dispersion des pesticides dans l'environnement**

Il est généralement admis que les mécanismes de dispersion des pesticides dans l'environnement sont très nombreux et en plus de la nature du produit épandu, ces derniers, dépendent de différents paramètres et caractéristiques en lien avec le sol, le couvert végétal, les conditions climatiques et l'application.

##### **1.4.2. Dispersion atmosphérique**

Le transfert des substances phytosanitaires dans l'atmosphère est désigné sous le terme de volatilisation. C'est le processus physico-chimique par lequel un composé est transféré de la phase solide ou liquide vers la phase gazeuse, indiquant un changement de phase. Les pesticides peuvent être présents dans l'air par volatilisation à partir du sol ou des plantes, par érosion éolienne ou par dérive lors de l'épandage. Cependant, un nombre de pesticides est appliqué sous forme d'aérosols. Les pesticides une fois dans l'air peuvent alors être dégradés, redistribués, transportés (aérosols ou forme gazeuse), déposés par voie sèche ou humide, ou photodégradés. Ils peuvent aussi être entraînés par le ruissellement de l'eau de pluie dans les eaux et rivières (Irace-Guigand et al., 2004).

Il est à l'heure actuelle difficile de donner des valeurs chiffrées des concentrations des pesticides dans l'air ou d'estimer le potentiel de transport de ces derniers.

### **1.4.3. Rétenion et dégradation des pesticides dans le sol**

La rétenion d'un polluant par le sol et sa persistance sont les deux facteurs fondamentaux qui conditionnent le caractère d'un polluant (Barriuso et al., 1996). Le sol et les sédiments présentent les principaux dépôts de pesticides. Leur dispersion dans d'autres milieux environnementaux dépend de plusieurs paramètres tels les caractéristiques propres au pesticide, les interactions avec les constituants du sol, les conditions climatiques, etc. Le contenu et la composition de la matière organique et de l'argile, les minéraux du sol, le pH et la température du sol jouent un rôle important dans l'adsorption de pesticides dans le sol. Les processus de rétenion des pesticides dans le sol réduisent leur mobilité et diminuent leur transfert vers d'autres compartiments (Auberto et al., 2005). Cependant, la présence de pesticides dans le sol peut entraîner une augmentation de la pollution environnementale dans une région donnée, telles que les régions agricoles. Il est également important de noter que l'adsorption des pesticides dans le sol n'est pas un processus parfaitement efficace. Certains pesticides peuvent présenter une faible affinité d'adsorption ou une mobilité accrue, ce qui peut augmenter leur potentiel de pollution. De plus, si les conditions du sol, telles que le pH, la teneur en matière organique et la composition minérale, ne sont pas favorables à l'adsorption des pesticides, cela peut entraîner une plus grande mobilité des pesticides dans le sol et une plus grande possibilité de contamination.

## **1.5. Relation entre les LMR et les risques**

### **1.5.1. Définition des limites maximales des résidus**

Le guide de la commission du Codex Alimentarius concernant les limites maximales Codex pour les résidus de pesticides donne à ces dernières la définition suivante : « Aux fins du Codex Alimentarius, on entend par Limite Maximale Codex de résidu (LMR) la concentration maximale d'un résidu de pesticide que le Codex Alimentarius recommande d'autoriser légalement dans ou sur un produit alimentaire. La limite est exprimée en parties pondérales de résidu de pesticide par million de parties pondérales de l'aliment ou du produit alimentaire. En général une limite maximale Codex Résidu se rapporte au résidu résultant de l'emploi d'un pesticide dans des circonstances ayant pour objet de protéger l'aliment ou le produit alimentaire contre les attaques de ravageurs en conformité des bonnes pratiques agricoles » (Comission du Codex Alimentarius, 2007)

### **1.5.2. Dose journalière acceptable et appréciation des risques**

L'appréciation des risques dus à l'absorption de faibles quantités de substances étrangères à l'alimentation normale est basée sur des connaissances approfondies de

propriétés de ces substances étrangères et de leurs effets chez l'animal. Le concept de dose journalière acceptable (DJA), expression simplifiée de l'ensemble des données toxicologiques, permet d'apprécier pour chaque produit phytosanitaire le domaine des teneurs en résidus pour lequel la probabilité d'un risque nul paraît assez grande pour être assuré de l'innocuité du résidu.

Elles sont révisables à la lumière d'informations nouvelles, mais concernent toujours une toxicité à long terme induite par une ingestion uniforme et induite par une ingestion de la FAO, en tiennent compte pour évaluer les conditions d'emploi des additifs et des pesticides. Il est certain qu'une ingestion continue était possible pour les résidus d'insecticides organochlorés persistants et accumulables dans la chaîne alimentaire tels que le DDT et les dérivés du cyclodiène qui pouvait se retrouver quotidiennement dans la ration alimentaire lorsque ces produits étaient utilisés en agriculture avant les années 70.

Dans ce cas l'application d'une relation telle que :

$$LMR = \left(100 * \frac{W}{a}\right) * DJA$$

**Où :**

$$LMR = K * DJA$$

**Avec :**

**W** = poids du sujet (Kg)

**a** = consommation quotidienne moyenne (g) par personne, conduisant à une limite directement déduite des données toxicologiques acquises et pouvant servir de référence.

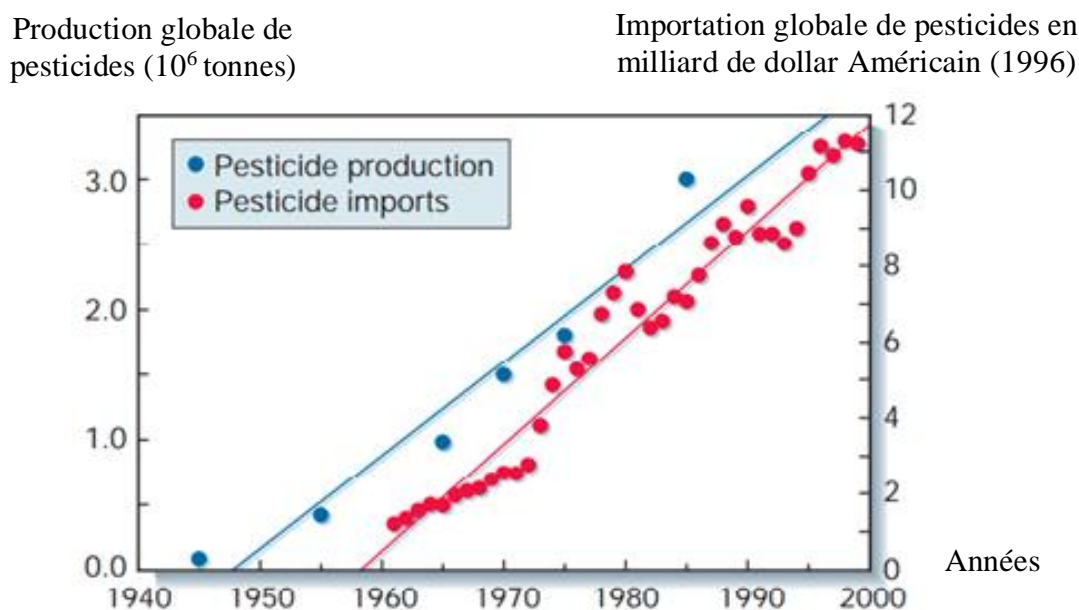
### **1.5.3. Limite de détermination**

Les limites maximales de résidus (LMR) définissent la quantité maximale de résidus de pesticide autorisée dans un produit alimentaire destiné à la consommation humaine ou animale (Malegeant, 1980 In Derache, 1989).

Les résidus de pesticides peuvent être analysés à l'aide de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est utilisée pour les composés volatils (Schachterle et al., 1994). La limite de détermination d'un résidu de pesticide dans une denrée quelconque dépend principalement de deux facteurs : la sensibilité instantanée de l'appareil utilisé et la nature de la matière étudiée (Derache, 1989).

### **1.6. Pesticides dans le monde**

La quantité de pesticides utilisés dans l'agriculture n'a cessé de croître dans le monde ces dernières décennies, ce qui suscite de plus en plus de préoccupations quant à ses impacts sur l'environnement et la santé humaine. La consommation mondiale de produits phytosanitaires a plus que doublé depuis 1990. Cette augmentation de l'utilisation des pesticides s'explique par la demande croissante de denrées alimentaires et la nécessité de maximiser les rendements agricoles. De plus, de nouvelles substances chimiques sont régulièrement introduites sur le marché pour lutter contre les ravageurs et les maladies des cultures.



**Figure 1 :** Production mondiale totale de pesticides et leurs importations dans le monde entre 1940 et 2000 (Tillman et al., 2002).

Le volume des ventes exprimé en données financières, est un bon indicateur de la consommation de pesticides. La Figure 1 reporte la production et les volumes monétaires associés à la vente de pesticides à l'échelle mondiale. La production de pesticides augmente de manière linéaire jusqu'aux années 2000, en se doublant tous les 15 ans.

Le marché mondial des pesticides tend à être stable depuis quelques années et représente actuellement 40,475 milliards de dollars. Les états unis, l'Europe et l'Asie sont les premiers plus grands consommateurs de pesticides dans le monde. En termes de cibles des produits, ce sont les herbicides qui sont les plus utilisés mondialement, ils représentent 46,9% devant les fongicides (25,9%) et les insecticides qui représentent (24,1%) de la consommation mondiale totale (Tillman et al., 2002).

### 1.7. Voies d'exposition aux pesticides

L'exposition aux pesticides peut résulter directement de l'utilisation professionnelle, agricole et ménagère, comme elle peut être transmise indirectement par l'alimentation. Les sources d'expositions sont multiples, puisque les pesticides sont présents dans tous les compartiments de l'environnement : l'air, l'eau, le sol, la flore et la faune et la chaîne alimentaire (Anderson et Meade, 2014).

Les pesticides sont distribués dans le corps humain par la circulation sanguine, ils peuvent être excrétés par l'urine et la peau (Damalas et Eleftherohorinos, 2011).

Le risque de contamination par les pesticides augmente généralement en fonction de la dose (concentration) et des périodes critiques, en plus de la toxicité de la substance en question (Vigneshwaran et al., 2021).

Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme par plusieurs façons dont les plus courantes sont : la voie cutanée, la voie orale, la voie oculaire et la voie respiratoire.

### **1.7.1. Exposition cutanée**

L'exposition cutanée constitue généralement la principale voie d'exposition aux pesticides chez les utilisateurs professionnels (Anderson et Meade, 2014). L'absorption cutanée peut se produire à la suite d'une éclaboussure, d'un déversement ou d'une dérive de pulvérisation, lors du mélange, du chargement, de l'élimination et/ou du nettoyage des pesticides. Les propriétés physicochimiques des pesticides et leur capacité à être absorbées par la peau varient selon les matières actives et formulations utilisées.

L'absorption peut également être influencée par plusieurs facteurs tel que la quantité et la durée de l'exposition, la présence d'autres matières sur la peau, la température et l'humidité, l'utilisation d'un équipement de protection individuelle, les techniques utilisées, etc. (Macfarlane et al., 2013).

La majorité des pesticides peuvent être absorbés via le revêtement cutané, à travers toute la surface corporelle. En général, les formes solides de pesticides (poudres, poussières et granulés) ne sont pas aussi facilement absorbées par la peau et les autres parties du corps comparé aux formulations liquides.

### **1.7.2. Exposition par la voie respiratoire**

Le mode de pénétration pulmonaire cause les intoxications les plus directes et les plus rapides. Suivant cette voie, les pesticides appliqués sous forme d'aérosol, de brouillard ou de gaz peuvent facilement pénétrer dans l'organisme. Le port d'équipement de protection respiratoire approprié peut diminuer les risques d'intoxication par voie respiratoire.

### **1.7.3. Exposition orale**

Les pesticides peuvent être absorbés par voie orale (gastro-intestinale). Cela se produit souvent de façon accidentelle lorsqu'une personne mange un aliment contaminé par des pesticides, ou après avoir manipulé des pesticides sans tenir compte des mesures de sécurité. Cette voie d'intoxication est plus rare chez les utilisateurs de pesticides.

## **1.7.4. Exposition aux pesticides par des sources indirectes**

### **1.7.4.1. Alimentation**

L'alimentation représente la principale source d'exposition aux pesticides de l'ensemble de la population générale.

### **1.7.4.2. Eau potable**

L'eau potable pourrait aussi être une source potentielle d'exposition aux pesticides. Quel que soit le mode de pénétration, les pesticides finissent par atteindre leurs organes cibles par voie essentiellement sanguine, pour pouvoir y exercer leur effet toxique.

## **1.8. Mode d'action des pesticides**

Les herbicides inhibent la photosynthèse ou les réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse des lipides et des acides aminés chez les mauvaises herbes. Les insecticides exercent principalement leurs effets toxiques sur les fonctions vitales des insectes. Ils s'attaquent au système respiratoire et système nerveux. Les fongicides sont capables d'affecter le processus respiratoire des champignons, la biosynthèse des chitines, des mélanines, des stérols et des acides nucléiques. Ils sont aussi capables d'agir sur les microtubules (Hertel et al., 1980 ; Čermák et al. 2020)

## **1.9. Toxicité des pesticides**

Depuis plusieurs années, des milliers de produits chimiques sont répandus dans l'environnement, respirés, bus et avalés, ils finissent dans l'organisme, mais ils ne sont pas testés comme les médicaments le sont aujourd'hui. Aussi, la combinaison de ces substances ou leur « effet cocktail » est aujourd'hui très mal connue et très peu étudiée. Etudier les risques de l'exposition aux pesticides via l'alimentation nécessitent de cumuler toutes les doses et les différentes substances issues de l'ensemble du régime alimentaire, ce qui suppose une très grande masse de données concernant à la fois les résidus dans les aliments et la consommation alimentaire. Ce genre de contrôle doit être réalisé au niveau individuel et pour l'ensemble de la population en général. Dans une situation d'exposition multiple, les produits chimiques individuels peuvent agir indépendamment comme dans une exposition unique, ou un nombre de produits chimiques peut interagir pour moduler les effets de l'exposition multiple totale. Très peu d'articles ont décrit les effets toxiques causés par les interactions entre les mélanges de pesticides. La plupart ont étudié l'effet d'un seul pesticide ce qui n'est pas suffisant pour couvrir les aspects multidisciplinaires liés aux interactions entre pesticides.



Les mécanismes qui sous-tendent la synergie chimique des mélanges restent mal compris (Hernández et al., 2005).

La toxicité des pesticides est aussi aujourd'hui très mal connue parce qu'ils sont toujours commercialisés sous forme de mélanges de différents ingrédients, mais seule une déclaration de leur substance active est réglementée et seule cette substance est évaluée quant à ses effets sur la santé humaine. Les différents ingrédients présents dans les formulations de pesticide peuvent être réglementés différemment, et certains ne sont même pas réglementés car ils sont considérés comme des additifs "inertes", c'est-à-dire dépourvus d'activité pesticide. Cependant, des études ont révélé que ces diluants supposés "inertes" peuvent être plus toxiques que les principes actifs réglementés du pesticide. Une étude réalisée *in vitro* sur 9 pesticides largement utilisés dans le monde a montré que les formulations de pesticides (substance active + adjuvants) sont de 2 à 1000 fois plus toxiques que leur principe actif lorsqu'il est individuellement utilisé sur des lignées cellulaires ou sur des rats (Mesnage et al., 2013).

Des études toxicologiques ont indiqué que certains pesticides tels le glupjosate et le diazinon provoquent des cancers et affectent le système nerveux central, comme ils peuvent interférer avec les fonctions endocriniennes, entraînant ainsi des anomalies métaboliques et reproductives (Mostafalou et al., 2017).

Cependant, les études réglementaires ont souvent échoué à prédire les effets toxiques de ces pesticides sur la base des multiples tests effectués avant l'approbation commerciale. Un certain nombre de pesticides ont ainsi été interdits après des décennies d'utilisation car certains effets sanitaires inattendus sont apparus dans les populations humaines après des accidents de contamination majeurs ou suite à une longue durée d'exposition comme l'ont mis en évidence les études épidémiologiques. Le glyphosate, le malathion et le diazinon ont été classés cancérigènes probables pour l'homme (Groupe 2A). Et les insecticides tétrachlorvinphos et parathion ont quant à eux, été classés cancérigènes possibles pour l'homme (Groupe 2B) (Guyton et al., 2015).

L'association de l'exposition à différentes classes de pesticides, y compris les insecticides, les herbicides et les fongicides, avec l'incidence des cancers a été mise en évidence au cours des cinquante dernières années. Plusieurs études ont ciblé le lien entre les pesticides et les cancers et ont rapporté diverses estimations du risque et ont mis en évidence une association positive entre l'exposition aux pesticides et l'incidence du cancer (Jansson et al. 2006 ; Samanic et al. 2008 ; Meyer et al. 2011 ; Fritschi et al. 2015). Les études les plus pertinentes sont issues d'études humaines basées sur la population.

D'autres champs d'investigation ont aussi été couverts tels la neurotoxicité (Richardson et al. 2014), la reprotoxicité (Bastos et al., 2013 ; Upson et al., 2013), la toxicité métabolique, la toxicité pulmonaire et la toxicité développementale (Salameh et al. 2003 ; Airaksinen et al. 2011).

L'exposition aiguë à des niveaux élevés de certains pesticides a des effets neurotoxiques bien connus, mais la question de savoir si une exposition chronique à des niveaux modérés de pesticides est également neurotoxique est plus controversée. La plupart des études sur l'exposition modérée aux pesticides ont révélé une prévalence accrue des symptômes neurologiques et des changements dans les performances neurocomportementales, reflétant des dysfonctionnements cognitifs et psychomoteurs. Il y a moins de preuves qu'une exposition modérée est liée à des déficits de la fonction sensorielle ou motrice ou de la conduction nerveuse périphérique. La plupart des études se sont concentrées sur les insecticides organophosphorés, bien que certaines aient trouvé des effets neurotoxiques d'autres pesticides, notamment les fongicides, les fumigants et les insecticides organochlorés et carbamates.

L'exposition aux pesticides peut également être associée à un risque accru de maladie de Parkinson. La relation entre la neurotoxicité liée aux pesticides et l'apparition de maladies neurodégénératives fait aujourd'hui partie des principaux problèmes non encore résolus (Priyadarshi et al., 2000 ; Thiruchelvam et al., 2002).

Les troubles de développement, qui se manifestent par différentes caractéristiques tels que des dysfonctionnements cognitifs, mnésiques, verbaux, visuels, comportementaux et moteurs, ont été évalués en association avec l'exposition aux pesticides dans plusieurs études épidémiologiques. Les résultats d'une étude transversale basée sur un questionnaire ont montré que l'exposition maternelle à différents types de pesticides conduit à une altération de la vitesse motrice, de la coordination motrice et de la mémoire visuelle (Harari et al. 2010). Il a également été démontré que l'exposition maternelle et l'exposition professionnelle à des pesticides sont liées, respectivement, à des troubles neurologiques et à des troubles de la mémoire. Des déficits neurocomportementaux ont aussi été observés (Bosma et al. 2000 ; Andersen et al. 2015). Un lien entre exposition aux pesticides et autisme a aussi été établi (Braun et al. 2014).

Certains pesticides (Cyprodinil, Fenbuconazole, Mepanipyrim, Pyrimethanil, Spinosad, Cyproconazole...) pourraient perturber le système endocrinien et provoquer un déséquilibre physiologique même à de très faibles doses, qui peut se manifester par l'obésité, le diabète, la décalcification des os, le cancer du sein, dommages aux glandes thyroïde, etc.

Plusieurs pesticides fréquemment utilisés ont également été identifiés comme cancérogènes connus, probables ou possibles pour l'humain. Les organochlorés ont été particulièrement étudiés. Un nombre important d'études suggère un lien probable entre l'exposition à certains pesticides et la survenue de différentes formes de cancers chez l'humain. Cependant, ces effets sont encore peu documentés et il reste impossible d'affirmer la causalité de cette relation du fait de la particularité de la cancérologie environnementale et de la complexité de l'exposition, de la durée et des mélanges difficiles à identifier.

### **1.10. Règlementation en Algérie**

En Algérie, avant qu'un pesticide puisse être mis sur le marché, il doit passer par un processus d'homologation. Ce processus implique l'analyse d'un dossier complet soumis par le demandeur et l'expertise par les instances compétentes chargées de la réglementation des pesticides.

L'objectif de cette évaluation est de s'assurer que le pesticide est efficace pour son utilisation prévue tout en étant sûr pour la santé humaine et l'environnement, lorsqu'il est utilisé conformément aux recommandations et aux bonnes pratiques agricoles.

Si le pesticide satisfait aux critères de sécurité et d'efficacité établis par les instances compétentes, il peut alors être homologué et autorisé à être commercialisé en Algérie. Des conditions d'utilisation peuvent être imposées, telles que des restrictions sur les doses, les méthodes d'application ou les cultures spécifiques pour lesquelles le pesticide est approuvé.

### **1.11. Homologation des pesticides et mise sur le marché en Algérie**

L'utilisation des pesticides en Algérie est régie par une réglementation nationale définie pour la première fois en 1987 par la loi n° 87-17 du 01-08-1987 relative à la protection phytosanitaire.

Tous les pesticides importés, vendus ou utilisés doivent faire l'objet d'une homologation, qui, au terme de la loi n° 87-17 relative à la protection phytosanitaire, est le processus par lequel l'autorité nationale compétente approuve la vente et l'utilisation d'un pesticide, après examen de données scientifiques complètes montrant que le produit est efficace pour les usages prévus et ne représente pas de risque excessif pour la santé humaine et animale ou pour l'environnement. Viennent par la suite, les décrets exécutifs n° 95-405 du 9 Rajab 1416 correspondant au 2 décembre 1995 relatif au contrôle des produits phytosanitaires à usage agricole et n° 10-69 du 15 Safar 1431 correspondant au 31 janvier 2010 fixant les mesures applicables lors de l'importation et l'exportation des produits phytosanitaires à usage agricole, compléter le cadre réglementaire relatif à l'homologation des pesticides. Selon

l'article 38, paru dans l'index des produits phytosanitaires à usage agricole, du juillet 2015, l'homologation ne peut être accordée que par l'autorité phytosanitaire, sur avis de la commission des produits phytosanitaires à usage agricole, pour les formulations ayant fait l'objet d'examens, d'analyses et essais physiques, chimiques ou biologiques réalisés en laboratoire et en plein champ, par ou sous l'égide de l'autorité phytosanitaire, destiné à :

- ✓ Vérifier leur efficacité et leur innocuité à l'égard des utilisateurs, des cultures, des animaux et de l'environnement dans les conditions d'emploi prescrites ;
- ✓ Déterminer les limites de tolérance de résidus acceptables sur ou dans les produits végétaux.

Selon les textes de la même source, avant d'autoriser leur mise sur le marché, les produits phytosanitaires à usage agricole importés et destinés à la distribution seront soumis à des contrôles et évaluations sur le plan biologique et toxicologique. Ces derniers, consistent à prélever des échantillons pour analyse en laboratoire en vue de vérifier leur conformité aux spécifications pour lesquelles ils ont été homologués.

Quoi qu'il existe plusieurs autres textes relatifs à l'utilisation des pesticides nous nous sommes limités aux dispositifs précités, car, ils s'articulent, tous, autour du même axe.

Les textes réglementaires ainsi que les documents publiés régulièrement par la direction des services agricoles (DSA) et l'institut national de la protection des végétaux (INPV) renseignant sur l'actualité phytosanitaire, ont été conçus pour servir d'instruments techniques de référence et sont destinés à toutes les instances publiques et privées directement ou indirectement concernées par la production, l'importation, la réglementation, la gestion et l'utilisation des pesticides en Algérie.

Les mesures relatives à toute utilisation possible des produits phytosanitaires sont précisées par une réglementation dont la commission des produits phytosanitaires à usage agricole se charge de l'application.

L'INPV est l'acteur principal de la veille phytosanitaire nationale en Algérie, c'est un établissement public à caractère administratif, sous tutelle du Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche. L'INPV travaille en collaboration avec les agriculteurs pour assurer un meilleur contrôle des produits agricoles et la surveillance et la maîtrise des techniques de protection des cultures, ainsi qu'avec d'autres utilisateurs de pesticides, pour leur permettre de répondre à leurs besoins en matière d'information en relation avec l'utilisation des pesticides.

En plus de la réglementation nationale, l'Algérie adhère aux accords internationaux sur les pesticides notamment le Code de conduite de la FAO et les recommandations de l'OMS. Un manuel d'homologation virtuel a été proposé par la FAO, conçu à l'intention des préposés à l'homologation dans les pays en développement, dans le but de faciliter l'évaluation et l'autorisation des pesticides.

### **1.12. Agriculture et utilisation des pesticides en Algérie**

L'utilisation des produits phytopharmaceutiques a fait couler beaucoup d'encre de scientifiques et de non scientifiques. Cependant, il est nécessaire de rappeler que leur utilisation se situe dans le cadre d'une activité économique. Depuis les années 1970, la demande alimentaire a augmenté de façon soutenue, sous l'effet d'une forte croissance démographique, l'urbanisation rapide, l'évolution de mode de vie et la diversification des demandes alimentaires qui, avant, portaient principalement sur les produits essentiels à la survie. Devant cette augmentation des besoins en matières agricoles et se trouvant face à un défi majeur, celui d'atteindre l'autosuffisance alimentaire, l'Algérie a misé sur ses moyens pour intensifier ses systèmes de production en élaborant des plans et des politiques permettant la restructuration et le développement du secteur agricole.

Les années 2000 ont vu la mise en place de plusieurs plans nationaux de développement agricole et programmes de renforcement et d'appui technique aux producteurs qui avaient pour but l'amélioration de la sécurité alimentaire et l'accroissement de la productivité agricole. L'autorité Algérienne a également consacré des investissements considérables dans la recherche, la vulgarisation et la formation pour promouvoir le développement du secteur agricole.

La mise en évidence de la vulnérabilité de l'Algérie en matière de couverture des besoins alimentaires l'a conduite à considérer la souveraineté alimentaire comme un objectif stratégique pour la Nation, lui permettant d'assurer une intensification de la production des biens alimentaires et d'atteindre l'autosuffisance alimentaire. L'intensification de la production agricoles et les mesures de sécurisation liées à son activité ont nécessité le recours aux intrants chimiques, notamment les pesticides qui ont permis de protéger les cultures et limiter les pertes occasionnées par les nuisibles.

L'agriculture constitue un élément majeur de l'économie d'Algérie. L'agriculture Algérienne bénéficie d'une Surface Agricole Utile (S.A.U) de 8,458 millions d'hectares. Les principales productions sont réparties de la façon suivante :

- Céréales : 3 322 kg/ha
- Fruits à pépins et fruits à noyau : 263 kg/ha

- Agrumes : 65 kg/ha
- Maraichage : 330 kg/ha
- Pomme de terre : 138 kg/ha
- Vigne : 74 kg/ha
- Légumes secs : 86 kg/ha
- Figuiers : 47 kg/ha
- Oliviers : 329 kg/ha
- Palmier dattier : 160 kg/ha
- Autres cultures : 407 kg/ha

La production agricole ne cesse d'augmenter depuis le lancement en l'an 2000 du Plan National pour le Développement Agricole et Rural (PNDAR), notamment dans certaines filières comme les céréales, les cultures maraichères, l'arboriculture et la viticulture. Les produits agricoles algériens sont connus pour leur très grande diversité en raison de la variété des zones climatiques et géographiques du pays.

L'Algérie est un grand producteur de céréales, notamment le blé dur, le blé tendre, l'orge et l'avoine. Le pays bénéficie d'une grande diversité de fruits et légumes, tels que les agrumes (citrons, oranges), les pommes, les poires, les raisins, les figues, les dattes, les tomates, les pommes de terre, les carottes, les oignons, les courgettes, etc. La disponibilité et la quantité de ces produits peuvent varier selon les saisons et les régions du pays.

Les rendements élevés des céréales, avec une moyenne de 3 322 kg/ha, témoignent des efforts de développement et des investissements dans ce secteur. Cela contribue à la sécurité alimentaire du pays et à la production de produits de base du régime alimentaire Algérien comme le pain et les pâtes.

**Tableau 2** : Evolution de la productivité du sol entre 2007 et 2011 (DSA, 2016).

<b>Unité : milliers de quintaux</b>	<b>2007/2008</b>	<b>2008/2009</b>	<b>2009/ 2010</b>	<b>2010/2011</b>
<b>Céréales hiver</b>	15336	52522	40016	37265
<b>Blé dur</b>	8131	20010	18090	19275
<b>Blé tendre</b>	2972	9521	7962	6275

<b>Orge</b>	3959	22034	13080	11042
<b>Avoine</b>	267	957	884	673
<b>Céréales été</b>	21	10	5	15
<b>Total céréales</b>	15357	52532	40021	37280
<b>Légumes secs</b>	402	643	723	788
<b>Cultures maraichères</b>	60681	72913	86404	95692
<b>Pomme de terre</b>	21711	26361	33003	38622
<b>Tomates</b>	5592	6410	7182	7716
<b>Oignons</b>	7592	9802	10013	11422
<b>Melon et pastèque</b>	8464	10374	12238	12851
<b>Cultures Industrielles</b>	5288	4000	7777	7237
<b>Tomate industrielle</b>	5126	3823	7619	7059
<b>Tabacs</b>	64	77	75	83
<b>Agrumes</b>	6974	8445	7881	11068
<b>Oranges</b>	5030	6261	5825	8147
<b>Clémentines et mandarines</b>	1498	1572	1518	2180
<b>Arboriculture</b>	18082	217511	23129	28380
<b>Dattes</b>	5528	6007	6447	7249
<b>Figues fraîches</b>	787	838	1238	1202
<b>Olives</b>	2541	4752	3113	6108
<b>Amandes (fraiche + sèches)</b>	395	474	570	506
<b>Autres fruits (noyaux et pépins)</b>	8831	96801	11761	13315

<b>Viticulture</b>	4020	4925	5606	4026
<b>Raisins secs</b>	2	2	2	2
<b>Raisins de table</b>	3396	4195	4743	3499
<b>Raisins de cuves</b>	622	728	861	525
<b>Vins (1000 HL)</b>	94	141	157	91

Il ressort de ce tableau qu'au cours de la période considérée, la productivité a fortement augmenté à l'exception de certains produits des moins consommés comme l'avoine ou les produits destinés à l'industrie alimentaire. Cette hausse de production peut être attribuée à la modernisation et l'amélioration des pratiques agricoles et à l'utilisation importante d'engrais minéraux et au recours massif aux produits phytosanitaires.

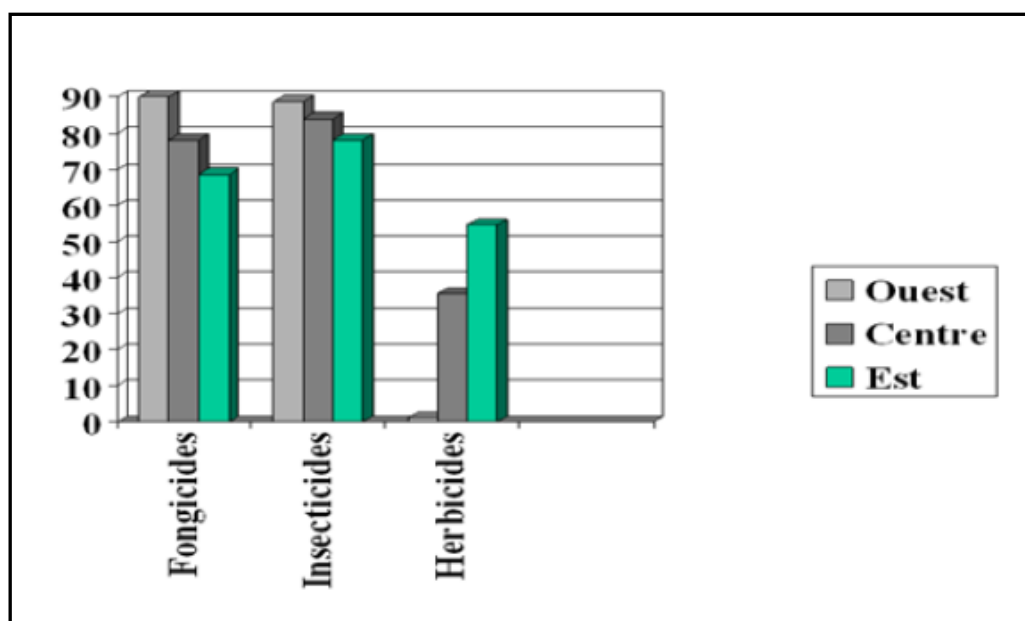
L'Algérie est un pays dont une particularité frappante est sa très grande diversité écologique et climatique. Facteur déterminant pour les progrès de productivité en agroalimentaire et l'intensification de la production agricole. Avec la large gamme d'espèces végétales spontanées ; l'Algérie est une zone géographique à haut potentiel de variabilité génétique. Toutefois, ce privilège naturel et aussi propice au développement des ravageurs et des agents pathogènes des plantes cultivées. Afin de protéger les cultures, accroître les rendements et améliorer la qualité de la production alimentaire, les agriculteurs sont amenés à utiliser des pesticides.

L'Algérie consomme de 6.000 à 10.000 tonnes de pesticides par an (Moussaoui et Tchoulak, 2005). L'appui des pouvoirs publics, en particulier dans le cadre de campagnes d'éradication des ravageurs des cultures a permis que l'industrie chimique se généralise rapidement. Selon l'Index des produits phytosanitaires à usage agricole, publié en 2015, il existe aujourd'hui dans le marché Algérien près de 400 substances actives et plus de 1500 préparations commerciales mises à la disposition des agriculteurs. La répartition de cette consommation est illustrée dans le graphique ci-dessous.



**Figure 2:** Utilisation des pesticides en Algérie (Moussaoui et al., 2005).

En Algérie, les conditions climatiques ainsi que le couvert végétal, qui varient de l'Est en Ouest, jouent un rôle crucial dans la diversité des types de cultures présentes dans chaque région. Ces facteurs ont un impact direct sur l'utilisation des pesticides, qui diffère d'une région à une autre. L'Algérie bénéficie d'une grande diversité climatique, allant des régions méditerranéennes fraîches et humides jusqu'aux régions désertiques chaudes et arides. Cette

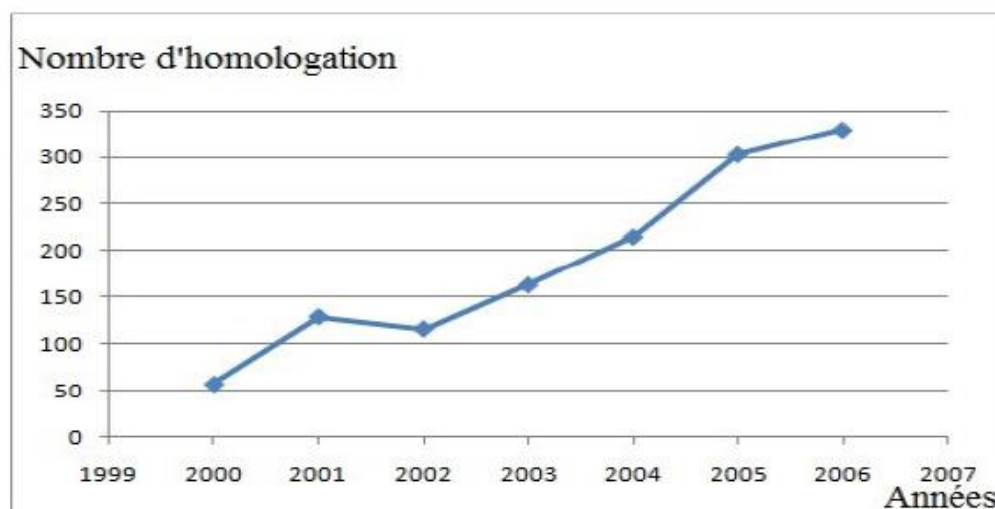


variation climatique entraîne des différences significatives dans les pratiques agricoles et par conséquent dans l'utilisation des pesticides.

Dans la figure 2, on observe des variations dans l'utilisation des pesticides en fonction des différentes régions du pays. L'Est de l'Algérie présente une utilisation relativement moindre des pesticides, leur utilisation est plus répandue dans les régions centrales et de l'Ouest.

Dans les régions de l'Est, où le climat est plus doux et les précipitations plus abondantes, on trouve un couvert végétal dense et une agriculture diversifiée. Les cultures traditionnelles comme les céréales, les légumes et les olives prédominent. En raison de la présence d'une plus grande variété de cultures. Les agriculteurs de l'Est sont particulièrement vigilants pour préserver la santé de leurs cultures et garantir des rendements satisfaisants.

Dans les régions centrales et de l'ouest de l'Algérie, où le climat est plus aride et les précipitations plus limitées, l'utilisation des pesticides est plus répandue. Les cultures dominantes dans ces régions sont souvent moins diversifiées et comprennent principalement des cultures céréalières résistantes à la sécheresse. En raison des conditions plus difficiles et de la présence de parasites spécifiques à ces cultures, les agriculteurs peuvent être amenés à recourir davantage aux pesticides pour protéger leurs récoltes.



**Figure 3 :** Evolution du nombre de décisions d'homologation de pesticides en Algérie (MADR, 2006 in Mokhtari 2011).

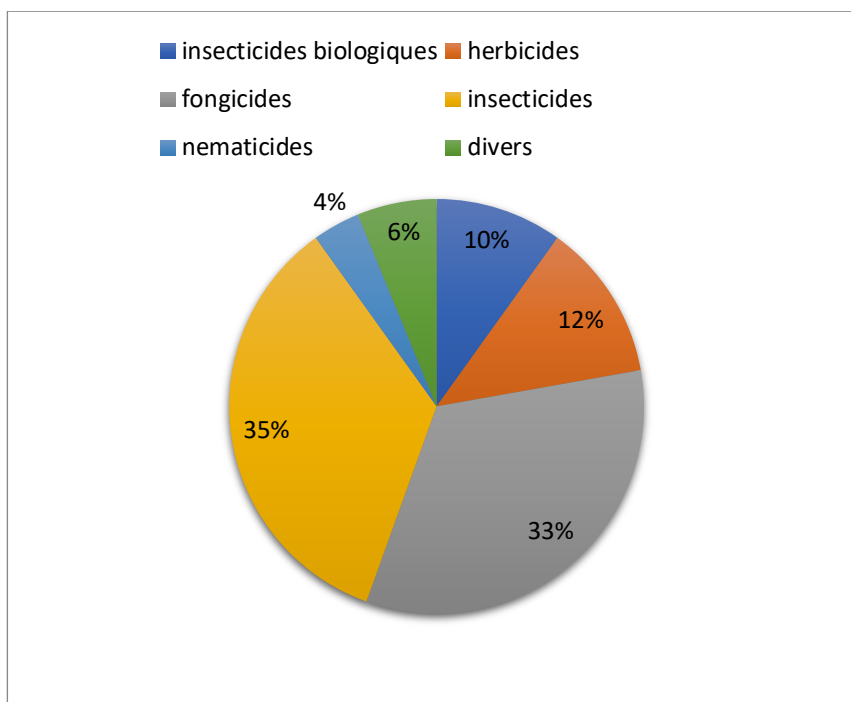
Le graphique représenté dans la Figure 3, présente l'évolution du nombre de pesticides homologués entre 2000 et 2006. Au cours de cette période, on observe une nette augmentation du nombre de pesticides homologués, avec une moyenne d'environ 50 nouveaux pesticides chaque année.

La croissance constante du nombre de pesticides homologués indique une tendance à la hausse de l'utilisation de ces produits chimiques dans l'agriculture en Algérie. Cela peut être dû à divers facteurs, tels que l'augmentation des besoins en matière de protection des cultures, l'introduction de nouveaux produits sur le marché ou encore l'évolution des pratiques agricoles.

Il convient de noter qu'outre les enquêtes des chercheurs recueillant quelques données sur l'utilisation de pesticides dans certaines régions de l'Algérie, il existe très peu d'informations relatives à l'utilisation de ces produits dans la littérature quantitative. En 2015, l'INPV a édité l'Index des produits phytosanitaires à usage agricole, celui-ci reprenant les grands principes de la protection des plantes. Il constitue une référence en matière de connaissance et d'utilisation de produits phytosanitaires à usage agricole en Algérie. Cet index regroupe l'ensemble des textes régissant les usages relatifs aux pesticides et présente l'ensemble des produits phytosanitaires à usage agricole homologués et commercialisés en Algérie par catégorie d'usage avec des indications sur les caractéristiques qui ont prévalu à leurs homologations.

Face aux préoccupations environnementales et de santé publique, le gouvernement algérien a manifesté une volonté importante de réduire l'utilisation des pesticides. Depuis 2008, le Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche encourage les agriculteurs à adopter des méthodes de lutte biologique. Des mesures d'aide et d'accompagnement ont été mises en place pour soutenir cette transition vers des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement. Cette démarche vise à promouvoir l'utilisation de moyens de lutte biologique tels que les auxiliaires de culture, les substances naturelles et d'autres techniques alternatives, afin de réduire la dépendance aux pesticides chimiques.

L'engagement de l'État en faveur de la réduction de l'utilisation des pesticides reflète la prise de conscience croissante des problèmes environnementaux et de santé liés à ces produits. Il démontre également la volonté de soutenir les agriculteurs dans leur transition vers des pratiques plus durables, favorisant ainsi la préservation de l'environnement et la protection de la santé publique.



**Figure 4 :** Spectre d'utilisation de pesticides durant l'année 2009 (Kheddam-Benadjal, 2012).

Selon la Figure 4, les insecticides sont les traitements les plus couramment utilisés en Algérie, suivis des fongicides. Les herbicides et nématicides, en revanche, représentent une part relativement faible de l'utilisation totale de pesticides, avec respectivement 12,30 % et 3,70 %.

Il convient de noter que chaque catégorie de pesticides fait recours à différents groupes chimiques pour atteindre leurs objectifs spécifiques. Les insecticides, qui sont les plus utilisés, peuvent être composés de divers groupes chimiques tels que les pyréthriinoïdes, les organophosphorés, les carbamates, les néonicotinoïdes, etc. Ces substances sont spécifiquement conçues pour cibler et contrôler les populations d'insectes nuisibles dans les cultures.

Les fongicides, qui occupent la deuxième place en termes d'utilisation, comprennent également différents groupes chimiques, tels que les triazoles, les strobilurines, les dithiocarbamates, les benzimidazoles, etc. Ces produits sont utilisés pour prévenir et traiter les infections fongiques dans les cultures et préserver leur santé.

En ce qui concerne les herbicides, leur utilisation est relativement moins répandue, représentant seulement 12,30 % de l'utilisation totale de pesticides. Les herbicides peuvent appartenir à des groupes chimiques tels que les glyphosates, les triazines, les sulfonyleurées,

les phénoxyacétates, etc. Ils sont utilisés pour contrôler la croissance des mauvaises herbes et maintenir la propreté des cultures.

# **CHAPITRE II**

---

## **MATERIEL & METHODES**

## **II. Chapitre II : Matériel et méthodes**

### **1. Enquête et recueil d'information**

L'utilisation de pesticides en agriculture contribue de manière importante à l'augmentation des rendements agricoles. Face à la demande alimentaire de plus en plus croissante, les producteurs cherchent des moyens qui leur permettent d'accroître leur production agricole et améliorer leur revenu financier. Pour y parvenir, ils utilisent des intrants chimiques, dont les pesticides, qui s'avèrent être la principale solution pour lutter contre les agresseurs de cultures. Ceux-ci facilement accessibles, d'une efficacité démontrée, leur utilisation est fortement recommandée et encouragée par l'état.

Cependant, des effets secondaires peuvent accompagner cette utilisation de pesticides : la toxicité pour l'agriculteur, la présence de résidus de pesticides dans l'alimentation, le risque de développement de résistance chez le pathogènes ainsi que les retombées négatives importantes sur l'environnement.

Considérant ce qui précède, il nous a semblé utile d'examiner et d'étudier l'exposition des agriculteurs et de la population générale aux pesticides apportés par les systèmes de culture. Pour y parvenir, une étude a été élaborée à travers plusieurs enquêtes réalisées auprès des agriculteurs et des vendeurs de pesticides dans la Wilaya de Jijel.

L'objectif principal de l'étude est d'une part, l'appréciation des risques en lien avec l'exposition professionnelle des agriculteurs aux pesticides et l'exposition de l'ensemble de la population en général qui se fait essentiellement via la consommation des produits agricoles locaux et d'autre part, le recensement des pesticides destinés à la protection phytosanitaires des cultures.

#### **1.1. Méthodologie de travail**

La démarche que nous avons adoptée consiste à collecter les informations, relatives à l'utilisation des pesticides, qui nous permettent d'atteindre les objectifs suivants :

- Estimer les risques liés aux pratiques phytosanitaires, encourus par les agriculteurs et les consommateurs ;
- Etablir la liste des pesticides les plus utilisés ;
- Etablir la liste des produits agricoles les plus consommés afin de se rapprocher le plus de l'exposition réelle des consommateurs.

Pour ce faire, une étude a été menée. La mise en place de cette dernière a nécessité l'établissement de plusieurs enquêtes.

### **1.1.1. L'enquête auprès des organismes d'agriculture de la wilaya de Jijel**

L'établissement d'enquêtes auprès des organismes d'agriculture (DSA) est une étape importante permettant de faciliter la prise de décisions quant aux sites à étudier.

Les données et les informations recueillies auprès des services agricoles de la Wilaya de Jijel nous ont permis de choisir les régions d'étude et d'avoir de plus amples connaissances sur leurs activités agricoles.

#### **▪ Choix de la zone d'étude**

Le choix de la zone d'étude s'est basé sur plusieurs éléments tels, le type de culture et la représentativité ; et en tenant compte de deux critères importants : la diversité des activités agricoles et le niveau de désenclavement des régions. Ainsi, plusieurs exploitations ont été choisies comme cible d'enquête.

### **1.1.2. L'enquête auprès des agriculteurs**

L'ambiguïté sur la dangerosité des pesticides, la banalisation et l'augmentation de leur usage continuaient d'être largement entretenues auprès des agriculteurs qui veulent à tout prix protéger leurs cultures et augmenter les rendements.

La disposition d'éléments d'information concernant l'agriculteur dans son contexte professionnel nous permettra de mieux cerner l'enquête. Sur les sites d'étude, une enquête descriptive a été réalisée auprès des agriculteurs afin de recueillir des informations concernant l'utilisation des produits phytopharmaceutiques.

Cette enquête s'est particulièrement intéressée à :

- Identifier les formulations de pesticides utilisés dans les zones d'étude ;
- Identifier les cultures les plus réceptrices de pesticides ;
- Identifier les sources d'approvisionnement en pesticides ;
- Pouvoir tirer une conclusion sur l'état de l'exposition professionnelle et des consommateurs.
- L'élaboration d'un questionnaire permettant de recueillir les informations répondant aux objectifs de l'étude.



### **1.1.3. L'enquête auprès des revendeurs de pesticides**

Une tierce enquête a été menée auprès des revendeurs de pesticides. La collecte des données s'est principalement axée sur l'identification des pesticides utilisés en agriculture dans la Wilaya de Jijel.

Les entretiens ont été menés auprès de 10 revendeurs installés dans la zone d'étude. Ils reposent sur des discussions tenues en lieu de travail.

Les informations collectées concernent principalement les thèmes suivants :

- Les pesticides les plus vendus (noms commerciaux, familles chimiques) ;
- Les matières actives correspondantes aux pesticides les plus vendus ;
- Les pesticides utilisés sur une même culture ;
- L'efficacité des produits.

## **1.2. Echantillonnages et déroulement de l'enquête**

L'étude s'est déroulée entre le 1 Janvier 2012 et le 31 janvier 2015. Un groupe hétérogène d'agriculteurs a été sélectionné de façon à obtenir un état des lieux représentatif de l'ensemble des agriculteurs de la Wilaya de Jijel. 40 agriculteurs ont été interrogés dans chaque zone d'étude, les principaux thèmes abordés étaient :

- Les dosages ;
- Les pesticides les plus utilisés ;
- Les pesticides simultanément utilisés lors d'un épandage sur les mêmes cultures ;
- Les cultures plus grandes réceptrices de pesticides.

# **ETUDE *IN VITRO***

---

## 2. Etude *in vitro*

### 2.1. Matériel et Méthodes

Le but de cette étude *in vitro* était d'élucider les mécanismes d'action potentiels ainsi que de déterminer l'activité des pesticides avant les essais *in vivo*. Bien que les approches actuelles d'évaluation des risques reposent principalement sur des pesticides individuels, l'exposition de l'homme à ces produits chimiques concerne principalement des mélanges complexes et variés.

L'exposition à des mélanges de pesticides, même à faible dose, constitue un risque majeur pour la santé de l'homme. L'étude de l'effet des mélanges est une problématique complexe, il est difficile de prévoir les interactions des substances chimiques dans les mélanges et de connaître leurs modes d'action possibles, notamment leurs effets à long terme.

L'étude de la cytotoxicité consiste principalement en l'évaluation de la viabilité cellulaire. Elle permet la détermination *in vitro* de la toxicité des pesticides sur les cellules. Cette étude a été réalisée dans le laboratoire de culture cellulaire de la faculté de médecine et de pharmacie de l'Université de Rouen Normandie en France, ainsi que le laboratoire de cytotoxicité et génotoxicité de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Gaziantep en Turquie.

#### 2.1.1. Test de cytotoxicité (le test au MTT)

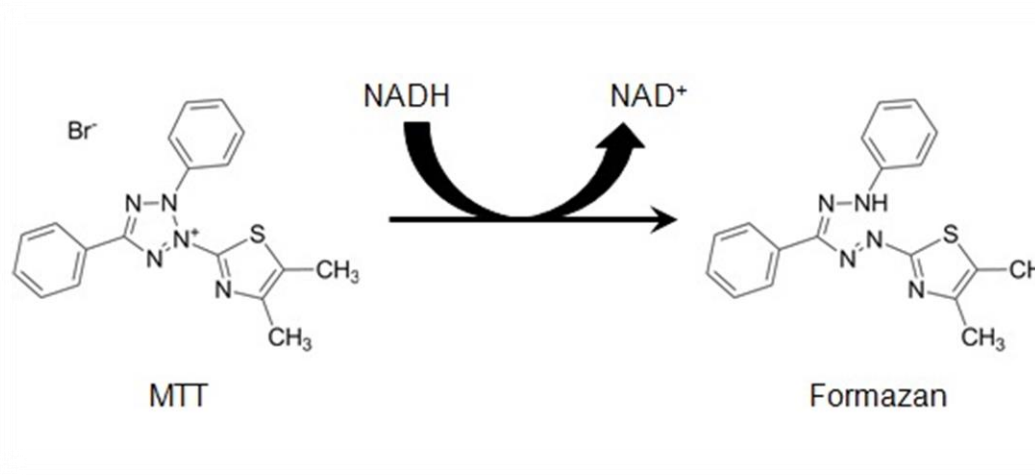
Le test au MTT est une méthode colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité des cellules au sein d'un échantillon. Il a été décrit pour la première fois par (Mosmann, 1983).

Le test au MTT est considéré comme un indicateur fiable est sensible de l'activité métabolique cellulaire (Park et *al.*, 2009 ; Murthy et Pathak, 2016). Le MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium) est un substrat chromogène réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes.

Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de tétrazolium qui est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules métaboliquement actives. Si un composé est cytotoxique, des dommages seront induits aux cellules, ce qui diminue la transformation par la succinate déshydrogénase et, par conséquent, la précipitation. La quantité de cristaux de formazon formés est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Les cellules viables ayant une fonction mitochondriale intacte sont colorées avec une couleur violette, tandis que les cellules mortes ou les cellules avec une fonction mitochondriale altérée ne prennent aucune coloration.

Les tests de cytotoxicité sont largement utilisés dans les études de toxicologie *in vitro*. Le test au MTT est l'un des plus utilisés pour la détection de la cytotoxicité ou de la viabilité cellulaire après exposition à des substances toxiques. (Fotakis et Timbrell, 2006).

L'activité mitochondriale est un marqueur de cytotoxicité aiguë qui montre des signes précoces de lésions cellulaires (Konsoula et Barile, 2005). Dans notre travail, ce test nous a permis de déterminer et d'évaluer la viabilité cellulaire dans les différentes suspensions cellulaires étudiées.



**Figure 5 :** Formules chimiques du sel de tétrazolium MTT et de sa forme réduite, le sel de Formazan.

### 2.1.2. Matériel biologique

Les souches utilisées dans cette étude sont issues de l'*American Type Culture Collection (ATCC)*. Une banque cellulaire renommée spécialisée dans l'acquisition, l'authentification, la production, la conservation et la distribution de micro-organismes et de lignées cellulaires. L'ATCC est reconnue pour son rôle crucial dans la fourniture de ressources biologiques fiables et de haute qualité pour la recherche scientifique.

### 2.1.2.1. Choix du modèle d'étude

Différentes lignées cellulaires ont été sélectionnées comme modèles d'étude pour évaluer la cytotoxicité des pesticides. Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude ont été cultivées dans le laboratoire de culture cellulaire de la faculté de médecine et de pharmacie de l'université de Rouen Normandie, France et le laboratoire de génotoxicité et de cytotoxicité de l'université de Gaziantep, Turquie. Tous les tests de l'étude *in vitro* ont été réalisés dans ces deux laboratoires.

- La lignée A549 : Cette lignée cellulaire est dérivée d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient de race blanche âgé de 58 ans. Elle est couramment utilisée comme modèle *in vitro* pour étudier les maladies pulmonaires, y compris le cancer du poumon. La lignée A549 offre une opportunité de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus pathologiques et peut aider à développer de nouvelles thérapies ciblées.
- La lignée HT29 : Cette lignée cellulaire est dérivée d'un adénocarcinome humain du côlon et a été établie en 1964 à partir d'une patiente atteinte de cancer. Elle est largement utilisée comme modèle *in vitro* pour les études sur les cancers colorectaux. Ce modèle présente la particularité de pouvoir exprimer les caractéristiques des cellules intestinales saines par différenciation, ce qui en fait un outil précieux pour comprendre les processus de différenciation cellulaire et l'impact des traitements sur les cellules du côlon.
- Les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) : Ces cellules sont isolées à partir de l'endothélium de la veine ombilicale du cordon ombilical humain. Elles représentent un modèle *in vitro* d'endothélium vasculaire sain. Les HUVEC sont utilisées pour étudier le comportement des cellules endothéliales non cancéreuses, notamment leur interaction avec d'autres types cellulaires, leur rôle dans l'angiogenèse et la réponse inflammatoire.

Toutes les lignées cellulaires ont été conservées dans de l'azote liquide pour assurer leur stabilité et leur intégrité génétique. Avant le début des tests, chaque lignée a été cultivée pendant une période de deux à trois semaines afin de permettre leur adaptation à

l'environnement de culture et d'obtenir une quantité suffisante de cellules pour les expériences à mener.

### **2.1.2.2. Milieux de culture**

Les nutriments présents dans le milieu de culture permettent la croissance et la multiplication des cellules en culture. Les antibiotiques sont utilisés, quant à eux, pour faire face aux apparitions possibles d'agents contaminants.

Les cellules HT29, HUVEC et A549 ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Pan Biotech) contenant 10% de Sérum de Veau Foetal (SVF) (Pan Biotech), 1% de pénicilline-streptomycine (Pan Biotech) et 1% de L-glutamine (Pan Biotech) (Wätjen et Beyersmann, 2004).

### **2.1.2.3. Ensemencement des cellules**

Les cellules ont été cultivées en monocouche dans des flasques de culture cellulaire et maintenues dans un incubateur humide à 37°C, avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence des cellules. Le tapis cellulaire a fait l'objet d'une observation régulière au microscope (surveillance de la confluence et de l'aspect morphologique des cellules). Lorsque les lignées cellulaires atteignaient la confluence de 80%, le milieu de culture devrait être aspiré du flacon et éliminé. Un rinçage délicat à l'aide de 3 à 4 ml de PBS (Pan Biotech) est ensuite effectué et 0,5 ml de solution de trypsine-EDTA à 0,05% (Sigma) est ajouté dans le but de permettre le détachement des cellules adhérentes à la surface du flacon. A ce stade, l'ajout du milieu de culture est nécessaire pour stopper l'effet de la trypsine. Les cellules sont ensuite incubées dans les mêmes conditions décrites précédemment et les milieux de culture sont remplacés par du milieu frais tous les trois jours. Le milieu de croissance a été aspiré du flacon et éliminé lorsque les lignées cellulaires A549 et HUVEC présentaient une confluence de 80%.

Les cellules ont par la suite été rincées par la trypsine, puis, 2 ml du milieu de croissance ont été ajoutés afin d'inhiber l'effet de cette dernière. Après centrifugation à 800 tr / min pendant 5 min, le surnageant a été aspiré et le culot cellulaire restant a été dissous dans 2 ml de milieu de culture puis introduit dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup>, contenant 10 ml de milieu de culture et de nouveau incubés à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Ceci est essentiel pour créer une atmosphère similaire à celle de la réalité afin de garantir un bon développement des cultures. Le CO<sub>2</sub> sert aussi à tamponner le milieu et à empêcher les écarts de pH.

### 2.1.2.4. Comptage des cellules

Pour les cellules HT29, la numération cellulaire a été réalisée directement par comptage au microscope à l'aide d'un hématimètre. Nous avons utilisé la Cellule de Malassez, qui est constituée d'une lame et d'une lamelle sur lesquelles sont gravés 100 rectangles dont 25 sont subdivisés en 20 petits carrés permettant de faciliter le comptage. Le comptage s'est effectué après coloration des cellules mortes par le bleu trypan, afin d'éviter de les prendre en compte lors de la numération. Pour les cellules A549 et les cellules HUVEC le comptage s'est effectué à l'aide d'un hémocytomètre. 10 ul ont été prélevés de la suspension cellulaire obtenue par trypsinisation, ajoutés à un tube Eppendorf contenant 0,5% de bleu trypan (Roche) puis soigneusement mélangé volume à volume. A l'aide d'une pipette, 10 ul ont été chargés dans la plaque de Thoma, en laissant le liquide pénétrer entre la plaque et le couvre-objet depuis le côté, par capillarité. Le comptage s'est effectué sous un microscope à phase inversée.

Dans les deux types de comptage, lors du calcul final du nombre de cellules, le nombre de cellules obtenu a été multiplié par le facteur de dilution.

### 2.1.3. Traitement des cellules

Afin d'évaluer l'effet toxique potentiel des pesticides ainsi que leurs mélanges et de déterminer leurs intervalles de cytotoxicité, nous avons utilisé le test de cytotoxicité (MTT). L'effet de la variation des concentrations de pesticides sur la viabilité de trois lignées cellulaires différentes a été évalué.

Pour les cellules A549 et HUVEC, nous avons testé l'effet de variations de concentrations de pesticides, en utilisant trois mélanges équimolaires différents. Les mélanges étaient les suivants :

- Mélange 4 (M4) : composé de chlorpyrifos, spiromesifene, cyperméthrine, bromuconazole, abamectin et methomyl.
- Mélange 5 (M5) : composé de M4 + spiroadiclofen et deltaméthrine.
- Mélange 6 (M6) : composé de M5 + indoxacarbe.
- La dose utilisée était 1 mg /kg/5 L de sang.

Pour le traitement des cellules HT29, nous avons utilisé les pesticides suivants

- Lambda cyalothrine : insecticidepyréthroïde
- Propoxur : insecticide carbamate

- Cyperméthrine : insecticide pyréthrinaïde
- Chlorpyrifos : insecticide organophosphaté

Les pesticides ont été utilisés individuellement, en mélange deux à deux et en mélange de quatre pesticides.

Les pesticides utilisés seuls sont :

- Le chlorpyrifos
- La cyperméthrine
- La lambda cyalothrine
- Le propoxur

Les mélanges utilisés dans cette étude sont :

- Chlorpyrifos + Propoxur
- Chlorpyrifos + Cyperméthrine
- Propoxur + cyperméthrine

Pour la lignée cellulaire HT29, tous les pesticides ont été utilisés avec les doses 1 mg, 0,4 mg, 0,2 mg et 0,02 mg (par Kg par 5 L de sang). Nous avons étudié l'effet cytotoxique de nos pesticides sur le taux de viabilité cellulaire par le test colorimétrique MTT.

Les cellules ont été inoculées à la densité de  $5 \cdot 10^4$  cellules par puits dans des plaques transparentes 96 puits avec 100  $\mu$ l de DMEM par puits. Deux rangées de la plaque multi-puits ont été réservées pour le contrôle négatif et le blanc, et de ce fait, la première contenait les cellules dans le milieu de culture sans aucun ajout de traitement et la seconde ne contenait que le milieu de culture.

Après une incubation de 24 heures, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par un milieu frais. Le traitement adéquat correspondant à chaque concentration ou mélange différent dilué dans 100  $\mu$ l du DMSO (1% v/v) a été ajouté à chaque puits et les cellules ont été incubées pendant 48 heures à 37 °C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

La première rangée de la plaque multi-puits a été utilisée comme blanc et de ce fait ne contenait que le milieu de culture. Deux autres rangées ont servi de témoins DMSO et de contrôle qui ne contenait que les cellules dans le milieu de culture sans aucun traitement ajouté. Huit puits indépendants ont été utilisés pour chaque traitement.

Une solution de MTT (5mg/ml) a été préparée dans du tampon PBS (pH = 7,2), puis filtrée et conservée au frais à 4°C. Après 48 h, 40  $\mu$ l de MTT ont été ajoutés aux puits



contenant les cellules HUVEC, HT29 et A549 préalablement traités par les pesticides. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 4h à 37°C. (Wätjen et Beyersmann, 2004).

Ce test est basé sur la conversion des sels de tétrazolium MTT en formazan. Le produit formazan a une faible solubilité aqueuse et est présent sous forme de cristaux pourpres. Pour assurer la dissolution du formazan résultant et permettre la quantification appropriée de la formation du produit, un tampon de solubilisation a été préparé.

Le tampon de solubilisation SDS 10% est composé de :

- 25 g de dodécylsulfate de sodium
- 250 ml d'eau distillée stérile
- 207,5 ul de HCl à 37%

80 ul du tampon SDS à 10% ont été ajoutés à tous les puits et les cellules ont été incubées pendant 18 heures à 37° C dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>. A la fin de la période d'incubation, Les plaques ont été agitées pendant environ 30 minutes.

La densité optique (DO) a été mesurée à 570 nm sur le lecteur de microplaque (ELISA, Titertekmultiscan), afin d'évaluer la croissance cellulaire.

La DO proportionnelle au nombre de cellules vivantes a permis de calculer le pourcentage de croissance cellulaire pour chaque puits traité.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au contrôle.

La formule utilisée pour calculer le pourcentage de prolifération est la suivante (Barnabe et al., 2017) :

$$\% \text{ Cellules viables} = (\text{Absorbance de l'échantillon} / \text{Absorbance du témoin}) \times 100$$

### 2.2. Etude statistique

Pour le test de cytotoxicité, nous avons effectué des expériences en triplicata (trois répétitions indépendantes) afin d'obtenir des résultats fiables. Les traitements expérimentaux pour chaque test ont été exprimés en pourcentage par rapport au témoin non exposé, avec des valeurs de contrôle fixées à 100%. Afin de déterminer les différences significatives entre les groupes, nous avons réalisé des analyses statistiques en utilisant l'analyse de variance à un facteur (ANOVA), suivie du test de Dunnett.

En utilisant une méthodologie rigoureuse avec des répétitions et des comparaisons statistiques appropriées, nous avons pu évaluer de manière précise l'effet cytotoxique des traitements et déterminer les variations significatives par rapport aux témoins non exposés.

# **ETUDE *IN VIVO***

---

### **3. Etude *in vivo***

#### **3.1. Matériels et méthodes**

L'utilisation des rats Wistar dans le laboratoire est une pratique courante dans de nombreux domaines de recherche, tels que la toxicologie, la pharmacologie et la neurobiologie. Les rats Wistar sont choisis pour leur comportement docile, leur taille moyenne et leur capacité à s'adapter facilement aux conditions de vie en laboratoire.

L'élevage des rats Wistar en laboratoire nécessite de disposer d'un environnement contrôlé et sécurisé. Les cages doivent être suffisamment grandes pour permettre aux rats de se déplacer librement et contenir de la nourriture et de l'eau en quantité suffisante. Il est également important de maintenir une température constante et un éclairage régulier pour éviter toute perturbation du rythme circadien des rats et garantir des résultats fiables.

##### **3.1.1. Animaux d'expérimentation**

Notre étude a été réalisée sur 24 rats mâles adultes de souche Wistar (*Rattus norvegicus*), d'un poids corporel allant de 180 à 200 g. Les animaux ont été fournis par l'Institut Pasteur (Alger, Algérie). Les rats étaient logés dans des cages dans une animalerie dans des conditions environnementales standard à température ambiante de  $22 \pm 2$  °C, un cycle de lumière de 12h jour/nuit et une humidité relative minimale de 40 %. Les rats ont été soumis à un régime standard ONAB (voir la composition en annexe) ; et recevaient l'eau et la nourriture *ad libitum* renouvelées une fois par jour.

Les animaux étaient acclimatés pendant 1 semaine avant les expériences et ont été divisés en 4 groupes de 6 chacun. Pendant les expériences, toutes les directives éthiques pour les soins et l'utilisation du laboratoire ont été suivies attentivement, le plus grand soin a été pris pour minimiser la souffrance des animaux et le nombre de rats a été limité au minimum.

##### **3.1.2. Traitement**

Les rats ont été répartis au hasard en quatre groupes, chacun comprenant six animaux. Le groupe I a servi de témoin. Les trois autres groupes II, III et IV ont été utilisés pour représenter trois catégories de consommateurs définies selon leur consommation quotidienne de fruits et légumes.

Tous les groupes traités ont reçu la dose journalière admissible (DJA) de chaque pesticide du mélange correspondant, une fois par jour, pendant une période de 120 jours, en utilisant de l'huile de maïs comme véhicule. La concentration des pesticides a été calculée en prenant en compte le pourcentage des principes actifs présents dans les formulations

commerciales de pesticides, en ajustant également en fonction du poids des rats concernés. Chaque semaine, les rats ont été pesés et observés afin de détecter tout signe de toxicité pendant la durée de l'expérience. Les substances testées ont été administrées par voie orale à l'aide d'une sonde intragastrique tout au long de la période expérimentale.

Groupe I : représente le groupe témoin. Ce groupe a reçu l'huile de maïs par gavage gastrique.

Groupe II : représente les consommateurs du plat principal uniquement, ce groupe a reçu le Mélange 1 : composé de chlorpyrifos (0,001 mg/Kg de poids corporel/jour), thiaclopride (0,01 mg/Kg/jour), spiromésifène (0,03 mg/Kg/jour), cyperméthrine (0,04 mg/Kg/jour), bromuconazole (0,01 mg/Kg/jour), abamectine (0,0025 mg/Kg/jour), chlorothalonil (0,0015 mg/Kg/jour), méthomyl (0,0025 mg/Kg/jour) et spirotétramate (0,05 mg/Kg/jour) en formulation, à des concentrations correspondant aux DJAs des principes actifs, une fois par jour, pendant 120 jours consécutifs.

Groupe III : représente les consommateurs prenant le plat principal et la laitue ; ce groupe a reçu le Mélange 2 = Mélange1 + spirodiclofène (0,015 mg/Kg/jour) et une formulation de deltaméthrine (0,01 mg/kg /jour) à des concentrations correspondant aux DJAs des principes actifs de tous les pesticides utilisés, une fois par jour, pendant 120 jours.

Groupe IV : représente les consommateurs prenant le plat principal, la laitue et les fruits ; ce groupe a reçu le Mélange 3 = Mélange 2 + une formulation d'indoxacarbe (0,006 mg/Kg/jour) à des concentrations correspondant aux DJAs de principes actifs, une fois par jour, pendant 120 jours.

### **3.1.3. Préparation de l'homogénat des tissus**

Les rats ont été sacrifiés 24 heures après le dernier traitement, sous une légère anesthésie à l'éther. Le sang a été prélevé pour préparer le sérum. Les foies et les reins ont été rapidement retirés, rincés avec une solution saline isotonique, séchés à l'aide de papier filtre et pesés. Ensuite, des homogénats de tissus à une concentration de 10 % (poids/volume) ont été préparés en utilisant un tampon (0,1 M Tris-HCl, pH 7,4), puis centrifugés à  $3000 \times g$  pendant 20 minutes à 4 °C. Les surnageants ont ensuite été collectés pour la détermination des biomarqueurs du stress oxydatif : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion (GSH) et protéines totales. Les indices relatifs au foie et aux reins ont été calculés selon la formule suivante :

**Poids relatif des organes (g/100 g) = [Poids total des organes (g) / Poids corporel final (g)] × 100.**

Toutes les analyses ont été effectuées avec des échantillons fraîchement isolés.

### **3.1.4. Paramètres biochimiques**

Des échantillons de sérum ont été collectés pour permettre d'étudier la concentration de protéines totales, créatinine, cholestérol, triglycérides, lipoprotéines de haute densité (HDL), lipoprotéines de basse densité (LDL) et activités du sérum enzymatique de l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT). Les taux sériques d'urée et de créatinine étaient également mesurés. Les paramètres ont été déterminés, à l'aide du spectrophotomètre, dans des échantillons de sérum en utilisant des kits disponibles dans le commerce et suivant les instructions du fabricant.

- Les teneurs en protéines ont été dosées par une méthode colorimétrique de (Bradford et al., 1976) en utilisant de l'albumine de sérum de bovin comme standard et le Bleu Brillant de Coomassie G250 (BBC) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH<sub>2</sub>) des protéines pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide. La concentration des protéines qui est mesurée à 595nm.
- En milieu alcalin, la créatinine forme avec le picrate, un complexe coloré en jaune orange. La vitesse de développement de la coloration est mesurée à une longueur d'onde égale à 500 nm (Kits SPINREACT, Ctra. Santa Coloma, Espagne).
- Le dosage du cholestérol total plasmatique a été réalisé par une méthode enzymatique (Kits SPINREACT, Ctra. Santa Coloma, Espagne), sur le plasma des rats. La réaction consiste à libérer le cholestérol de la liaison ester par la cholestérol-estérase, et d'oxyder le cholestérol libre non estérifié par la cholestérol-oxydase. L'indicateur est une quinonéimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminophénazone, sous l'action catalytique de la peroxydase. La concentration en quinonéimine colorée est mesurée à 505 nm.
- Les triglycérides sont dosés après hydrolyse enzymatique par des lipases en glycérol et acides gras libres. Le taux des triglycérides est déterminé à une longueur d'ondes de 505 nm. La concentration en quinonéimine est proportionnelle à la concentration totale en triglycérides.

- Le dosage des lipoprotéines de haute densité (HDL) plasmatiques a été réalisé par méthode enzymatique après précipitation des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et de basse densité (LDL) selon le protocole donné par le Kit SPINREACT (Ctra. Santa Coloma, Espagne). Le taux de HDL cholestérol est déterminé à une longueur d'ondes de 505 nm. Le taux de LDL cholestérol est calculé selon la relation suivante :  
$$\text{LDL-C} = \text{Cholestérol total} - \text{HDL-C} - (\text{TG}/5).$$

### 3.1.5. Biomarqueurs du stress oxydatif dans le foie et les reins

La peroxydation lipidique (LPO) a été déterminée par mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans les homogénats des tissus selon la méthode d'Uchiyama et Mihara (1978). La teneur en TBARS a été mesurée par spectrophotométrie à 532 nm.

La détermination de la superoxyde dismutase (SOD) dans le tissu a été réalisée selon Misra et Fridovitch (1977). Les mélanges réactionnels ont été mélangés par inversion et suivi d'un ajout du surnageant d'homogénats de tissus (0,1 ml, 1 :10 poids/volume). Les changements d'absorbance des échantillons ont été enregistré à 560 nm. L'activité a été exprimée comme la quantité d'enzyme qui inhibe l'oxydation de l'épinéphrine 50 %, ce qui équivaut à 1 U par mg de protéine.

L'homogénat de l'activité de la catalase (CAT) dans le foie et les reins a été dosé par la méthode d'Aebi (1984). Brièvement, 50 ml d'aliquote de surnageant tissulaire a été ajouté à un tampon (pH 7,0). La réaction a été stimulée par l'ajout de 1,0 ml fraîchement préparé 30 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le taux de décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été mesurée par spectrophotométrie à 240 nm. Une unité d'activité CAT a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour décomposer 1 nmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 1 min.

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été déterminé selon la méthode de Lawrence et Burk (1976). Le taux de variation de l'absorbance lors de la conversion du NADPH en NADP<sup>+</sup> a été enregistré par spectrophotométrie à 340 nm pendant 3 min. L'activité GPx des tissus a été exprimée comme mmol GSH oxydé/min par mg de protéine.

Le niveau de glutathion réduit a été déterminé selon la méthode d'Ellman (1959). L'absorbance a été mesurée à 417 nm. Le niveau de glutathion de l'homogénat réduit a été calculé en utilisant une courbe standard. Celle-ci a été dessinée en utilisant différents niveaux connus de solution de glutathion réduit.

### **3.2. Etude statistique**

Les données ont été analysées en utilisant la moyenne  $\pm$  l'erreur standard (SE) pour représenter la tendance centrale et la dispersion des mesures. Pour évaluer les différences entre les groupes, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée. Le test de Tukey a ensuite été utilisé comme une méthode post-hoc pour comparer les moyennes deux à deux et déterminer les différences significatives.

Les moyennes obtenues dans l'analyse sont accompagnées de lettres différentes (a, b, c, ...) pour indiquer les groupes qui présentent des différences significatives entre eux. Si les moyennes de deux groupes sont suivies de lettres différentes, cela signifie qu'il existe une différence significative entre ces groupes. En revanche, si les moyennes sont suivies des mêmes lettres, cela indique qu'il n'y a pas de différence significative entre ces groupes.



# **ETUDE *IN SILCO***

---

## 4. Etude *in silico*

La compréhension des mécanismes physicochimiques qui gèrent les interactions et les réactions au sein des systèmes biologiques nécessite la mise au point de méthodes et outils expérimentaux performants. Néanmoins ces méthodes restent coûteuses à mettre en place et demandent beaucoup de temps. La modélisation moléculaire est une alternative pour la prédiction des interactions moléculaires qui permet également d'obtenir des informations concernant les modes d'interactions entre les ligands et les récepteurs.

La modélisation moléculaire est la description des molécules et de leurs interactions dans le site actif, à l'aide des programmes et des logiciels *in silico*. Dans le cas où les structures tridimensionnelles des protéines cibles sont définies, le Docking permet de mettre en évidence les régions et les résidus à explorer pour optimiser l'affinité d'un ligand avec la cible.

L'objectif principal de notre travail est de modéliser les interactions entre les pesticides et trois enzymes (la glutathion s-transférase, la superoxyde dismutase et la catalase).

Pour ce faire, nous avons appliqué la technique du Docking moléculaire afin de rationaliser et modéliser le mode d'interaction entre les pesticides et les enzymes étudiées. Une évaluation des énergies d'interactions (scoring) a aussi été réalisée. Nous avons utilisé le logiciel Autodock vina qui est un logiciel d'amarrage moléculaire très répandu et connu pour sa fiabilité et son pouvoir de reproduire les ligands déjà complexés. Facile d'utilisation et d'une grande précision il offre des performances élevées. La technique du Docking moléculaire nous a permis de prédire le mode d'inclusion et le mode d'interaction de chacun des pesticides étudiés avec les trois enzymes, d'une part, et l'évaluation de leurs énergies d'interactions (scoring) et la détermination des interactions possibles, d'autre part.

### 4.1. Méthodologie de travail utilisé dans l'étude *in silico*

#### 4.1.1. Préparation du récepteur

Toutes les structures des enzymes étudiées ont été téléchargées depuis la banque de données sur les protéines conçue par « The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics », plus communément appelée Protein Data Bank ou PDB (<https://www.rcsb.org/>). Elle constitue la principale source de données des structures tridimensionnelles de macromolécules biologiques : protéines et acides nucléiques. Ces dernières ont été déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

Les structures 3D de la glutathion S-transférase, la catalase, et la superoxyde dismutase ont été téléchargées sous format *.pdb* via la banque de donnée *Protein Data Bank* sous les codes 1K3Y, 1DGG et 5T30 respectivement. Le serveur web Swiss-PdbViewer (<https://spdbv.unil.ch/>), a ensuite été utilisé pour permettre l'analyse et la correction des structures. Les molécules d'eau qui apparaissaient dans le fichier expérimental de cristallographie, ont été ôtées et seule la chaîne A a été gardée. Les structures ont été séparées de leurs ligands afin de libérer les sites actifs. Le logiciel « UCSF Chimera » a été utilisé pour accomplir ces étapes. Par la suite, tous les hydrogènes manquants ont été ajoutés et les charges partielles de type « Kollman » calculées à l'aide de l'interface graphique « AutoDock Tools ». Enfin, le fichier de la protéine ainsi préparée a été enregistré sous format *.pdbqt*.

#### 4.1.2. Préparation des ligands

La préparation des ligands permet de générer des structures complètement indépendantes de celles de la PDB. Une conversion vers des fichiers de docking est nécessaire pour réaliser le docking, ces fichiers doivent comporter :

- Les charges partielles et les hydrogènes polaires ;
- Les liaisons rotatables.

Les fichiers des structures 3D des pesticides utilisés dans cette étude ; la lambda cyalothrine, le diazinon, le propoxur, le chlorpyrifos, l'acétamipride, le méthomyl, la cyperméthrine, et le propinèbe ont été téléchargés à partir de la banque de données « PubChem » (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Cette banque de donnée a été créée par l'NCBI (National Center for Biotechnology Information), elle fournit des informations sur les structures chimiques, identifiants, propriétés physiques et chimiques, activités biologiques, toxicité, etc. de plusieurs millions de composés, principalement des molécules de petite taille, mais aussi des macromolécules. Tous les pesticides ont été téléchargés sous l'extension *SDF*, puis ont été convertis en format *.pdb* en utilisant « UCSF Chimera ». A l'aide du programme « AutoDock Tools », les fichiers des ligands ont été convertis en *pdbqt*; format d'entrée requis pour réaliser les calculs de docking avec « Autodock Vina ». Il s'agit d'un ensemble de sous programmes qui permettent de prédire la conformation la plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur.

## 4.2. Le Docking moléculaire

Avant d'effectuer le docking moléculaire, plusieurs étapes de préparation des protéines et des ligands sont nécessaires pour garantir des résultats fiables. Ces étapes sont essentielles pour assurer une représentation correcte des structures moléculaires et faciliter l'analyse des interactions ligand-protéine.

Dans notre étude, le docking moléculaire a été réalisé à l'aide du programme « Autodock Vina » version 1.0.2. Pour cette étape, certaines considérations ont été prises en compte :

### 4.2.1. Préparation des protéines

Avant de procéder au docking moléculaire, des étapes de préparation ont été réalisées pour la protéine. Celles-ci comprennent l'élimination des molécules d'eau, l'ajustement des charges électrostatiques, la correction des erreurs de structure et, si nécessaire, la modification des groupes fonctionnels. Ces étapes sont essentielles pour garantir que la protéine est dans un état optimisé pour l'analyse du docking moléculaire.

Lors du docking moléculaire, la protéine a été maintenue dans une conformation rigide. Cela signifie que sa structure tridimensionnelle n'a pas été modifiée pendant l'analyse. Cette approche permet d'évaluer les interactions entre la protéine et les ligands de manière précise, en prenant en compte la conformation initiale de la protéine.

En effectuant ces étapes de préparation et en maintenant la protéine rigide pendant le docking moléculaire, nous avons pu obtenir des résultats plus fiables et représentatifs des interactions moléculaires spécifiques entre la protéine cible et les ligands étudiés

### 4.2.2. Préparation des ligands

Les ligands, dans ce cas les pesticides, ont également été préparés avant le docking. La conversion du format de fichier .pdb au format .pdbqt a été réalisée pour les ligands. Cette conversion permet de générer des fichiers de ligands spécifiques à l'Autodock Vina, contenant des informations sur les torsions et les charges des ligands, nécessaires pour les calculs de docking.

### 4.2.3. Attribution des torsions

Lors de la conversion des fichiers .pdb au format *pdbqt*, les torsions des ligands ont été automatiquement attribuées. Les torsions sont des degrés de liberté qui permettent aux ligands de se plier et de s'adapter aux cavités de la protéine cible. L'attribution automatique des torsions facilite l'exploration de l'espace conformationnel des ligands lors du docking.

Une fois que la préparation des protéines et des ligands est terminée, le docking moléculaire peut être effectué en utilisant le programme Autodock Vina. Ce logiciel utilise des algorithmes et des techniques avancées pour prédire les positions et les affinités de liaison des ligands dans les cavités de la protéine cible.

Par la suite, les sites actifs ont été définis. Des zones de recherches, qu'on appelle « les grilles » ont été déterminées à l'aide des « Grid box », de manière à englober la totalité des espaces couverts par les ligands de référence dans les structures d'origine (1K3Y, 1DGG et 5T30). Les coordonnées des sites actifs (Grid box) ont été calculées et créées afin de définir les espaces de recherche conformationnels des ligands dockés.

- 1K3Y : (x = 81.981 y = 28.211 z = 14.261) avec la dimension (x = 25 y = 25 z = 25).
- 1DGG : (x = 27.016 y = 38.233 z = 61.601) avec la dimension (x = 25 y = 25 z = 25).
- 5T30 : (x = 49.808 y = 22.473 z = 90.213) avec la dimension (x = 25 y = 25 z = 25).

Les résultats de Docking ont été générés dans des fichiers dlG (Docking LoG file). Ces derniers fournissent les conformations spatiales des 10 meilleures positions pour chaque ligand étudié au sein du site actif de chaque enzyme ainsi que les énergies d'interaction.

### 4.3. Le test de re-docking

L'évaluation des performances d'un programme de docking moléculaire repose souvent sur sa capacité à reproduire avec précision les complexes moléculaires observés expérimentalement. Dans cette étude, la performance du programme Autodock Vina a été évaluée à l'aide de la méthode du re-docking. Cette analyse comparative revêt une importance capitale pour améliorer la précision des méthodes de docking.

Le re-docking consiste à effectuer le docking moléculaire du ligand connu et co-cristallisé avec la protéine étudiée. L'objectif est de déterminer si le programme de docking est capable de reproduire la même pose du ligand que celle observée expérimentalement. Cette approche permet d'évaluer la capacité du programme Autodock Vina à prédire la conformation préférentielle du ligand lorsqu'il se lie à la protéine cible. Si le re-docking produit une pose du ligand similaire à celle observée expérimentalement, cela suggère que le programme est capable de prédire avec précision les interactions ligand-protéine.

La précision du re-docking est évaluée en comparant la pose du ligand obtenue par le programme de docking avec la pose expérimentale. Différentes métriques peuvent être utilisées pour mesurer l'écart entre les poses, telles que la RMSD (Root Mean Square

Deviation) qui mesure la différence quadratique moyenne entre les positions des atomes du ligand.

Pour évaluer de manière statistique les résultats du re-docking, des tests peuvent être effectués pour comparer les scores de liaison obtenus par le programme de docking avec les scores expérimentaux. Des méthodes telles que le coefficient de corrélation, l'erreur absolue moyenne (MAE) ou le facteur d'enrichissement (EF) peuvent être utilisées pour quantifier la performance du programme

L'évaluation du re-docking offre donc une validation interne du programme de docking et permet de quantifier sa performance en termes de précision et d'exactitude. Cette étape est cruciale pour améliorer les méthodes de docking et les rendre plus fiables dans la prédiction des interactions ligand-protéine.

#### **4.4. Analyse visuelle**

"Biovia Discovery Studio Visualizer" est une suite logicielle qui offre diverses fonctionnalités permettant de visualiser, analyser et partager différentes données biologiques et chimiques. Cette suite logicielle fournit des outils puissants pour les chercheurs et les scientifiques afin d'explorer et d'interpréter des données essentielles dans le domaine de la biologie et de la chimie.

La fonctionnalité de visualisation de "Biovia Discovery Studio Visualizer" permet d'explorer des structures moléculaires en 3D, des séquences d'acides nucléiques et des protéines, ainsi que d'autres types de données biologiques. Cela permet une compréhension plus approfondie des structures moléculaires et de leurs interactions, facilitant ainsi la modélisation et la simulation de processus biologiques.

De même, le logiciel "PyMOL" est utilisé pour visualiser les résultats et analyser les structures moléculaires en 3D. C'est un logiciel libre de visualisation de structures chimiques en 3D créé par Schrödinger. Il est développé en Python et est largement utilisé dans le domaine de la chimie et de la biologie structurale pour visualiser et analyser des structures moléculaires. Il permet de manipuler, de représenter et de visualiser les molécules de manière interactive, en mettant l'accent sur les détails structurels et les interactions atomiques. Grâce à ses fonctionnalités avancées, "PyMOL" permet d'étudier en détail les poses des molécules dans les cavités des enzymes et de déterminer leur complémentarité de surface avec les sites actifs.

Ces deux logiciels nous ont permis de visualiser les structures moléculaires des pesticides en 3D et d'analyser leurs interactions avec les enzymes cibles. Les poses retenues

étaient celles des molécules qui étaient correctement positionnées dans les cavités des enzymes et qui présentaient une bonne complémentarité de surface avec les sites actifs.

L'utilisation de « Biovia Discovery Studio Visualizer » et de « PyMOL » permet d'obtenir une représentation visuelle claire et détaillée des interactions entre les pesticides et les enzymes étudiées. Cela facilite l'analyse et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre les pesticides et les enzymes cibles. Ces logiciels offrent également des fonctionnalités avancées pour l'analyse des structures moléculaires, telles que le calcul des surfaces de complémentarité, la visualisation des liaisons hydrogène, l'identification des résidus clés impliqués dans l'interaction, et bien plus encore. Ils sont donc des outils précieux dans l'étude des interactions moléculaires et dans la recherche de nouvelles substances actives.

# **CHAPITRE III**

---

## **RESULTATS & DISCUSSION**



# **RESULTATS DE L'ENQUETE**

---

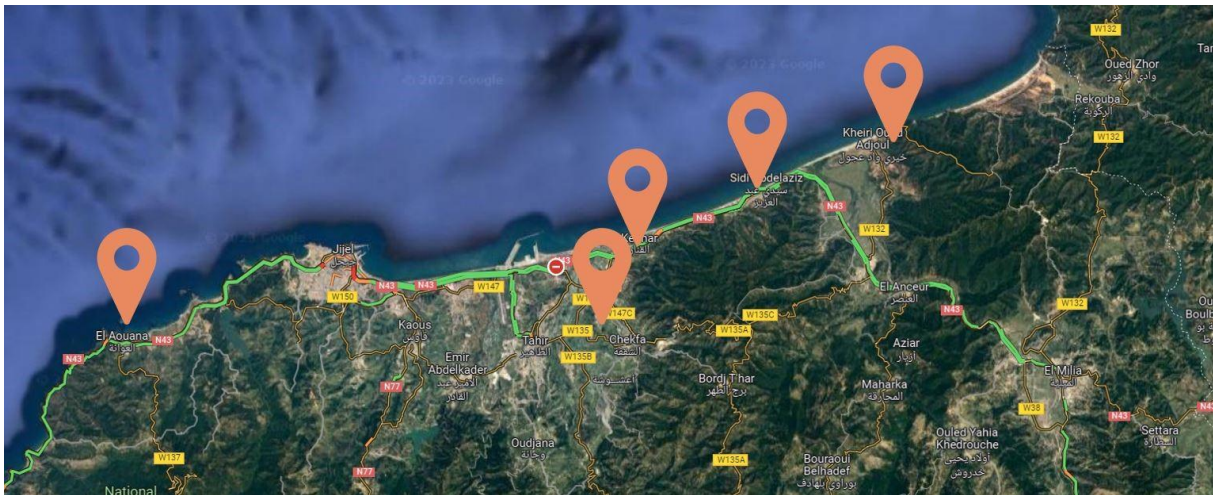
### III. Résultats et discussion

#### 1. Résultats de l'enquête

##### 1.1. Définition des zones d'étude

Le choix des zones d'étude dans les régions agricoles revêt une importance capitale pour mener des recherches pertinentes et représentatives. Dans le cadre de notre étude, nous avons adopté une approche stratégique en choisissant les zones d'étude dans les régions agricoles de la wilaya de Jijel. Notre sélection s'est appuyée sur des critères tels que la diversité des cultures et la représentativité des produits agricoles locaux. Cette approche nous permettra de générer des connaissances approfondies sur les pratiques agricoles de la région de Jijel.

Les zones agricoles choisies pour notre étude sont : Beni Belaid, Sidi Abdelaziz, El Kannar, Djimar et El Ouana.



**Figure 6 :** Localisation des cinq zones d'étude : Beni Belaid, Sidi Abdelaziz, El-Kannar, Djimar et El-Ouana (Image satellitaire).

##### 1.2. Collecte d'information

Durant les entretiens avec les agriculteurs nous avons remarqué que tous les agriculteurs sont d'accord pour une seule appellation de pesticide qui est « Edouwa » qui signifie « traitement » ou encore « médicament ». Les pesticides sont donc perçus comme un remède.

Ces visions réductrices de la dangerosité potentielle des pesticides peuvent prêter à confusion l'applicateur qui, devant les bienfaits de ces produits, occulte leurs effets néfastes pouvant mettre en péril la santé des usagers, des consommateurs et de l'environnement.

Les croyances naïves des agriculteurs comme ne jamais utiliser des traitements contre les fourmis pour ne pas que dieu les punisse pour les avoir tués et ôte « el baraka » de leurs cultures, influencent aussi le spectre d'utilisation des pesticides. L'analyse de l'ensemble des

réponses a montré que la santé du consommateur ne représente qu'une faible préoccupation pour les utilisateurs de pesticides.

Les résultats de l'enquête ont révélé que le recours aux pesticides se fait de façon systématique. Selon l'agriculteur, cette utilisation est un facteur important dans la détermination des revenus. Il a aussi été constaté que les agriculteurs peuvent recourir à l'utilisation simultanée de plusieurs pesticides. Toutefois, il est important de noter que le nombre de pesticides utilisés simultanément ne doit pas dépasser quatre, appliqués sur la même culture et ciblant un même ravageur. Par exemple, il est recommandé de ne pas utiliser plus de quatre insecticides en même temps ou plus de quatre fongicides en même temps. Cette recommandation vise à prévenir l'apparition de résistances chez les ravageurs ciblés. L'utilisation d'un nombre restreint de pesticides simultanément permet aussi de mieux contrôler les populations de ravageurs et réduit les chances de développement de résistances, ce qui maintient l'efficacité des produits phytosanitaires.

Enfin, une utilisation intensive et mal raisonnée des pesticides, ou sans respect des prescriptions techniques dans le but d'augmenter les rendements a été observée.

### 1.3. Listes des pesticides les plus utilisés dans les régions étudiées

Les pesticides les plus utilisés par les agriculteurs dans la région de Jijel, dans les différentes zones étudiées sont répertoriés dans les tableaux suivants :

**Tableau 3 :** Liste des pesticides les plus utilisés dans les différentes zones d'étude de la région de Jijel, selon les résultats de la première enquête.

Noms Commerciaux	Noms chimiques	Groupes
<b>TRANSAC</b>	Abamectine	Acaricide / Insecticide
<b>PYRICAL</b>	Chlorpyrifos Ethyl	Insecticide
<b>ROMECTIN</b>	Avermectines	Acaricide
<b>DECIS</b>	Pyréthroïdes de synthèse	Insecticide/Acaricide (larvicide)
<b>FASTAC</b>	Pyréthroïdes	Insecticide

<b>TROFUC</b>	Inconnu	Inconnu
<b>Envidor</b>	Spirodiclofen	Acaricide
<b>Calypso</b>	/	Insecticide
<b>Cascade</b>	Benzoylurée Flufénoxuron	Insecticide / Acaricide
<b>Cuprocaffaro</b>	Oxychlorure de cuivre	Fongicide cuprique anti mildiou
<b>Pennstyl® 600 flow</b>	Cyhexatin	Acaricide
<b>Vetacur</b>	Phenamiphos	Nématicide
<b>O.B.E.R.O.N</b>	Spiromesifene	Insecticide / Acaricide
<b>Movento</b>	Pyréthriinoïde	Insecticide

**Tableau 4 :** Liste des pesticides les plus utilisés dans dans les différentes zones d'étude de la région de Jijel, selon les résultats de la deuxième enquête.

<b>Noms commerciaux</b>	<b>Matière Active</b>	<b>Groupe</b>
<b>TRIMANGO</b>	Manèbe	Fongicide
<b>VAPOCIDIN</b>	Fenvalérate	Insecticide
<b>THIODAN 35</b>	Endosulfan	Insecticide
<b>KARATÉ</b>	Lambda cyalothrine	Insecticide
<b>PICHLOREX</b>	Malathion	Insecticide
<b>CYPER</b>	Cypermethrine	Insecticide
<b>ANVIL</b>	Hexaconazole	Fongicide
<b>CURZATE R</b>	Cymoxanyl	Fongicide
<b>ANTRACOL</b>	Propinèbe	Fongicide
<b>MOCAP</b>	Ethoprophos	Insecticide/Nematicide
/	Mancozèbe	Fongicide
<b>COMMANDO</b>	Imidaclopride	Insecticide

**Tableau 5** : Liste des pesticides les plus utilisés dans la région de Jijel, selon les résultats de l'enquête qui a été menée auprès des revendeurs de pesticides.

<b>Noms commerciaux</b>	<b>Matières actives</b>	<b>Familles chimiques</b>	<b>Types de pesticides</b>
<b>LANNATE 25, 20</b>	Méthomyl	Carbamate	Insecticide
<b>CEKUFON 80 sp</b>	Trichlorfen	Organophosphorés	Insecticide
<b>SHERPA 25 EC</b>	Cyperméthrine	Pyréthriinoïdes de synthèse.	Insecticide
<b>DELTACAL 25 EC</b>	Deltaméthrine	Pyréthriinoïdes de synthèse.	Insecticide
<b>PYRICAL 480 EC</b>	Chlorpyrifos-Ethyl	Organophosphorés	Insecticide
<b>AVAUNT 150 SC</b>	Indoxacarbe	Oxadiazines	Insecticide
<b>VECTRA 10 SC</b>	Bromuconazole	Triazole	Fongicide
<b>METHYLTHIOPH ANATE 70%</b>	Thiophanate-Methyl	Benzimidazoles	Fongicide
<b>PREVICATOR</b>	Soufre	Minéral	Fongicide, acaricide
<b>SOLFOLI</b>	Soufre	Minéral	Fongicide
<b>BLINEXA</b>	Hexaconazole	Triazole	Fongicide

<b>MANCOM</b>	Mancozèbe : manganèse	Dithiocarbamates	Fongicide
<b>ARMETIL CUIVRE</b>	8 % Metlaxyl 40 % Cuivre	Phénylamides Cuprique	Fongicide
<b>VYDATE L</b>	Oxamyl	Carbinol	Nématicide, insecticide, acaricide
<b>RIVAFOL</b>	Dicofol	/	Acaricide
<b>ACEPLAN 25 SP</b>	Acétamipride	Organochloré	Insecticide
<b>ZOLONE 35 EC</b>	Phosalone	Organophosphoré	Insecticide
<b>SUPERYAM 40 EC</b>	Methidathion	Organophosphoré	Insecticide
<b>NEMAPHOS 10G</b>	Ethoprophos Manganèseéthylènebis(d ithiocarbamatepolymèri que)	/	Insecticide
<b>CURZATE R</b>	Cymoxanil Oxychlorure de cuivre	- Cymoxanil : Acétamides - Oxychlorure de cuivre : cupriques	Fongicide

Les tableaux 3, 4 et 5 comprennent des détails sur les formulations de pesticides les plus utilisés dans les zones étudiées : Beni Belaid, Sidi Abdelaziz, El Kannar, Djimar et El Ouana. Les enquêtes menées auprès des agriculteurs et des revendeurs de pesticides ont fourni des informations détaillées sur les noms commerciaux, les matières actives, les familles chimiques et les types de pesticides les plus utilisés dans les différentes zones d'étude. Ces informations sont essentielles pour sélectionner les pesticides appropriés dans le cadre des études

expérimentales, en tenant compte des pratiques et des préférences spécifiques à la région de Jijel.

Ces données sont très importantes et permettent d'orienter nos choix lors des études *in vitro*, *in vivo* et *in silico*, en nous permettant de sélectionner les pesticides appropriés en fonction de leur utilisation répandue et de leur disponibilité dans la région. Ce qui permet une sélection plus éclairée des mélanges de pesticides, favorisant ainsi des résultats plus représentatifs et une meilleure compréhension des effets des pesticides.

**Tableau 6 :** Listes des pesticides pouvant être utilisés simultanément sur une même culture.

<b>Cultures</b>	<b>Pesticides utilisés</b>
<b>Tomate</b>	ARMETIL CUIVRE, CURZATE R, DELTACAL 25 EC, DECIS, FASTAC, LANNATE 25, 20 WP, SHERPA® 25 EC, ROMECTINE, VECTRA 10 SC, PYRICAL 5 G, OBERON, Pennstyl® 600 flow, Cuprocaffaro
<b>Vigne</b>	ARMETIL CUIVRE, BLIN EXA 5 SC, CURZATE R, , METHYLTHIOPHANATE 70%, LANNATE 25, 20 WP, ROMECTINE, SOLFO LI, VECTRA 10 SC, PREVICATOR, Pennstyl® 600 flow, Envidor, Cuprocaffaro, Cascade
<b>Pomme de terre</b>	ARMETIL CUIVRE, AVAUNT 150 SC, CURZATE R, DECIS, PYRICAL 5 G, FASTAC®, Vetacur,
<b>Arboricultures fruitières à pépins</b>	BLIN EXA 5 SC, DELTACAL 25 EC, METHYLTHIOPHANATE 70%, SOLFO LI, Cascade
<b>Arboricultures fruitières sans pépin</b>	BLIN EXA 5 SC, DELTACAL 25 EC, METHYLTHIOPHANATE 70%, PYRICAL 480 EC, SOLFO LI,
<b>Concombre</b>	CURZATE R, DECIS, LANNATE 25, 20 WP,
<b>Laitue</b>	DELTACAL 25 EC, DECIS, LANNATE 25, 20 WP,



<b>Arbres fruitiers</b>	DELTACAL 25 EC, METHYLTHIOPHANATE 70%, ROMECTINE, PREVICATOR, Vetacur, Decis
<b>Agrumes</b>	DELTACAL 25 EC, ROMECTINE, PREVICATOR, Envidor, Cascade, Decis
<b>Cultures légumières</b>	AVAUNT 150 SC, DELTACAL 25 EC, DECIS, METHYLTHIOPHANATE 70%, PYRICAL 480 EC, SOLFO LI, Pennstyl® 600 flow, PREVICATOR, PYRICAL 5 G, OBERON, Vetacur, Cuprocaffaro, Cascade
<b>Céréales</b>	DELTACAL 25 EC, PREVICATOR, PYRICAL 5 G
<b>Betterave</b>	METHYLTHIOPHANATE 70%,
<b>Aubergine</b>	LANNATE 25, 20 WP,
<b>Poivron</b>	LANNATE 25, 20 WP, VECTRA 10 SC, Cuprocaffaro
<b>Courgette</b>	SHERPA® 25 EC
<b>Pommier</b>	AVAUNT 150 SC, FASTAC, LANNATE 25, 20 WP, SHERPA® 25 EC, 10 SC, Envidor, Decis
<b>Poirier</b>	LANNATE 25, 20 WP, VECTRA 10 SC, Envidor
<b>Pêcher</b>	LANNATE 25, 20 WP, Envidor
<b>Epinard</b>	LANNATE 25, 20 WP,
<b>Asperge</b>	LANNATE 25, 20 WP,
<b>Oliviers</b>	PYRICAL 480 EC, Decis
<b>Cucurbitacés</b>	METHYLTHIOPHANATE 70%, VECTRA 10 SC, OBERON,

Le tableau 6 offre une vue d'ensemble des pesticides qui peuvent être utilisés simultanément sur une même culture. La sélection judicieuse des pesticides à utiliser dans notre étude est essentielle pour garantir des conditions expérimentales représentatives et des résultats fiables.

La liste des pesticides simultanément utilisés sur une même culture permet d'avoir une vision plus complète des combinaisons de produits chimiques auxquelles les agriculteurs ont recours pour lutter contre les ravageurs et les maladies des cultures. Cela peut être utile pour comprendre les pratiques actuelles en matière de gestion des cultures dans la région de Jijel et évaluer les risques potentiels liés à l'utilisation simultanée de plusieurs pesticides.

Les résultats de l'enquête ont montré que les agriculteurs utilisent plusieurs pesticides sur une même culture pour contribuer à la protection contre un large éventail de ravageurs et de maladies. Cependant, cela peut également augmenter les risques de synergie entre les produits chimiques. Les pesticides appartenant à la même famille chimique ont souvent des propriétés et des modes d'action similaires. Cela signifie qu'ils peuvent avoir des effets synergiques lorsqu'ils sont utilisés simultanément, ce qui peut potentiellement augmenter leur toxicité.

En se basant sur les informations collectées dans les différentes enquêtes menées dans cette étude, il nous a été possible de prendre des décisions éclairées quant aux combinaisons de pesticides à inclure dans nos protocoles expérimentaux des études *in vitro*, *in vivo* et *in silico*. L'utilisation de mélanges de pesticides pertinents nous permettra d'imiter au mieux les conditions réelles rencontrées sur le terrain, tout en garantissant une exposition réaliste aux substances actives.

# **ETUDE *IN VITRO***

---

## 2. Etude *in vitro*

L'utilisation des pesticides pour améliorer la qualité et le rendement des cultures est devenue une pratique courante dans le monde entier. Cependant, la population humaine peut être constamment exposée à des mélanges de ces produits dangereux (John et al., 2001 ; Curl et al., 2003).

Les études sur l'exposition aux pesticides revêtent une grande importance. Malheureusement, il existe aujourd'hui peu de données de littérature sur les risques sur la santé en lien avec l'exposition aux pesticides en Algérie. Notre étude *in vitro* est une étude préliminaire dont l'objectif était d'étudier les associations entre l'exposition aux pesticides utilisés en agriculture et les risques qui en découlent.

L'étude s'est intéressée dans un premier temps à l'exposition de l'ensemble de la population en général qui se fait essentiellement via l'alimentation. L'intensité de l'exposition est liée à plusieurs facteurs. Les méthodes d'application, l'utilisation d'équipements de protection individuelle, le respect des délais de sécurité après les traitements, etc. Pour les agriculteurs, le poids, les quantités ingérées, les préférences alimentaires, etc. pour les consommateurs ainsi que la durée et la fréquence d'exposition pour les deux. Ces derniers pouvant influencer et affecter l'exposition ont été pris en considération dans le choix et la détermination des doses utilisées dans l'étude.

La seconde forme d'exposition à laquelle notre travail s'est intéressé est l'exposition des applicateurs, principalement les agriculteurs. Nous avons essayé de reproduire les mêmes conditions de l'exposition aux pesticides que subissent les agriculteurs lors des pratiques agricoles.

Les pesticides sont souvent formulés comme étant des poudres mouillables et à ce titre, l'exposition professionnelle à ces agents peut résulter de l'inhalation ou de l'ingestion (Kurttio et al., 1990).

L'utilisation de la culture cellulaire et des tests de viabilité *in vitro* est utile à l'évaluation de la cytotoxicité des pesticides. Il est possible de mimer des phénomènes d'exposition reflétant l'exposition réelle des utilisateurs ou des consommateurs de ces produits.

Alors que l'utilisation de lignées cellulaires transformées dans les études *in vitro* est commune, plusieurs questions, concernant les caractéristiques et les réponses aux toxiques de ces dernières, peuvent être soulevées. Des études ont été menées pour permettre la comparaison entre les cellules normales et les cellules transformées, nous citons ici les études qui ont utilisé à la fois des lignées de cellules du côlon transformées (HT29) et non

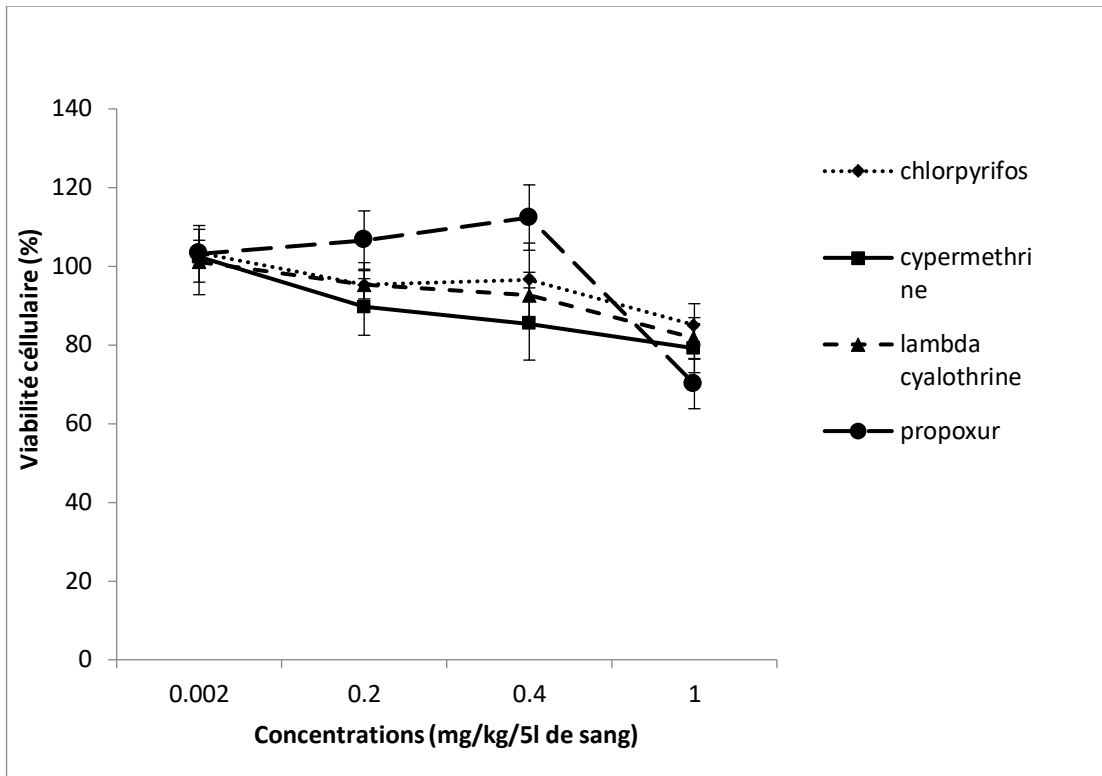
transformées (normales) et qui ont conclu que les deux types cellulaires agissaient de manière similaire aux traitements auxquels ils ont été exposés (Hoffman et Hardej, 2012). Pour sa part, la lignée cellulaire A549 est très couramment utilisée, car elle présente des propriétés communes avec la lignée cellulaire épithéliale alvéolaire humaine (Zerin, 2012).

Les tests de cytotoxicité sont largement utilisés dans les études de toxicologie *in vitro*. Le test au MTT est l'un des plus utilisés pour la détection de la cytotoxicité ou de la viabilité cellulaire après exposition à des substances toxiques. (Fotakis et Timbrell, 2006). L'activité mitochondriale est un marqueur de cytotoxicité aiguë qui montre des signes précoces de lésions cellulaires (Konsoula et Barile, 2005). Dans notre travail, ce test nous a permis de déterminer et d'évaluer la viabilité cellulaire dans les différentes suspensions cellulaires étudiées.

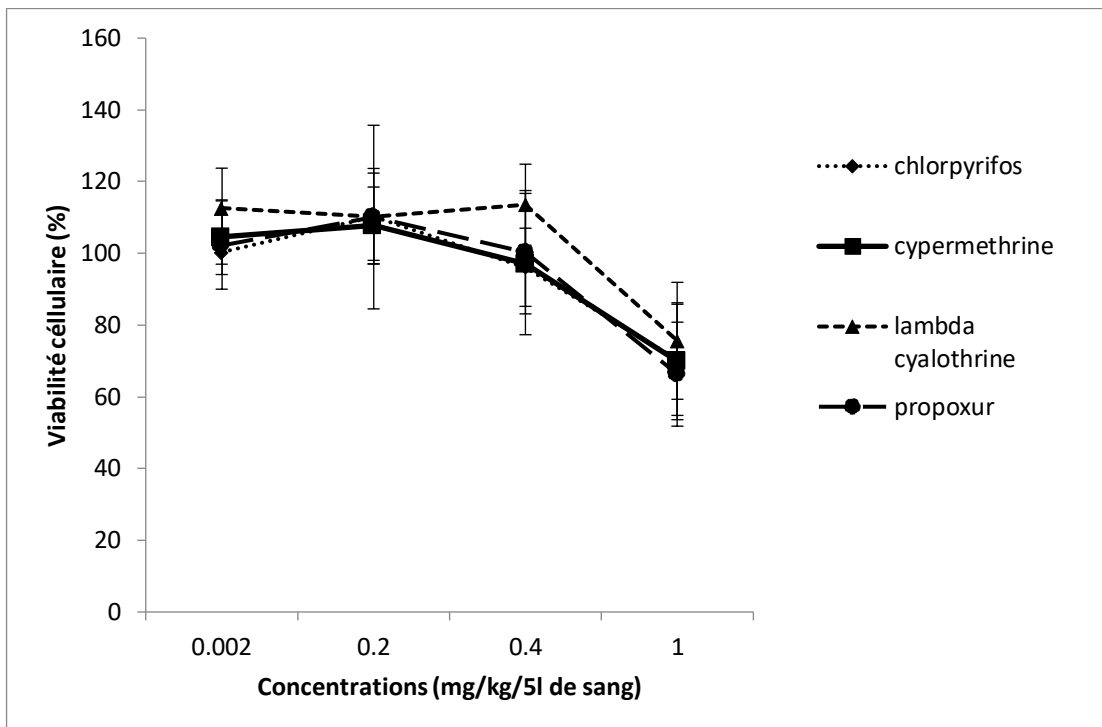
### **2.1. Etude 1**

Dans cette première partie de l'étude *in vitro* nous avons essayé de mettre l'accent sur les effets des pesticides sur l'ensemble de la population en général. L'utilisation accrue de pesticides dans l'agriculture conduit à la présence de résidus dans l'alimentation. La population générale est essentiellement exposée au travers de son alimentation et de son environnement. L'exposition par l'alimentation concerne les aliments traités. Elle expose tout un chacun à des niveaux de pesticides variables et souvent difficiles à apprécier. L'objectif de ce travail est d'étudier et d'expliquer les effets que peuvent avoir les pesticides les plus utilisés en Algérie, quotidiennement servis dans nos assiettes et atteignant nos organismes, sur la santé. Les effets cytotoxiques d'un mélange de quatre pesticides ont été étudiés sur des cultures de cellules humaines issues de l'adénocarcinome de l'épithélium colique humain (HT29).

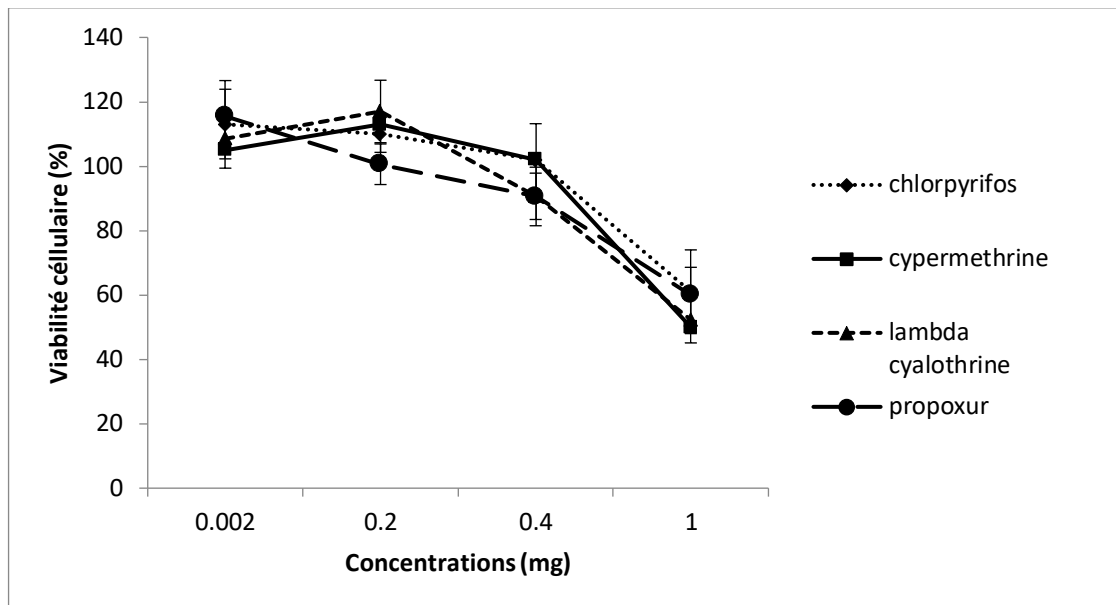
Afin de connaître les effets des pesticides vis-à-vis de la viabilité cellulaire, nous avons réalisé un test de cytotoxicité : le test au MTT, en utilisant la lignée cellulaire HT29 issue d'adénocarcinome colique humain. Les pesticides ont d'abord été utilisés seuls à différentes concentrations (les résultats sont présentés sur la figure 6). En tenant compte des résultats, seules les concentrations susceptibles d'induire des effets sur la viabilité cellulaire ont été retenues pour la suite de l'étude.



**Figure 7 :** Variations de la viabilité cellulaire de 4 pesticides avec les concentrations (0.002, 0.2, 0.4 et 1 mg/kg/5l de sang) sur les cellules HT29 différenciées après 24 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de correspondant au témoin négatif.



**Figure 8 :** Variations de la viabilité cellulaire de 4 pesticides avec les concentrations (0.002, 0.2, 0.4 et 1 mg/kg/5l de sang) sur les cellules HT29 différenciées après 48 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif.



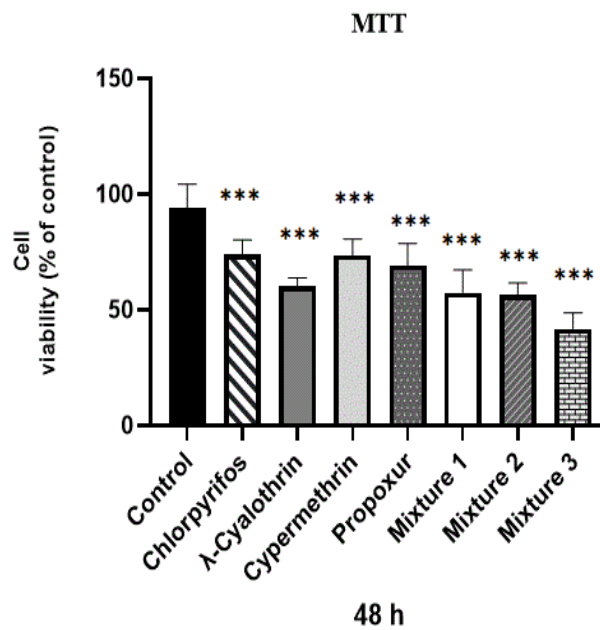
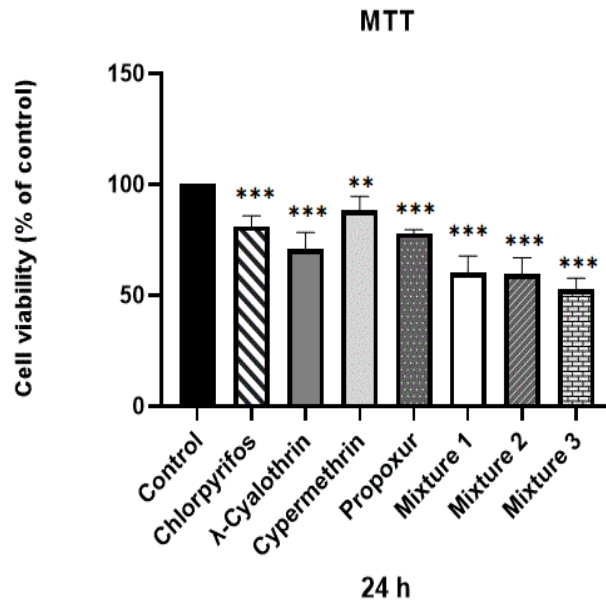
**Figure 9 :** Variations de la viabilité cellulaire de 4 pesticides avec les concentrations (0.002, 0.2, 0.4 et 1 mg/kg/5l de sang) sur les cellules HT29 différenciées après 72 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif.

Les courbes de viabilité obtenues après des périodes de traitement de 24, 48 et 72 h sur les cellules HT-29 différenciées ont été déterminées à partir de 3 expériences indépendantes. Chaque expérience a été réalisée avec un témoin positif. Une analyse statistique a été réalisée par comparaison des moyennes de fluorescence par rapport au témoin cellulaire grâce à une analyse de variance à 1 facteur (one-way, ANOVA), suivie d'un test de Tukey,  $\alpha = 5\%$ .

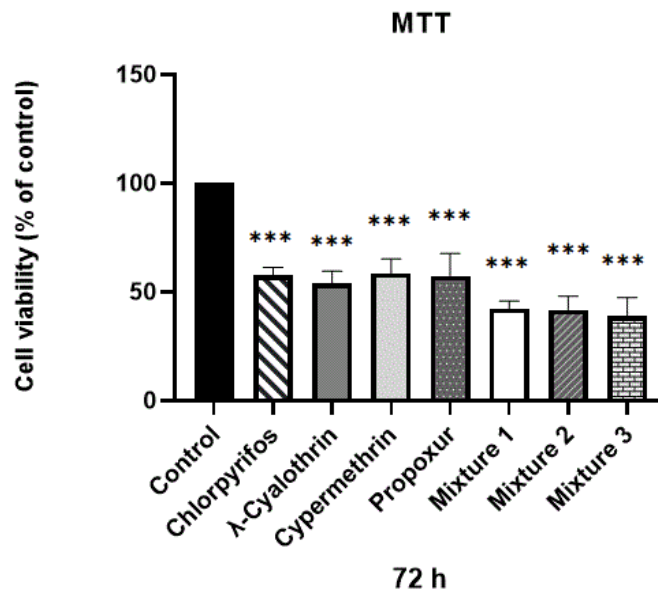
Les résultats obtenus ont montré que toutes les concentrations testées n'ont visiblement pas eu d'effet cytotoxique sur les cellules de la lignée cellulaire HT29, et ce, quelle que soit la durée d'exposition, seule la concentration de 1 mg a pu provoquer une mort cellulaire notable. En effet, la viabilité cellulaire n'est plus à cette concentration que d'environ 80% après 24 heures de traitement. Après 48 heures de traitement la viabilité cellulaire s'est atténuée pour atteindre un taux d'environ 65 % pour le chlorpyrifos, le propoxur et la cyperméthrine. Un taux d'environ 70 % a été enregistré pour la lambda-cyhalothrine.

Cependant, après 72 heures de traitement, pour la même concentration, l'effet cytotoxique des pesticides continuait de s'intensifier. 60% seulement de cellules sont restées vivantes suite à l'exposition aux chlorpyrifos et propoxur au moment où l'exposition à la cyperméthrine et la lambda-cyhalothrine a entraîné la mort cellulaire de 50 % de cellules.

En se basant sur ces résultats, la concentration qui a présenté la plus haute toxicité a été sélectionnée pour une évaluation des effets combinés. Seule la concentration de 1 mg a été testée pour permettre l'évaluation de la cytotoxicité de 4 cocktails de pesticides sur la lignée cellulaire HT29 et la comparaison des effets de ceux-ci et les effets des pesticides seuls.







**Figure 10** : Cytotoxicité des 4 pesticides (chlorpyrifos, cyperméthrine, lambda-cyhalothrine et propoxur) et leurs mélanges (M1, M2 et M3) sur les cellules HT29 différenciées après 24, 48 et 72 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif.

Les mélanges de pesticides quant à eux sont toxiques pour les cellules HT29 à la concentration de 1 mg avec une viabilité cellulaire de 40% (causent une mortalité dans 60% des cellules).

La viabilité cellulaire des pesticides variait, après 24h de traitement avec la dose de 1 mg/kg /5l de sang ; de 70 à 80%, soit une mortalité dans environ 25% de pesticide.

La cytotoxicité dans les mélanges de pesticides après 24h de traitement a été plus marquée dans les cellules HT29. Elle était d'environ 50% pour tous les mélanges.

- Après 48h de traitement, tous les pesticides et les mélanges de pesticides ont induit une cytotoxicité d'environ 50% dans les cellules HT29. Seuls le chlorpyrifos et la cyperméthrine présentaient un taux de viabilité de 75.56% et 68.57% respectivement.
- Après 72h de traitement, Les pesticides seuls ont provoqué une mort cellulaire dans environ 50% des cellules pour la dose de 1mg/kg/5 l de sang.

Les mélanges de pesticides quant à eux, ont inhibé la viabilité dans plus de 60% des cellules. Seuls 37% de cellules pour M<sub>1</sub> et 42% de cellules pour M<sub>2</sub> étaient restées vivantes.

Nous avons constaté que pour les pesticides utilisés seuls, un effet dose-dépendant était observé. La plus forte concentration de pesticides était celle qui a fortement diminué la viabilité des cellules HT29.

Ces résultats coïncident avec les précédentes études réalisées sur d'autres lignées cellulaires. En effet, la cytotoxicité de l'endosulfan et du chlorpyrifos a été étudiée dans des cultures de lymphocytes de volaille par (Mehta et al. 2008).

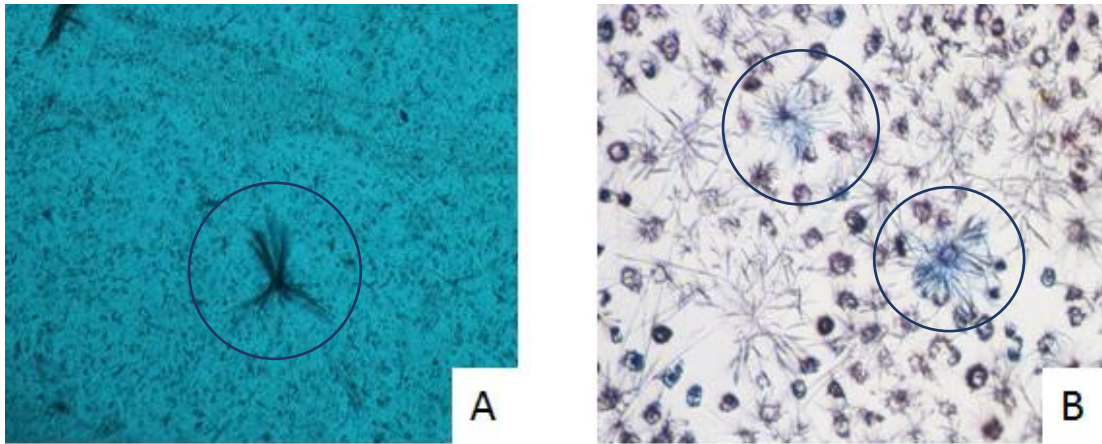
Les résultats de cette étude ont montré que le chlorpyrifos inhibe la croissance des lymphocytes de volaille cultivés.

Une autre étude s'est intéressée à l'évaluation de la cytotoxicité de deux mélanges de pesticides sur deux lignées cellulaires humaines : l'adénocarcinome colorectal épithélial humain : La lignée cellulaire Caco-2 comme modèle intestinal. Car ce tissu est en contact direct avec les contaminants alimentaires objets de cette étude.

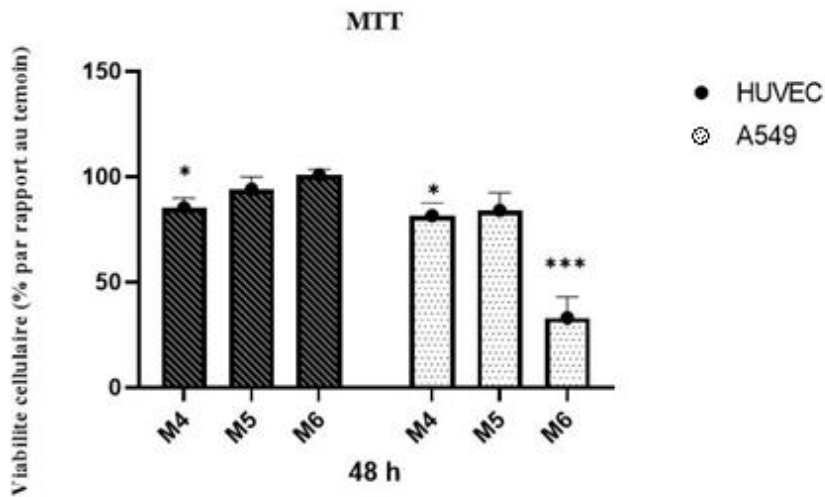
Le deuxième modèle est le carcinome hépatocellulaire humain : la lignée cellulaire HepG2 a été choisie comme modèle représentant l'exposition hépatique car le foie représente une cible commune des xénobiotiques. Les résultats de cette étude ont montré que la cytotoxicité du cocktail équimolaire composé de dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et de dieldrine, était plus importante que l'effet additif attendu. De plus, l'induction de l'apoptose était plus élevée, dans les mélanges de pesticides, que celle estimée en additionnant les effets du DDT et de la dieldrine (Takakura et al., 2013). En revanche, une étude portant sur les effets toxiques du diazinon sur l'intestin en utilisant le modèle cellulaire HCT116, issu de l'adénocarcinome colique humain, a montré que le diazinon est cytotoxique envers ce genre de cellules. Des dommages oxydatifs suite à la génération excessives des radicaux libres ont aussi été associés à l'exposition à ce pesticide (Ferber et al., 2009).

## **2.2. Etude 2**

L'effet des pesticides sur la viabilité des deux lignées cellulaires HUVEC et A549 a été déterminé par le test du MTT. La cytotoxicité relative des différents mélanges de pesticides a été évaluée par la différence entre le pourcentage des cellules viables et 100.



**Figure 11 :** (A) Cristaux de formazan dans les cellules pulmonaires A549 ; (B) Cristaux de formazan dans les cellules endothéliales HUVEC.



**Figure 12 :** Cytotoxicité de trois mélanges de pesticides (M4, M5 et M6) sur les deux lignées cellulaires HUVEC et A549 après 48 h de traitement. La viabilité cellulaire est estimée en pourcentage, 100% de viabilité correspondant au témoin négatif.

Nous avons essayé d'étudier l'exposition professionnelle aux pesticides dans le cas de l'inhalation, d'où le choix de la lignée pulmonaire A549. Le deuxième type de cellules étudiées est les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC), utilisé comme modèle d'étude de cellules saines.

Dans cette étude seuls des mélanges de pesticides ont été utilisés à une dose unique pour une période de 48 h.

Les résultats obtenus ont révélé une augmentation de la prolifération dans la lignée cellulaire HUVEC. Dans l'ensemble, aucun des mélanges de pesticides n'a présenté d'effet cytotoxique significatif sur cette lignée, à l'exception du mélange M4 qui a entraîné une légère inhibition de la viabilité cellulaire dans 14,27% des cellules. Un résultat similaire a été décrit par Hreljac et al., (2008), qui a trouvé que certains pesticides pourraient augmenter la viabilité cellulaire en raison d'une augmentation de l'activité mitochondriale, conduisant ainsi à une prolifération croissante. Le test utilisé dans cette étude était le test du MTT.

La cytotoxicité observée sur les cellules A549 était significativement plus prononcée par rapport à celle précédemment déterminée pour les cellules HUVEC.

Les résultats ont révélé une sensibilité accrue des cellules A549 aux différents traitements et mélanges de pesticides étudiés. Une diminution notable de la viabilité cellulaire a été observée dans la lignée A549, indiquant un effet cytotoxique significatif induit par les pesticides. Pour cette lignée cellulaire, une augmentation de la cytotoxicité dépendant du nombre de pesticides utilisés dans les mélanges testés, a été observée. Pour le premier mélange composé de six pesticides (le chlorpyrifos, le spiromesifene, la cyperméthrine, le bromuconazole, l'abamectin et le méthomyl), le pourcentage de cytotoxicité était de 14.27%. Pour le deuxième mélange étudié sur cette lignée cellulaire, et qui se composait de 8 pesticides (M1 + le spirodiclofen et la deltaméthrine), le taux de viabilité cellulaire était de 84,7% observé après 48 heures de traitement (Figure 12). Alors que pour le troisième mélange (M6) composé de 9 pesticides avec la concentration de 1 mg/kg/5l de sang, une inhibition de la croissance cellulaire a été observée dans 66.92% de cellules, soit une diminution dans la viabilité cellulaire de plus de 50 %.

L'observation microscopique des plaques des cellules cultivées a montré que des modifications dans la forme des cellules A549 traitées par les pesticides ont été enregistrées. Ceci a aussi été observée dans une étude similaire testant la cytotoxicité aigüe de l'insecticide imidaclopride, dans la lignée cellulaire branchiale de flet. Cette dernière a révélé que les mitochondries des cellules exposées pendant 48 h à de l'imidaclopride étaient gravement endommagées et enflées, tandis que leurs noyaux et leur réticulum endoplasmique rugueux (RER) restaient intacts. Cela suggère que la cible principale de certains pesticides est la mitochondrie (Zhang et al., 2007). Dans une autre étude, les auteurs ont souhaité également tester l'hypothèse selon laquelle une exposition aux pesticides est susceptible d'induire une toxicité dans une lignée cellulaire dérivée des branchies de la plie *Pralichthysolivaceus*. Les résultats de cette étude ont indiqué que des

concentrations de méthyl parathion allant de 5 à 60 µg/ml étaient toxiques. L'ultrastructure des cellules a également été étudiée. Il a été trouvé que les cellules traitées étaient fortement altérées par le méthyl parathion, comme en témoigne la dilatation des mitochondries (Li et al., 2002).

Les résultats obtenus soulignent l'importance de considérer la spécificité des lignées cellulaires lors de l'évaluation des effets des pesticides. Différentes lignées cellulaires peuvent présenter des réponses différentes, ce qui peut être attribué à des facteurs tels que leur origine tissulaire, leurs caractéristiques génétiques et leur comportement physiologique distinct.

Il est à noter, que les concentrations croissantes de pesticides ont induit une cytotoxicité dose-dépendante pour les pesticides utilisés seuls, celles-ci ont été traduites par une forte mortalité dans les cellules étudiées. La cytotoxicité était plus marquée dans les mélanges de pesticides. L'étude de la cytotoxicité des mélanges a montré que des effets de synergie peuvent avoir lieu. Néanmoins, ces résultats restent préliminaires et ne nous permettent pas de tirer une conclusion sur la cytotoxicité des pesticides. Il convient de signaler que ces tests réalisés nécessitent des confirmations par des tests complémentaires.

Il serait aussi nécessaire de développer des approches qui permettent d'intégrer des paramètres plus pertinents dans la prédiction des effets de mélanges.

Dans la continuité des travaux présentés jusqu'ici, l'objet du chapitre suivant est d'investiguer les effets *in vivo* des pesticides à d'autres échelles, dans le but de répondre à l'objectif premier de notre étude, celui d'obtenir des éléments permettant de mieux apprécier le risque pour l'homme.

# **ETUDE *IN VIVO***

---

### **3. Etude *in vivo***

Dans l'évaluation de risque lié à l'exposition aux pesticides, la problématique des effets combinés des mélanges de produits chimiques constitue un véritable challenge. Dans cette étude *in vivo*, nous avons essayé d'apporter des données expérimentales sur les effets de mélanges de pesticides et d'illustrer notamment la possibilité d'interaction entre les différentes substances contenues dans un mélange.

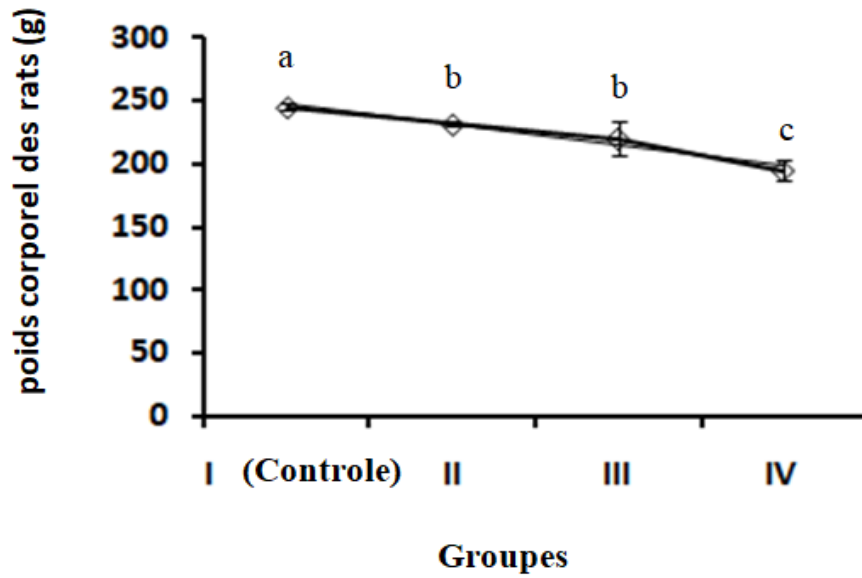
Les espèces réactives de l'oxygène et leur nature hautement destructrice sont connues depuis au moins 30 ans, mais leurs divers effets physiopathologiques sur les organes vitaux sont toujours d'un grand intérêt. Les radicaux libres sont des atomes ou molécules qui contiennent un ou plusieurs électrons. La toxicité de nombreux xénobiotiques est associée à la production de radicaux libres, non seulement toxiques eux-mêmes, mais également impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies.

#### **3.1. Toxicité des mélanges de pesticides**

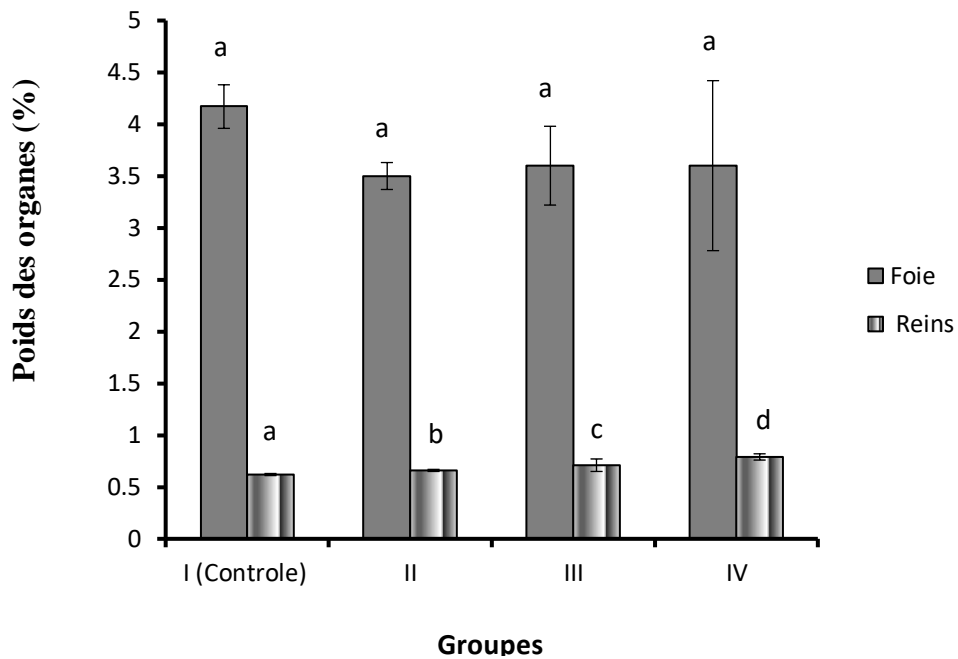
Après 120 jours de traitement, aucune mortalité ou morbidité n'a été enregistrée chez les rats traités. De plus, les animaux n'ont pas montré d'effets toxiques, ni de changements comportementaux ou morphologiques.

#### **3.2. Effet des mélanges sur le poids corporel des animaux et poids relatifs des organes**

Les résultats de l'évaluation de la prise de pesticides sur le poids corporel des animaux et les poids relatifs des organes sont reportés dans les figures 13 et 14, respectivement.



**Figure 13 :** Evolution du poids corporel des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leurs DJA pendant 120 jours.



**Figure 14:** Poids relatifs du foie et des reins des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leurs DJA pendant 120 jours.

Il convient de rappeler que les doses utilisées pour l'exposition des rats sont conformes aux DJAs, ce qui signifie qu'elles sont considérées comme sûres pour la consommation humaine selon les normes réglementaires actuelles.

En examinant le graphique, nous pouvons voir que pour les trois mélanges de pesticides, le poids relatif du foie des rats mâles exposés est significativement plus élevé que



celui des rats témoins non exposés. Cela peut indiquer une hypertrophie du foie en réponse à une exposition prolongée aux pesticides.

En revanche, les poids relatifs des reins des rats mâles exposés aux pesticides ne montrent pas de différence significative par rapport aux rats témoins non exposés. Cela peut indiquer que les reins des rats ont été moins touchés que le foie par l'exposition aux pesticides.

L'évolution pondérale des animaux a montré que le poids corporel des rats traités avec les mélanges de pesticides était légèrement inférieur à celui des rats témoins. Ceci sous-entend qu'aucune variation significative du poids corporel des animaux n'a été enregistrée tout au long de la période d'expérimentation. Des études antérieures ont montré que l'exposition aux pesticides est susceptible de diminuer de façon significative le poids corporel des rats (El-Demerdash et al., 2011). Nos résultats sont également en concordance avec les travaux d'Abolaji et al. (2017) qui ont rapporté que la co-exposition des rats au chlorpyrifos et au carbendazime ont provoqué une diminution dans le poids corporel des animaux qui lui ont été administrés et ont perturbé le poids relatif des reins.

Le graphique présenté sur la figure 14 montre les poids relatifs des foies et des reins des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leurs doses journalières admissibles (DJA) pendant 120 jours. Les doses utilisées pour l'exposition des rats sont conformes aux DJAs, ce qui signifie qu'elles sont considérées comme sûres pour la consommation humaine selon les normes réglementaires actuelles.

Les résultats obtenus ont montré que les poids relatifs des reins ont légèrement diminué chez les animaux des lots traités par les mélanges de pesticides M2 et M3 par comparaison à ceux du lot témoin et ce, de façon significative ( $P < 0,05$ ). Cependant, les poids relatifs des foies chez les rats traités n'étaient pas significativement affectés par le traitement.

**Tableau 3 :** Taux des biomarqueurs hépatiques des différents groupes de rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leur valeur DJA pendant 120 jours.

Groupes	ASAT (U/l) M ± ES	ALAT (U/l) M ± ES	Protéines totales (g/l) M ± ES	Urée (mmol/l) M ± ES	Créatinine (mmol/l) M ± ES
<b>I (Contrôle)</b>	118.37 ± 2.20 <sup>a</sup>	25.71 ± 1.82 <sup>a</sup>	15.53 ± 0.35 <sup>a</sup>	10.30 ± 0.48 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>II</b>	145.15 ± 5.00 <sup>b</sup>	55.30 ± 6.35 <sup>b</sup>	18.48 ± 0.28 <sup>b</sup>	11.91 ± 0.95 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.05 <sup>b</sup>
<b>III</b>	173.75 ± 7.01 <sup>c</sup>	74.04 ± 3.61 <sup>b</sup>	20.27 ± 0.14 <sup>b</sup>	14.24 ± 0.80 <sup>c</sup>	0.99 ± 0.10 <sup>c</sup>
<b>IV</b>	193.43 ± 9.15 <sup>d</sup>	79.89 ± 3.19 <sup>c</sup>	26.82 ± 0.21 <sup>c</sup>	13.30 ± 0.71 <sup>c</sup>	1.20 ± 0.17 <sup>d</sup>

Les transaminases sont des indicateurs importants des lésions hépatiques et de l'altération des fonctions du foie (Shakoori et al., 1990 ; Ozer et al, 2008 ; Lasram et al., 2009). Elles sont responsables des processus de détoxification, de métabolisme et de biosynthèse de macromolécules. Le foie joue un rôle essentiel dans la détoxification de nombreuses substances, à la fois celles produites naturellement par l'organisme (substances intrinsèques) et celles provenant de sources extérieures telles que l'alimentation, les médicaments et l'environnement (substances extrinsèques). En tant qu'organe principal de détoxification, le foie contient différentes enzymes et voies métaboliques qui permettent de neutraliser et d'éliminer les toxines du corps. Les hépatocytes, les cellules principales du foie, sont particulièrement impliqués dans ces processus de détoxification.

Lorsqu'une substance toxique est ingérée, le foie intervient pour la métaboliser et la transformer en une forme moins toxique, qui peut ensuite être éliminée par le système d'excrétion, principalement par les voies biliaires et rénales. Les enzymes hépatiques, y compris les transaminases, participent activement à ces réactions métaboliques de détoxification.

Cependant, la capacité de détoxification du foie n'est pas infinie. L'exposition excessive à des toxines ou une charge toxique élevée peut dépasser les capacités du foie et entraîner des lésions hépatiques. Par conséquent, le foie est considéré comme l'organe le plus exposé aux

toxines ingérées, en raison de son rôle central dans la détoxification et de son contact direct avec les substances absorbées par le système digestif. Des études, telles que celle menée par Acker et Nogueira en 2012, ont mis en évidence l'importance du foie dans la détoxification des substances et ont souligné son rôle prépondérant dans la protection de l'organisme contre les toxines environnementales et les composés potentiellement nocifs. Plusieurs études ont rapporté des associations positives entre l'exposition à des pesticides et les modifications biochimiques pouvant être le résultat des altérations de plusieurs organes (Mossalam et al., 2011 ; Khan et al., 2013), y compris le foie et les reins (Bhardwaj et al., 2010 ; Maalej et al., 2017). Ces derniers jouent un rôle majeur dans la biotransformation des pesticides (Hernández et al. 2005 ; Yehia et al. 2007 ; Hariri et al. 2010).

Les résultats de notre étude (Tableau 3) ont montré que le traitement des rats par les trois mélanges de pesticides a entraîné des troubles du métabolisme chimique, caractérisés par une augmentation significative de l'activité des transaminases chez les groupes traités par rapport au groupe témoin. Plusieurs études ont aussi rapporté que les pesticides peuvent provoquer des changements dans les activités de l'ALAT et de l'ASAT (Gomes et al., 1999 ; Eraslan et al., 2009). Il a été trouvé dans une étude testant les effets d'un mélange de 5 pesticides (abamectine, carbosulfan, fenprothrin, methomyl et profenofos) sur des rats mâles pour une période de 28 jours, que celui-ci augmentait significativement l'activité des transaminases (Mansour et al., 2008). Ces perturbations pourraient être le résultat d'une hépatotoxicité pouvant induire des modifications dans la perméabilité de la membrane plasmique et provoquant ainsi la libération des enzymes dans le plasma (El-Demerdash, 2011 ; Farag et al., 2011).

En ce qui concerne les paramètres de la fonction rénale, les résultats ont montré que les mélanges de pesticides ont significativement augmenté les niveaux de l'urée plasmatique et de la créatinine chez les rats traités avec les mélanges de pesticides par comparaison au groupe témoin. Des changements similaires ont été observés chez des rats et des lapins traités avec des pesticides (Yousef et al., 2003 ; Sankar et al., 2012). L'augmentation observée dans les taux de l'urée et de la créatinine suggère que les mélanges de pesticides utilisés dans cette étude pourraient être néphrotoxique (Edelstein, 2008). L'élévation des niveaux d'urée et de créatinine est souvent considérée comme un indicateur de dysfonctionnement rénal. L'urée est un produit du métabolisme des protéines, tandis que la créatinine est un produit de dégradation musculaire. En temps normal, ces substances sont filtrées par les reins et éliminées dans l'urine. Cependant, lorsque la fonction rénale est altérée, les taux d'urée et de créatinine dans le sang peuvent augmenter.

Ces résultats soulignent l'importance de surveiller les paramètres de la fonction rénale lors de l'évaluation des effets des pesticides sur la santé. Les effets néphrotoxiques des pesticides peuvent avoir des conséquences graves sur la santé, notamment en perturbant l'équilibre hydrique, électrolytique et acido-basique de l'organisme.

Nos résultats ont également révélé une augmentation significative de la concentration sérique des protéines dans tous les groupes traités avec les mélanges de pesticides, par rapport au groupe témoin. Ces observations sont cohérentes avec les résultats d'autres études qui ont également montré que l'exposition aux pesticides peut provoquer des changements dans le métabolisme des protéines (Gomes et al., 1999 ; John et al., 2001). L'exposition aux pesticides peut perturber les voies métaboliques impliquées dans la synthèse des protéines, entraînant une augmentation de leur production. De plus, certains pesticides peuvent interférer avec les mécanismes de dégradation des protéines, entraînant une accumulation de protéines dans le sang. Les protéines jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions biologiques, notamment la structure cellulaire, la régulation des processus enzymatiques, le transport des nutriments et la réponse immunitaire. Ainsi, toute perturbation de leur métabolisme peut potentiellement avoir des effets néfastes sur le fonctionnement normal de l'organisme.

**Tableau 4** : Taux de biomarqueurs lipidiques des différents groupes des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leur valeur DJA pendant 120 jours.

Groupes	Cholesterol Total (mg/dl) M ± ES	Triglycérides (mg/dl) M ± ES	HDL-C (mg/dl) M ± ES	LDL-C (mg/dl) M ± ES
<b>I (Contrôle)</b>	152.41 ± 3.03 <sup>a</sup>	131.46 ± 1.11 <sup>a</sup>	86.50 ± 1.47 <sup>a</sup>	29.62 ± 2.02 <sup>a</sup>
<b>II</b>	124.15 ± 2.43 <sup>b</sup>	143.68 ± 2.45 <sup>a</sup>	66.26 ± 2.63 <sup>b</sup>	29.15 ± 4.23 <sup>a</sup>
<b>III</b>	119.20 ± 1.91 <sup>b</sup>	145.80 ± 3.14 <sup>a</sup>	57.32 ± 1.18 <sup>c</sup>	32.72 ± 1.97 <sup>b</sup>
<b>IV</b>	113.65 ± 2.05 <sup>b</sup>	145.32 ± 2.32 <sup>a</sup>	50.26 ± 2.05 <sup>d</sup>	32.72 ± 1.12 <sup>b</sup>

Plusieurs études ont montré que les pesticides augmentent les niveaux du cholestérol (Takamatsu et al., 1984 ; Tokunaga et Kataoka, 2003 ; Lasram et al., 2009). Cependant, dans

ce travail (Tableau 4), les mélanges de pesticides ont diminué les niveaux de cholestérol sérique des rats. Ces réductions sont conformes avec les résultats enregistrés par Hocine et al. (2016) et Al-Attar et al. (2018). Ces changements peuvent être dus au blocage des voies biliaires hépatiques qui arrête ou réduit l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle (Zaahkoug et al., 2000).

Dans des études menées sur l'exposition de l'homme aux pesticides, plusieurs auteurs ont rapporté des augmentations dans les taux des triglycérides (Baker et al., 1980 ; Chase et al., 1982 ; Goncharov et al., 2008 ; Pothu et al., 2019). Ces études suggèrent que l'exposition aux pesticides pourrait être considéré comme un nouveau facteur de risque dans les maladies cardiovasculaires (Lasram et al., 2009 ; Acker et Nogueira, 2012). Cependant, les résultats de notre étude n'ont montré aucune modification significative des taux des glycérides dans les groupes qui avaient reçu un traitement par les mélanges de pesticides, comparés au témoin.

Les niveaux de peroxydation lipidique (LPO), des activités de la glutathion peroxydase (GPx), de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) dans les tissus hépatiques et rénaux de rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leur valeur DJA pendant 120 jours sont représentés dans le tableau 5.

**Tableau 5 :** Taux de marqueurs des stress oxydatif dans les différents groupes des rats mâles exposés à trois mélanges de pesticides à des doses correspondant à leur valeur DJA pendant 120 jours.

Groupes	I (Contrôle)	II	III	IV
<b>LPO (nmol/mg protein)</b> <b>Foie M ± ES</b>	70.86 ± 1.99 <sup>a</sup>	77.30 ± 3.83 <sup>a</sup>	92.26 ± 5.92 <sup>b</sup>	104.54 ± 8.04 <sup>c</sup>
<b>Reins</b> <b>M ± ES</b>	65.50 ± 3.57 <sup>a</sup>	66.69 ± 3.21 <sup>a</sup>	84.57 ± 2.99 <sup>b</sup>	115.40 ± 4.64 <sup>c</sup>
<b>GPx (U/mg protein)</b> <b>Foie M ± ES</b>	11.08 ± 0.84 <sup>a</sup>	9.11 ± 0.91 <sup>b</sup>	8.43 ± 0.57 <sup>b</sup>	5.97 ± 0.73 <sup>c</sup>
<b>Reins</b> <b>M ± ES</b>	7.36 ± 0.41 <sup>a</sup>	6.92 ± 1.67 <sup>a</sup>	5.44 ± 0.39 <sup>a, c</sup>	4.52 ± 0.56 <sup>c</sup>

<b>SOD (U/mg protein)</b>				
<b>Foie M ± ES</b>	8.09 ± 1.03 <sup>a</sup>	5.73 ± 1.04 <sup>b</sup>	5.49 ± 0.91 <sup>b</sup>	3.38 ± 0.80 <sup>c</sup>
<b>Reins M ± ES</b>	16.74 ± 1.52 <sup>a</sup>	14.75 ± 1.84 <sup>a</sup>	11.68 ± 1.10 <sup>b</sup>	10.73 ± 1.18 <sup>b</sup>
<b>CAT (nmol/min/mg protein)</b>				
<b>Foie M ± ES</b>	374.61 ± 5.88 <sup>a</sup>	351.48 ± 4.25 <sup>b</sup>	312.99 ± 6.99 <sup>c</sup>	285.04 ± 3.79 <sup>d</sup>
<b>Reins M ± ES</b>	169.65 ± 7.78 <sup>a</sup>	154.82 ± 1.81 <sup>b</sup>	151.54 ± 3.27 <sup>b</sup>	140.68 ± 0.29 <sup>c</sup>

Les mélanges des trois pesticides ont provoqué une diminution des activités de CAT, SOD et GPx dans le foie et les reins des rats traités. L'activité réduite des enzymes antioxydantes : CAT, SOD et GPx dans le foie et les reins reflète les effets indésirables de mélanges de pesticides sur le système antioxydant dans les différents tissus. Les enzymes antioxydantes la CAT, la SOD et la GPx sont la première ligne de défense contre le stress oxydatif. Les modifications des activités de ces enzymes affectent le statut redox des cellules. La diminution de la défense antioxydante peut s'expliquer par une concentration accrue de radicaux libres, dépassant leur capacité à les neutraliser. Les modifications de l'activité CAT sont considérées comme une réponse à l'empoisonnement dû aux pesticides (Sayeed et al., 2003). La diminution de l'activité de la SOD chez le rat peut être le résultat de l'inactivation des enzymes suite à l'accumulation de radicaux superoxydes. La SOD est une enzyme clé impliquée dans la neutralisation des radicaux superoxydes, qui sont des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées lors du métabolisme cellulaire. L'analyse des niveaux de LPO dans les tissus hépatiques et rénaux permet d'évaluer l'ampleur des dommages oxydatifs causés par l'exposition aux pesticides (Goel et al., 2005). Un stress oxydatif accru dans certains tissus peut entraîner une élévation des taux de peroxydation lipidique (LPO). La peroxydation lipidique est l'un des mécanismes moléculaires de lésions cellulaires dans les empoisonnements aux pesticides (Halliwell et Chirico, 1993 ; Kehrer, 1993 ; Seth et al., 2001).

Plusieurs auteurs ont confirmé une augmentation des taux de LPO et la diminution des niveaux antioxydants cellulaires dans différents tissus d'animaux exposés aux pesticides (Akhgari et al., 2003 ; Soltaninejad et Abdollahi, 2009 ; Uzun et al., 2010 ; Tiwari et al., 2019). Ojha et al (2011) ont trouvé que le chlorpyrifos, le méthyl parathion et le malathion en combinaison induisent un stress oxydatif dans les tissus des rats traités par ces derniers. Il a aussi été trouvé que l'exposition au chlorpyrifos provoque une augmentation du stress oxydatif dans le corps, comme en témoignent les niveaux des TBARS, accompagnés de diminutions concomitantes des niveaux de la GPx dans le foie, les reins et la rate (Bebe et al., 2003 ; Abdollahi, et al., 2004).

Le stress oxydatif est associé à des dommages au niveau de plusieurs types de molécules, tels les lipides, les protéines et les acides nucléiques (McCord, 2000). La formation de radicaux libres d'oxygène peut être un facteur majeur de la toxicité de nombreux pesticides (Lovaković et al., 2017 ; Iget et al., 2021). Lorsqu'ils sont produits en excès, les radicaux libres et les oxydants génèrent un phénomène appelé le stress oxydant ; ce processus joue un rôle majeur dans le développement de maladies chroniques et dégénératives tels que le cancer, les maladies auto-immunitaires, vieillissement, cataracte, polyarthrite rhumatoïde, maladies cardiovasculaires et maladies neurodégénératives (Matés et al., 1999 ; Farag et al., 2000 ; James et Hall, 2015 ; Moisan et al., 2015 ; Rivero et al., 2015). Le corps humain a plusieurs mécanismes pour faire face au stress oxydatif telle la production des antioxydants, qui sont soit produits naturellement ou fournis par des aliments et/ou suppléments (Butterfield et Lauderback, 2002 ; Zarkovic 2003).

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines non-hémiques responsables de la dismutation des radicaux superoxydes en pyroxyde d'hydrogène et oxygène. Il existe plusieurs types de SOD, caractérisés par l'atome du métal situé au niveau de leur site actif. La catalase humaine est une enzyme clé qui intervient dans la défense contre les dommages oxydatifs. Il s'agit d'une oxydoréductase hémique qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène.

Les glutathions transférases ont une capacité de détoxification. En effet, ce sont des enzymes multifonctionnelles, impliquées dans les processus de désintoxication. Ce rôle est atteint par la conjugaison catalytique du glutathion avec un grand nombre de toxines électrophiles et de cancérigènes. Chez les mammifères, la GST est présente dans tous les tissus et organes. Leur rôle central dans la désintoxication et les voies de résistance aux médicaments chez les mammifères a maintenant été établi (Abolaji et al., 2017), mais des fonctions supplémentaires sont continuellement attribuées à cette famille complexe

d'enzymes. Par exemple, les GST sont des médiateurs importants dans les réponses au stress oxydatif et sont impliqués dans la synthèse des prostaglandines et facilitent le transport intracellulaire de composés hydrophobes.

Il serait intéressant d'étudier la capacité de détoxification du système détoxifiant, notamment la GST.

Les pesticides sont connus pour produire un stress oxydatif en augmentant la génération d'espèces réactives de l'oxygène et en diminuant les niveaux d'antioxydants cellulaires (El-Demerdash, 2011).

Diverses études expérimentales ont permis de confirmer les effets nocifs de certains pesticides. Cependant, la plupart des études *in vitro* et *in vivo* ont étudié les effets des pesticides seuls (Reffstrup et al., 2010 ; Jensen et al., 2013). La formulation d'un pesticide est un mélange de plusieurs ingrédients, tels que les adjuvants et les additifs. De nombreux articles ont également décrit les effets toxiques des pesticides en étudiant leurs principes actifs mais très peu d'études ont été menées sur les effets nocifs des formulations commerciales de pesticides. Les formulations de pesticides contiennent des sous-produits et des adjuvants (solvants, diluants, émulseurs, potentialisateurs) dont la présence peut modifier la toxicité des pesticides (Linnainmaa, 1983). Tous ces produits chimiques devraient être pris en compte dans les recherches sur l'exposition aux pesticides. Tenant compte de tout ce qui précède ; nous nous sommes intéressés, dans cette étude, aux formulations de pesticides telles qu'elles sont trouvées sur le marché.

La dose journalière admissible (DJA) est définie comme le niveau d'absorption d'un produit chimique qui peut être ingéré quotidiennement pendant toute une vie sans aucun risque appréciable pour la santé. Les doses utilisées dans cette étude correspondent aux DJA des pesticides étudiés (JEFCA, 1962).

Nos résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle une exposition chronique à des mélanges de pesticides, utilisant des doses correspondant aux DJA de pesticides, est susceptible d'entraîner des altérations importantes dans différents paramètres biochimiques et des marqueurs de stress oxydatif dans les tissus hépatiques et rénaux. Les résultats de notre étude ont également confirmé le lien entre un régime abondant en fruits et légumes et l'augmentation des risques sur la santé, car celui-ci exposerait le consommateur à un plus grand nombre de substances chimiques, dont les interactions sont difficilement prévisibles.



**ETUDE *IN SILICO***

---

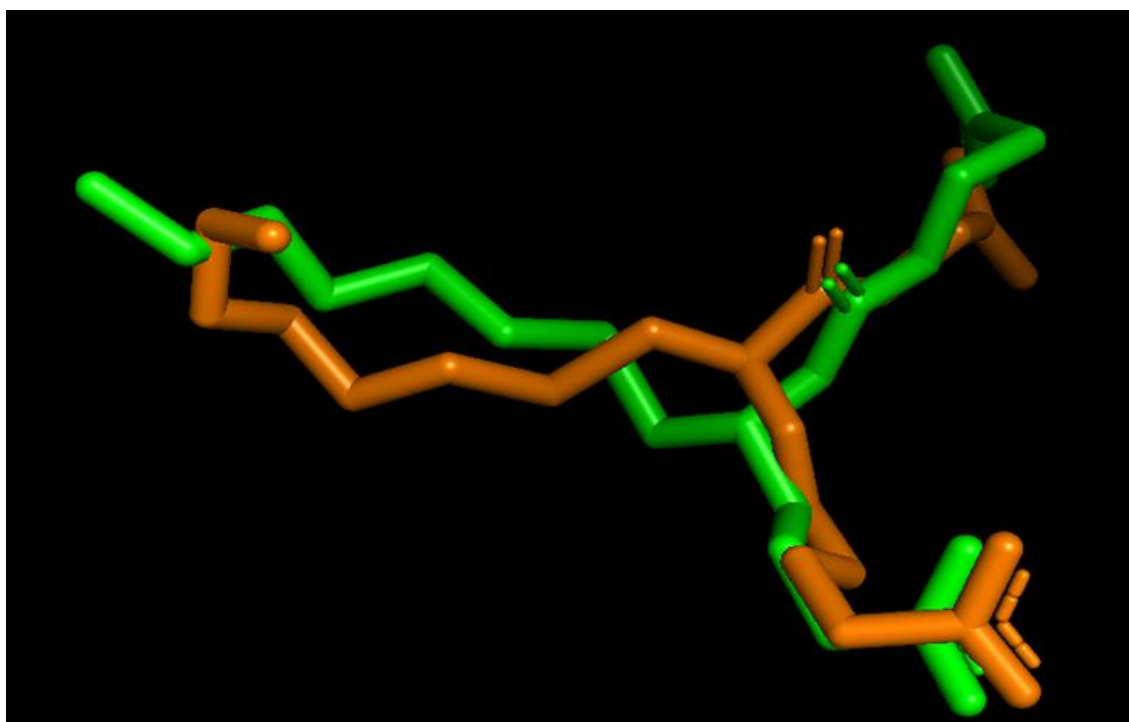
## 4. Résultats de l'étude *in silico*

### 4.1 Etude 1

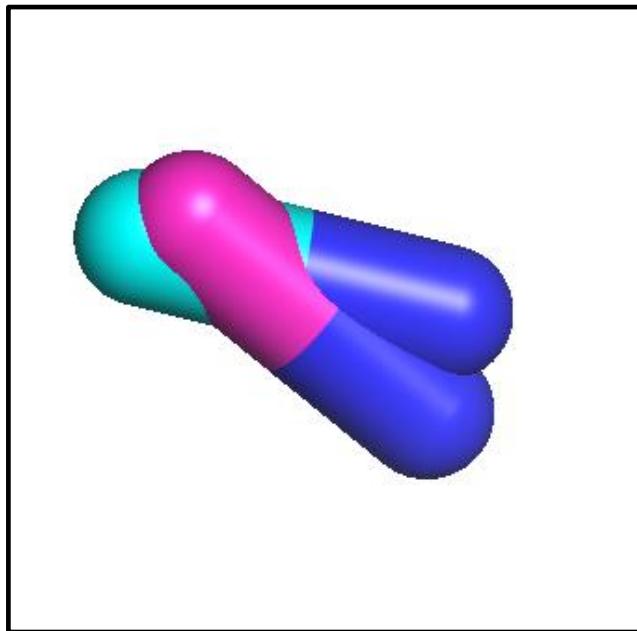
#### 4.1.1. Le test de re-docking

La performance du programme Autodock Vina a été testée avec le re-docking. Pour ce test, nous avons étudié les deux complexes "Glutathion S-transferase - S-hexylglutathion" et "la catalase - cyanide".

La visualisation des résultats du Docking moléculaire a été réalisée à l'aide de Pymol.



**Figure 15** : Superposition de la géométrie du ligand obtenu par rayon-X (colorée en vert) et celle calculée par le Docking moléculaire avec Autodock Vina (colorée en orange) du complexe "Glutathion S-transferase - S-hexylglutathion".



**Figure 16** : Superposition de la géométrie du ligand obtenu par rayon-X et celle calculée par le Docking moléculaire avec Autodock Vina du "la catalase –cyanide".

Plusieurs travaux publiés ont souligné la nécessité d'une validation initiale des protocoles de Docking moléculaire (Kirchmair et al., 2008 ; Madhavi et al., 2013). Le Re-Docking est une approche extrêmement utilisée dans l'évaluation de la précision d'un programme d'amarrage. Il permet de valider les calculs et de vérifier si les paramètres spécifiés pour la simulation, ont été correctement choisis, en recréant la pose originale du ligand co-cristallisé.

Le Re-Docking réalisé dans cette étude a montré que les ligands simulés par le programme Autodock Vina sont correctement placés dans les sites actifs des enzymes étudiées CAT et GST. Ils présentent des conformations spatiales presque superposables à celles déterminées expérimentalement par cristallographie (Figure 15, Figure 16).

#### **4.1.2. Simulation des interactions des pesticides avec la GST, la CAT et la SOD par Docking moléculaire**

Les ligands ont été ancrés dans les enzymes humaines et leurs énergies de liaison (scores) ont ensuite été calculées.

Le score est la donnée numérique qui permet de quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est une présentation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. En d'autres termes, c'est une estimation de l'affinité entre le ligand et le récepteur (Kollman et al., 2000).

Dans le processus de Docking moléculaire, les fonctions de score assurent plusieurs fonctions importantes (Huang et al., 2010 ; Brooijmans et Kuntz, 2003) : elles permettent de déterminer le mode de liaison d'un ligand à une protéine (Hermann et al., 2007) et de prédire l'affinité de liaison entre la protéine et le ligand (Jorgensen, 2009).

Evaluer l'affinité de liaison est une étape importante qui permet de mieux comprendre les interactions moléculaires qui alimentent les processus biologiques. Plus l'énergie de liaison est faible, plus l'affinité du ligand pour cette cible est élevée.

Pour étudier les interactions possibles entre les pesticides et les trois enzymes étudiées, nous avons fait appel aux performances du logiciel Autodock Vina, qui nous a permis d'obtenir les énergies de complexations suivante :

#### 4.1.2.1. Pour la GST

Les énergies libres de liaison ont été calculées, et les différents modes de liaison présentant les meilleures affinités pour la GST ont été étudiés. Les résultats d'affinité obtenus pour les ligands étudiés sont regroupés dans le Tableau 6 ci-dessous.

**Tableau 6** : Les différents scores obtenus lors du Docking moléculaire des pesticides avec la GST(IK3Y).

Pesticide	$\Delta G$ (Kcal/mol)
Lambda cyalothrine	-8.2
Cyperméthrine	-6
Acétamipride	-5.9
Chlorpyriphos	-5.7
Propoxur	-5.7
Diazinon	-5.6
Méthomyl	-4.5
Propinèbe	-3.7

Les résultats ont montré que la lambda cyalothrine, la cyperméthrine et l'acétamipride forment les complexes les plus stables avec la GST (IK3Y), avec les énergies -8.2 kcal/mol, -6 kcal/mol et -5.9 kcal/mol respectivement.

#### 4.1.2.2. Pour la CAT

Les résultats d'affinité obtenus par Docking moléculaire pour les pesticides étudiés avec le site actif de la CAT sont regroupés dans le Tableau 7 ci-dessous.

**Tableau 7** : Les différents scores obtenus lors du Docking moléculaire des pesticides avec la catalase(1DGG).

Pesticide	$\Delta G$ (Kcal/mol)
Lambda cyalothrine	-8
Acétamipride	-5.3
Diazinon	-5.2
Cypermethrine	-5.1
Propoxur	-5.1
Chlorpyrifos	-5.1
Méthomyl	-3.8
Propinèbe	-3.1

Les scores obtenus suite au Docking moléculaire des huit pesticides et le site actif de la catalase montrent que, des huit pesticides étudiés, la lambda cyalothrine et l'acétamipride avaient les énergies de complexation les plus basses qui étaient de -8 Kcal/mol et -5.3 Kcal/mol ; suivi du diazinon avec une énergie de complexation de -5.2 Kcal/mol et de cyperméthrine, propoxur et chlorpyrifos avec la même valeur énergétique pour chacun d'entre eux (-5.1Kcal/mol).

#### 4.1.2.3. Pour la SOD

Les scores obtenus suite au Docking moléculaire des huit pesticides avec le site actif de la SOD sont représentés sur le tableau 8.

**Tableau 8** : Les différents scores obtenus lors du Docking moléculaire des pesticides avec la SOD (5T30).

Pesticide	$\Delta G$ (Kcal/mol)
Lambda cyalothrine	-7.4
Cyperméthrine	-5
Acétamipride	-5
Diazinon	-4.8
Chlorpyriphos	-4.6
Propoxur	-4.6
Méthomyl	-3.7
Propinèbe	-3.1

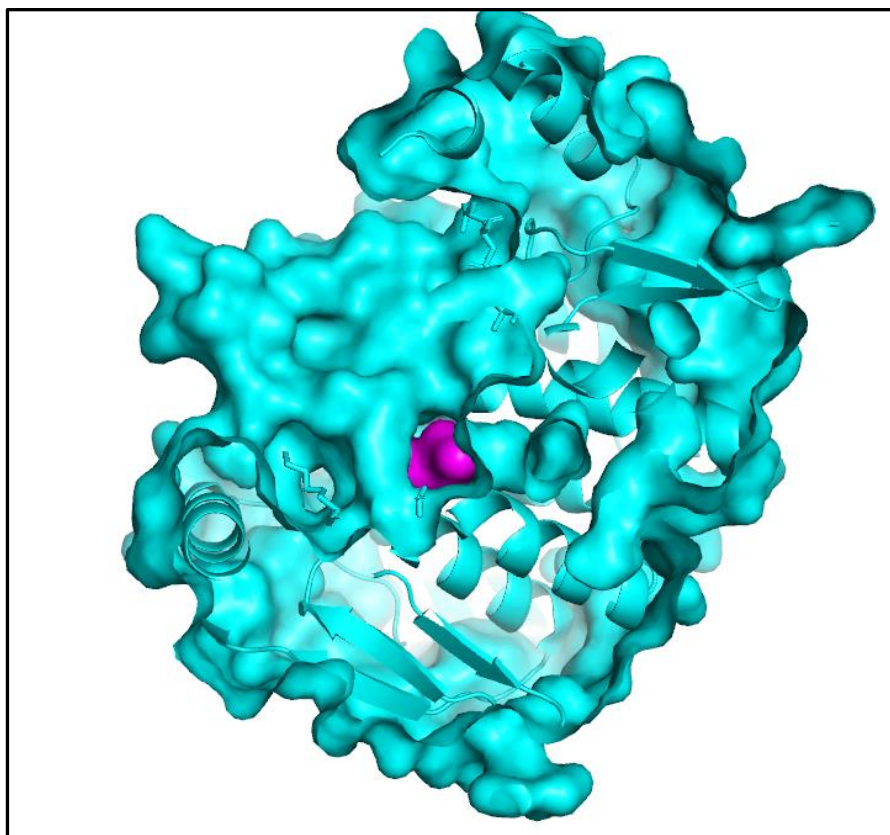
Pour la SOD, les scores obtenus suite au Docking moléculaire des huit pesticides et le site actif de la SOD montrent que la lambda cyalothrine, la cyperméthrine et l'acétamipride ont les énergies de complexation les plus basses qui sont de -7.4 Kcal/mol, -5 Kcal/mol et -5 Kcal/mol respectivement ; suivi du diazinon avec une énergie de complexation de - 4.8 Kcal/mol et de propoxur et chlorpyrifos avec la même valeur énergétique pour chacun d'entre eux (- 4.6 Kcal/mol). Le méthomyl et le propinèbe ont présenté les scores les plus faibles (-3.7 Kcal/mol et -3.1 Kcal/mol respectivement).

#### 4.1.3. Etude des interactions "Enzymes –Pesticides"

Pour chaque enzyme, On a choisi les 3 pesticides qui ont les énergies de complexations les plus basses et ainsi les liaisons les plus fortes. Ce sont donc les ligands qui ont formé les complexes les plus stables avec les enzymes de notre étude.

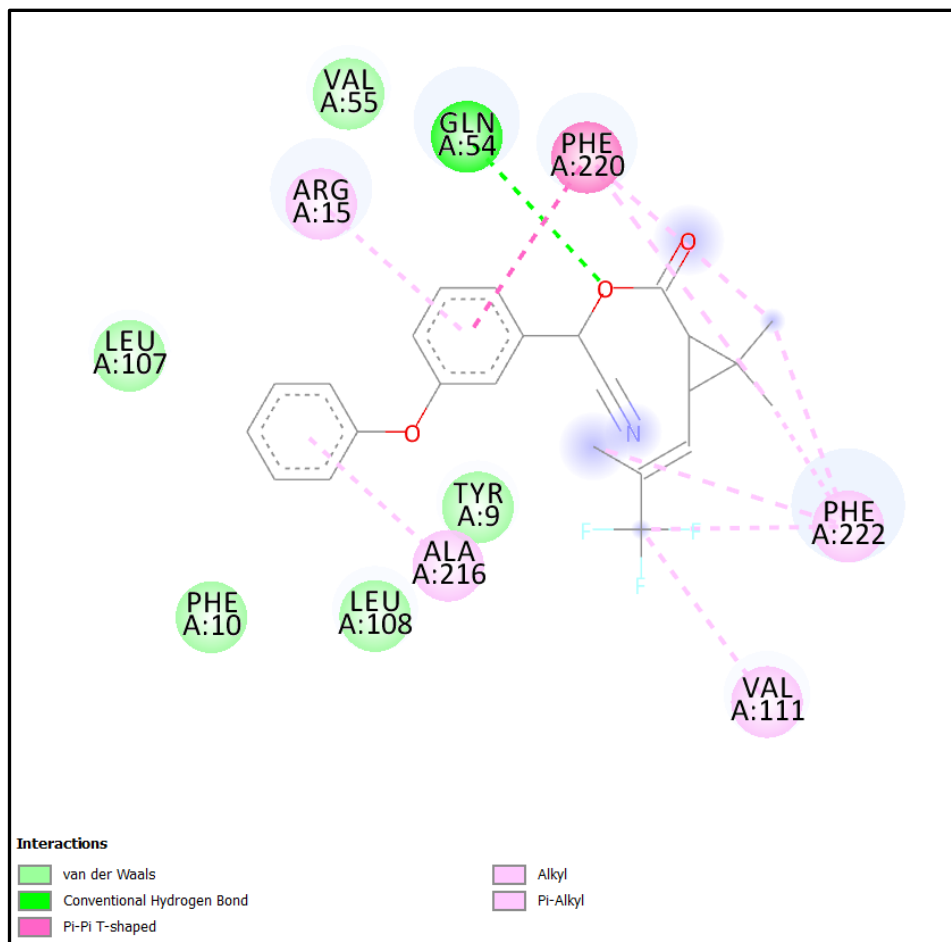
##### 4.1.3.1. Etude des interactions du complexe GST – lambda cyalothrine

La complémentarité géométrique entre la lambda cyalothrine et la GST est présentée sur la figure suivante :



**Figure 17 :** Complémentarité géométrique entre la Lambda cyalothrine et la GST (mode surface/ligand représenté avec la couleur jaune).

Les différentes interactions trouvées suite à la simulation réalisée à l'aide de l'Autodock Vina sont résumées sur la figure 18.



**Figure 18** : Représentation en 2D des interactions entre la lambda cyalothrine et le site actif de la GST et des acides aminés impliqués.

La lambda cyalothrine se positionne au sein du site actif de la GST en formant diverses interactions comme résumé dans le tableau 9.



**Tableau 9:** Les principales interactions entre lambda cyalothrine et la GST (1K3Y).

<b>Interactions</b>	<b>Acides aminés Impliqués</b>	<b>Distance (Å)</b>
Liaison hydrogène	GLN54	2.63447
Hydrophobique Pi-Pi	PHE220	4.70572
Hydrophobique Alkyl	VAL111	3.84015
Hydrophobique Pi-Alkyl	ARG15	5.5484
	ALA216	5.681
	PHE220	5.39025
		4.58415
	PHE222	5.16179
		4.12833
		4.43125
		4.10055

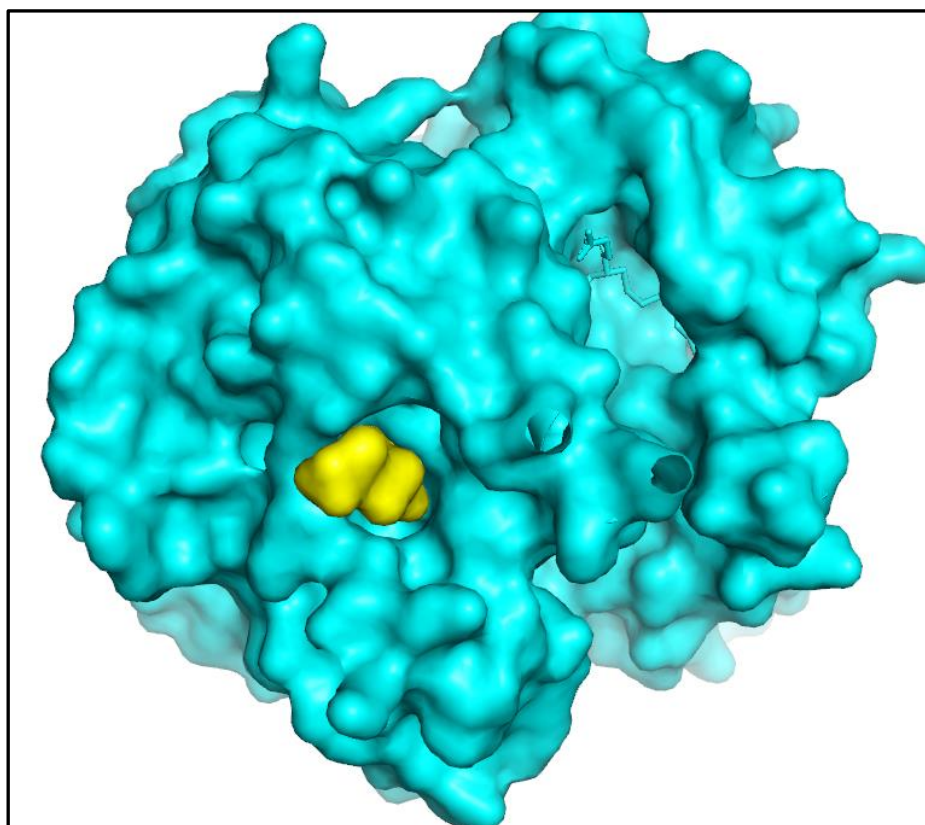
L'estimation de la complémentarité géométrique est un critère important dans la prédiction des complexes. Nos résultats structuraux sur le complexes Lambda cyalothrine-GST ont montré que le ligand se positionne correctement dans le site actif de la GST (Tableau9).

Le Docking du complexe 1K3Y-lambda cyalothrine a abouti aux résultats illustrés sur la figure 18. Celles-ci nous renseignent sur le mode d'interaction de la lambda cyalothrine au

sein du site actif de la GST humaine (1K3Y). Le complexe forme a été stabilisé par deux types de liaison, une liaison hydrogène avec le résidu GLN54 et des liaisons hydrophobes avec les résidus PHE220, VAL111, ARG15, ALA216, PHE220 et PHE222.

#### 4.1.3.2. Etude des interactions du complexe GST-Cyperméthrine

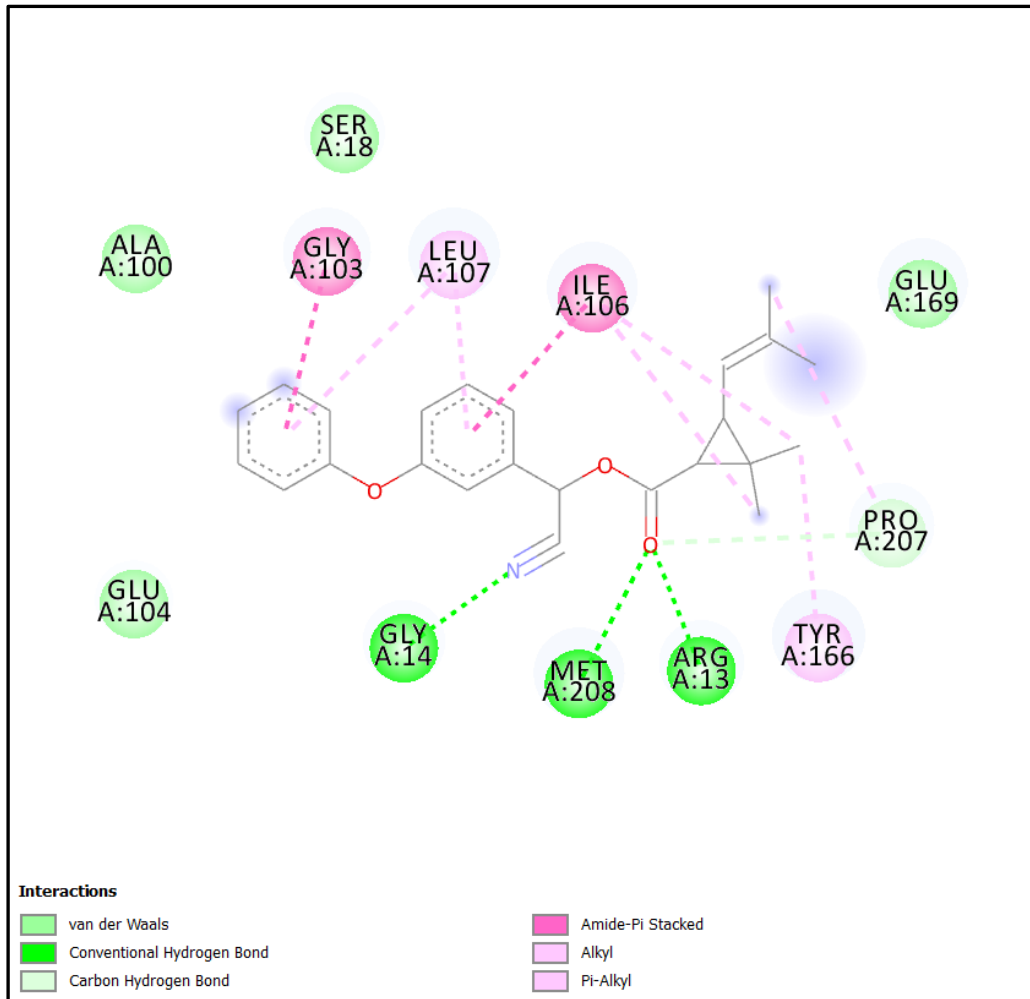
La complémentarité géométrique entre la cyperméthrine et la GST est présentée sur la figure suivante :



**Figure 19 :** Complémentarité géométrique entre la cyperméthrine et la GST (mode surface/ligand représenté avec la couleur jaune).

Cette interaction entre la cyperméthrine et la GST peut avoir plusieurs conséquences. Tout d'abord, cela peut conduire à une diminution de l'efficacité de la GST dans la détoxification des composés toxiques, car elle est occupée par la cyperméthrine. De plus, la liaison de la cyperméthrine à la GST peut potentiellement inhiber l'activité enzymatique de la GST, ce qui peut avoir des effets néfastes sur les processus de détoxification de l'organisme.

La figure suivante schématise et résume les différentes interactions trouvées suite à la simulation réalisée à l'aide de l'Autodock Vina :



**Figure 20 :** Représentation en 2D des interactions entre la cyperméthrine et le site actif de la GST et des acides aminés impliqués.

La cyperméthrine se positionne au sein du site actif de la GST en formant diverses interactions comme résumé dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Les principales interactions entre la cyperméthrine et la GST (1K3Y).

<b>Interactions</b>	<b>Acides aminés Impliqués</b>	<b>Distance (Å)</b>
Liaison hydrogène	ARG13	2,226
	GLY14	2,24947
	MET208	2,17843
	ARG13	3,53116
	PRO207	3,11453
Hydrophobique Amide-Pi	GLY103 GLU104	4,1556
	ILE106 LEU107	4,73839
	ILE106	5,15587
		5,02183
Hydrophobique Alkyl	PRO207	4,10206
	LEU107	4,46919
		5,10442
Hydrophobique Pi-Alkyl	TYR166	4,85909

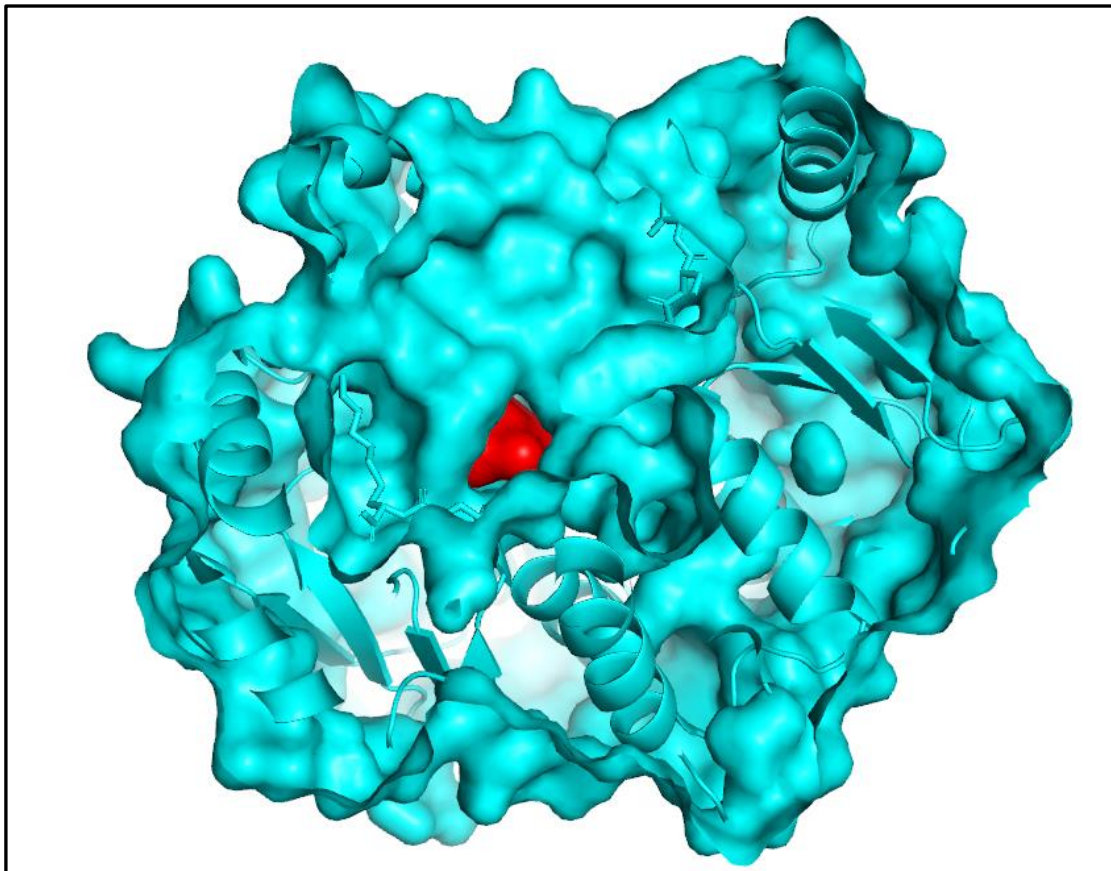
L'étude de la complémentarité géométrique de la cyperméthrine et la GST (Figure20) a montré que ce pesticide a été bien placé dans la cavité du site actif de la GST étudiée.

L'étude de la complémentarité de forme et des propriétés physicochimiques entre une protéine et un ligand est essentielle pour savoir si l'environnement, dans lequel s'effectuent les différents contacts entre les ligands et les récepteurs, est suffisamment favorable. Elle nous renseigne sur le mode d'inclusion du ligand, mais les informations qu'elle nous fournit restent insuffisantes pour étudier les modes d'interaction des ligands au sein d'un récepteur donné.

Les résultats du Docking moléculaire de la cyperméthrine au sein du site actif de la GST humaine (IK3Y) ont montré que le complexe formé est a été stabilisé par des liaisons hydrogènes avec les résidus ARG13, GLY14, MET208, ARG13, PRO207. Des liaisons hydrophobes avec les résidus GLY103, GLU104, ILE106, LEU107, ILE106, PRO207, LEU107 et TYR166 ont aussi été formées.

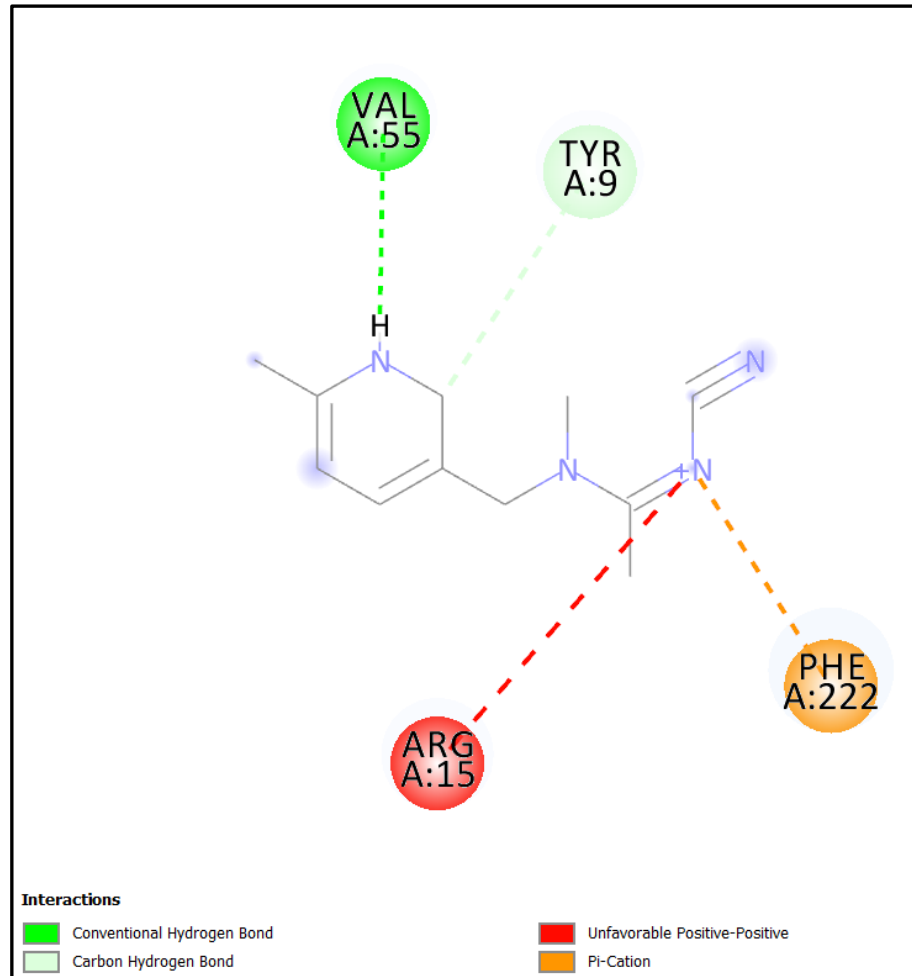
#### 4.1.3.3. Etude des interactions du complexe GST– Acétamipride

La complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la GST est présentée sur la figure 21.



**Figure 21 :** Complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la GST (mode surface/ligand représenté avec la couleur rouge).

La figure suivante schématise et résume les différentes interactions trouvées suite à la simulation réalisée à l'aide de l'Autodock Vina.



**Figure 22** : Représentation en 2D des interactions entre l'acétamipride et le site actif de la GST et des acides aminés impliqués.

L'acétamipride se positionne au sein du site actif de la GST, les résidus qui ont participé à la formation des liaisons sont cités dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Les principales interactions entre l'acétamipride et la GST (1K3Y).

<b>Interactions</b>	<b>Acides aminés Impliqués</b>	<b>Distance (Å)</b>
Liaison hydrogène	VAL55	2,29624
Liaison hydrogène	TYR9	3,31218
Electrostatic Pi-Cation	PHE222	4,40067

La complémentarité géométrique entre la GST et l'acétamipride a montré que ces derniers sont parfaitement emboîtés.

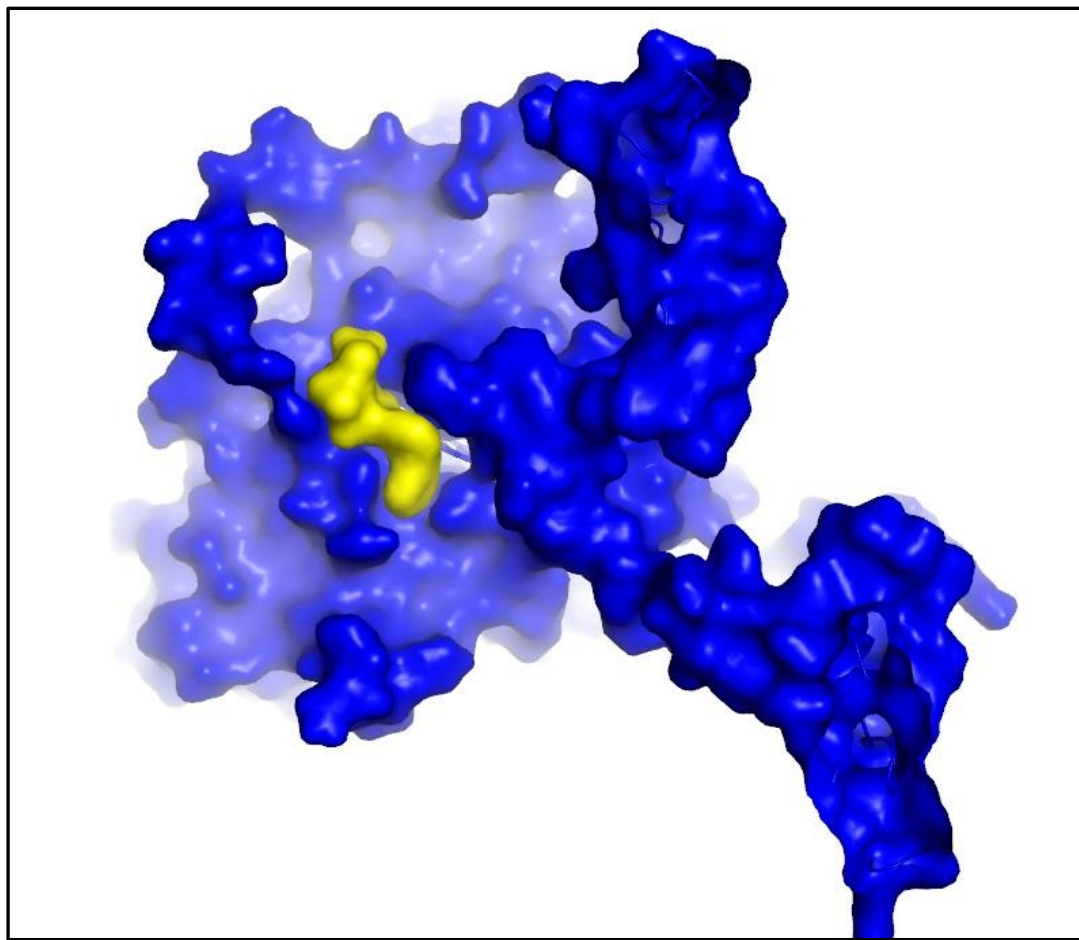
Le site actif de la GST est la région de l'enzyme où le substrat, dans ce cas l'acétamipride, se lie et réagit chimiquement. Les interactions entre l'acétamipride et le site actif de la GST peuvent être de différents types, notamment des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes.

Certains acides aminés de la GST peuvent jouer un rôle clé dans ces interactions. Par exemple, les résidus de cystéine dans la GST peuvent former des liaisons covalentes avec l'acétamipride, facilitant ainsi sa détoxification. Les résidus d'histidine et de tyrosine peuvent être impliqués dans des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène avec l'acétamipride.

L'arrimage du complexe 1K3Y-acetamipride a fourni les modes d'interaction précédemment illustrés (tableau 11, figures 20 et 21). Le complexe formé a été principalement stabilisé par des liaisons hydrogènes. Celles-ci, ont été formées avec les deux résidus VAL55 et TYR9. Une autre interaction de type électrostatique a aussi été formée avec le résidu PHE222.

#### **4.1.3.4. Etude des interactions du complexe CAT– Lambda cyalothrine**

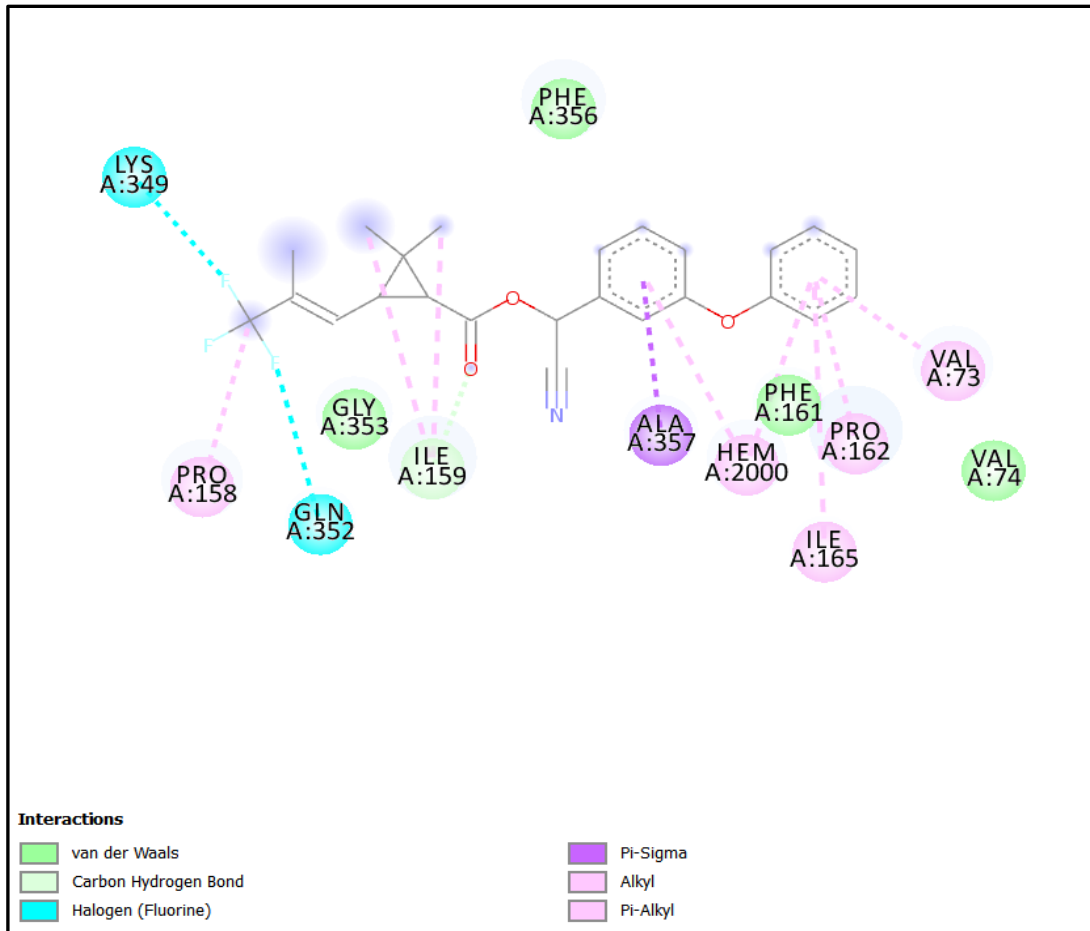
La complémentarité géométrique entre la lambda cyalothrine et la catalase est présentée sur la figure suivante :



**Figure 23 :** Complémentarité géométrique entre la Lambda cyalothrine et la CAT (mode surface/ligand représenté avec la couleur jaune).

La figure 24 schématise et résume les différentes interactions trouvées suite à la simulation réalisée à l'aide de l'Autodock Vina.





**Figure 24** : Représentation en 2D des interactions entre la lambda cyalothrine et la catalase et des acides aminés impliqués.

La Lambda cyalothrine se positionne au sein du site actif de la catalase en formant diverses interactions comme résumé dans le tableau suivant :

**Tableau 12** : Les principales interactions entre la lambda cyhalothrine et la catalase (1DGG).

<b>Interactions</b>	<b>Acides aminés Impliqués</b>	<b>Distance (Å)</b>
Liaison hydrogène	ILE159	3.28
Liaisons halogènes	LYS349	3.64
	GLN352	3.19
Hydrophobique Pi-sigma	ALA357	3.77
Hydrophobique Alkyl hydrophobique	ILE159	4.92
	ILE159	3.86
	PRO158	5.04
Hydrophobique Pi-alkyl	HEM2000	4.71
	VAL73	4.32
	PRO162	4.80
	ILE165	5.24
	HEM2000	5.14

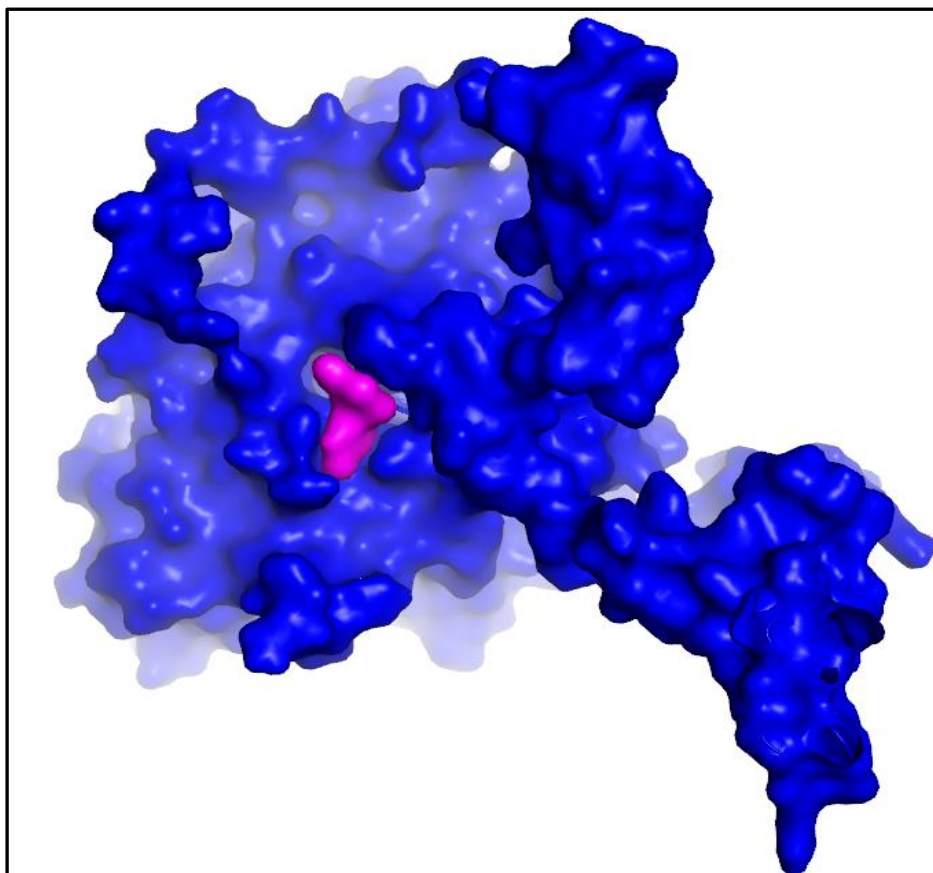
L'étude de docking moléculaire entre la lambda cyhalothrine (un insecticide de la famille des pyréthrinoïdes) et l'enzyme humaine (1DGG) indique la formation d'un complexe stabilisé par plusieurs types de liaisons, notamment des liaisons hydrogène, des liaisons halogènes et des liaisons hydrophobes.

Plus précisément, les interactions résultant de cette liaison sont les suivantes :

- Liaison hydrogène avec le résidu ILE159 : La lambda cyhalothrine forme une liaison hydrogène avec l'acide aminé ILE159 de l'enzyme. Les liaisons hydrogène sont des interactions faibles mais importantes dans la reconnaissance moléculaire.
- Liaisons halogènes avec les résidus LYS349 et GLN352 : Les liaisons halogènes sont des interactions spécifiques entre un atome d'halogène (comme le chlore dans la lambda cyhalothrine) et un donneur d'électron approprié (dans ce cas, les résidus LYS349 et GLN352). Ces interactions peuvent contribuer à la stabilité du complexe.
- Liaisons hydrophobes avec les résidus ALA357, ILE159, PRO158, HEM2000, VAL73, PRO162, ILE165 et HEM2000 : Les liaisons hydrophobes sont des interactions entre des régions non polaires des molécules. Dans ce cas, la lambda cyhalothrine forme des liaisons hydrophobes avec plusieurs résidus de l'enzyme, notamment ALA357, ILE159, PRO158, HEM2000, VAL73, PRO162, ILE165 et HEM2000. Ces interactions peuvent contribuer à la stabilité et à l'ancrage du complexe formé.

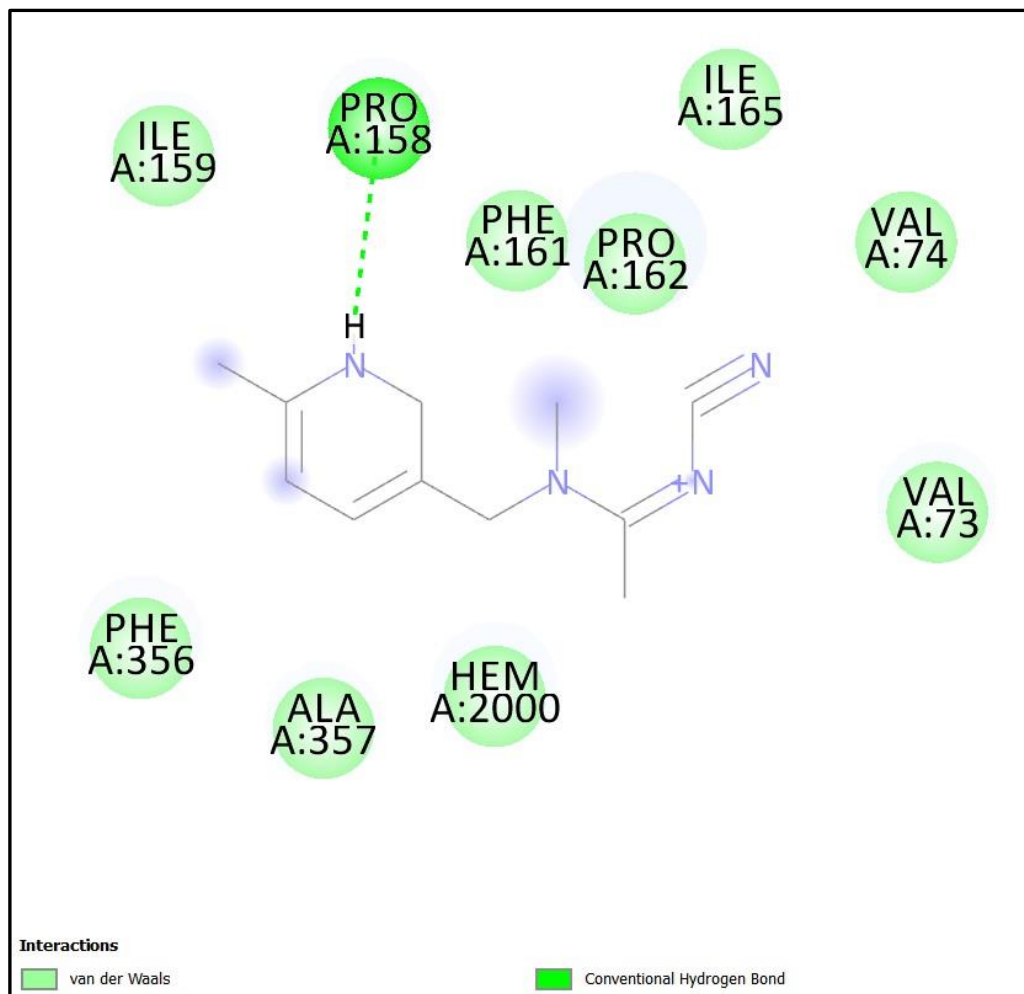
#### 4.1.3.5. Etude des interactions CAT – Acétamipride

La complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la catalase est présentée sur la figure suivante :



**Figure 25** : Complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la CAT.

Les différentes interactions trouvées suite à la simulation à l'aide de l'Autodock Vina, sont résumées sur la figure 26.



**Figure 26** : Représentation en 2D des interactions entre l'acétamipride et le site actif de la catalase et des acides aminés impliqués.

L'acétamipride en se positionnant dans le site actif de la catalase humaine (1DGG), il aboutit à la formation de liaison illustrée dans le tableau 13.

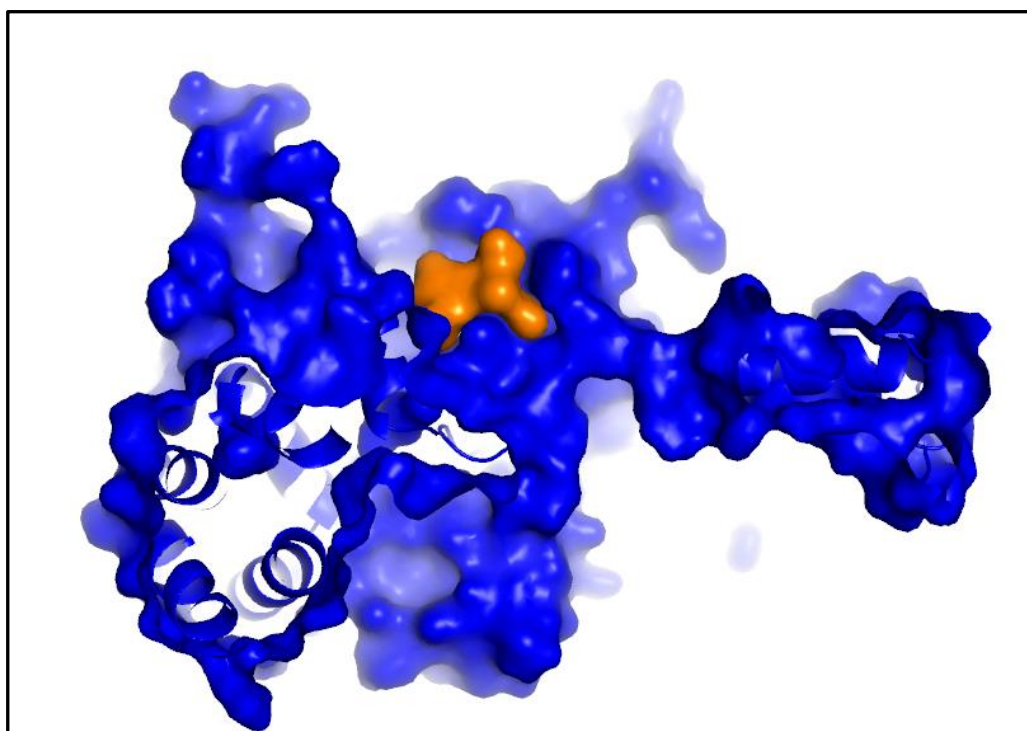
**Tableau 13** : Les principales interactions entre l'acétamipride et la catalase (1DGG).

Interaction	Acide aminé impliqué	Distance (Å)
Liaison hydrogène	PRO158	1.99

Les résultats du Docking moléculaire indiquent que l'acétamipride, lorsqu'il est placé dans le site actif de la catalase, forme une liaison hydrogène avec l'acide aminé PRO158. Les liaisons hydrogène sont des interactions faibles, mais elles peuvent jouer un rôle important dans la reconnaissance moléculaire et la stabilité des complexes ligand-protéine.

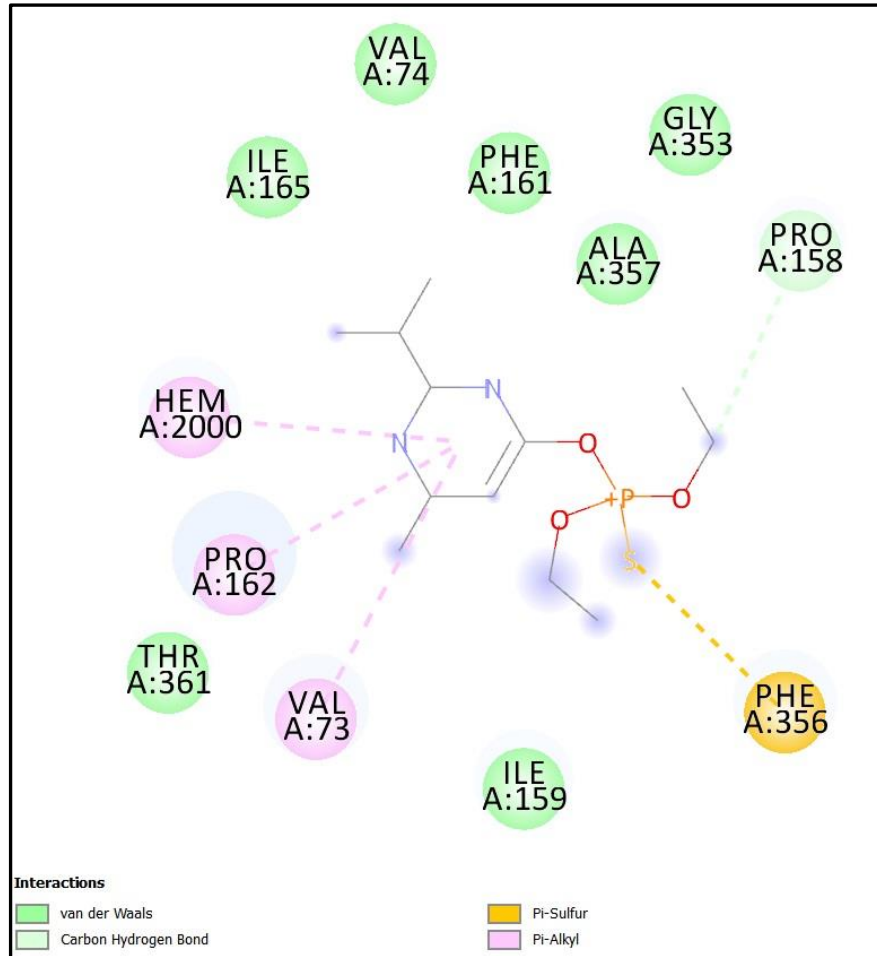
#### 4.1.3.6. Etude des interactions du complexe Catalase – Diazinon

De la même manière la complémentarité géométrique entre le diazinon et la catalase humaine (1DGG) est présentée sur la figure 27.



**Figure 27** : Complémentarité géométrique entre le diazinon et la CAT (mode surface/ligand représenté avec la couleur orange).

La figure suivante schématise et résume les différentes interactions trouvées suites aux simulations réalisées à l'aide de l'Autodock Vina.



**Figure 28:** Représentation en 2D des interactions entre le diazinon et le site actif de la catalase et des acides aminés impliqués.

Le diazinon se positionne au sein du site actif de la catalase et aboutit à la formation des interactions résumées dans le tableau suivant

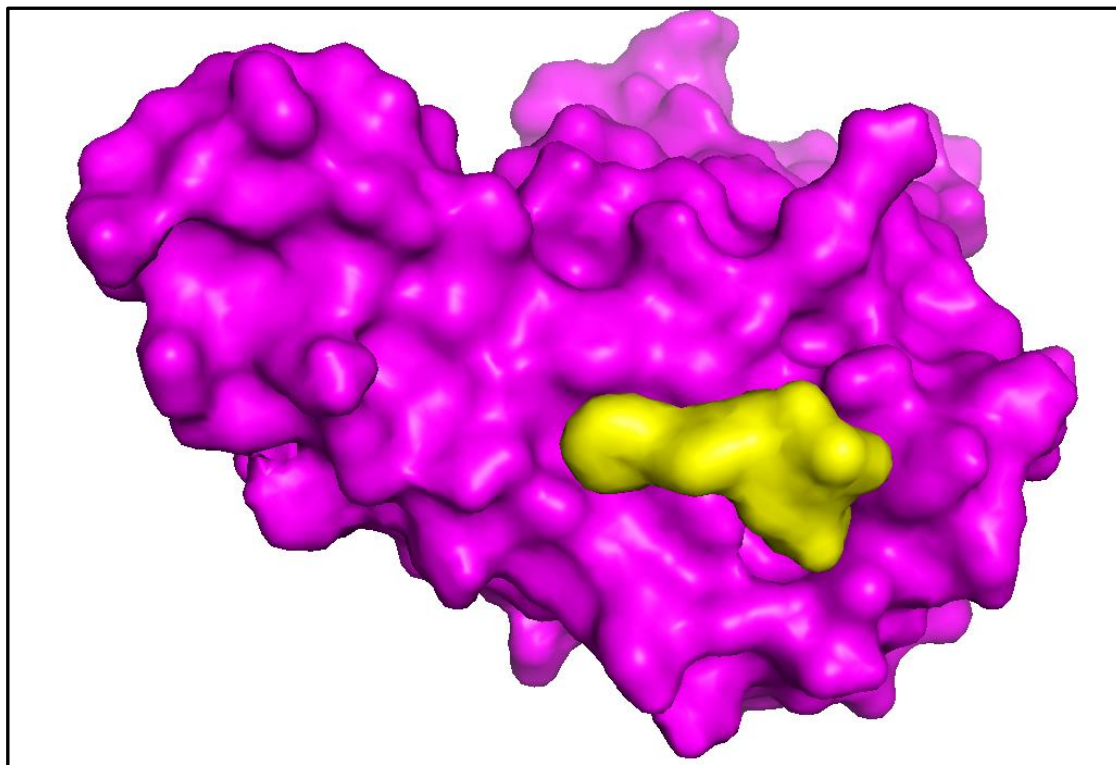
**Tableau 14** : Les principales interactions entre le diazinon et la catalase (1DGG).

<b>Interactions</b>	<b>Acides aminés Impliqués</b>	<b>Distance (Å)</b>
Liaison hydrogène	PRO158	3.69
Pi-sulfure	PHE356	5.02
Hydrophobique  Pi-alkyl	VAL73	5.19
	PRO162	5.05
	HEM2000	4.56

Nos résultats présentés sur le tableau 14 montrent que la formation du complexe 1DGG-diazinon a abouti à la formation de plusieurs types de liaisons, des liaisons hydrophobes ont été formées avec les résidus VAL73, PRO162 et HEM2000, une liaison hydrogène avec le résidu PRO158 et une liaison Pi-sulfure avec l'acide aminé PHE356.

#### 4.1.3.7. Etude des interactions du complexe SOD – Lambda cyalothrine

La complémentarité géométrique entre la lambda cyalothrine et la SOD est présentée sur la figure suivante :

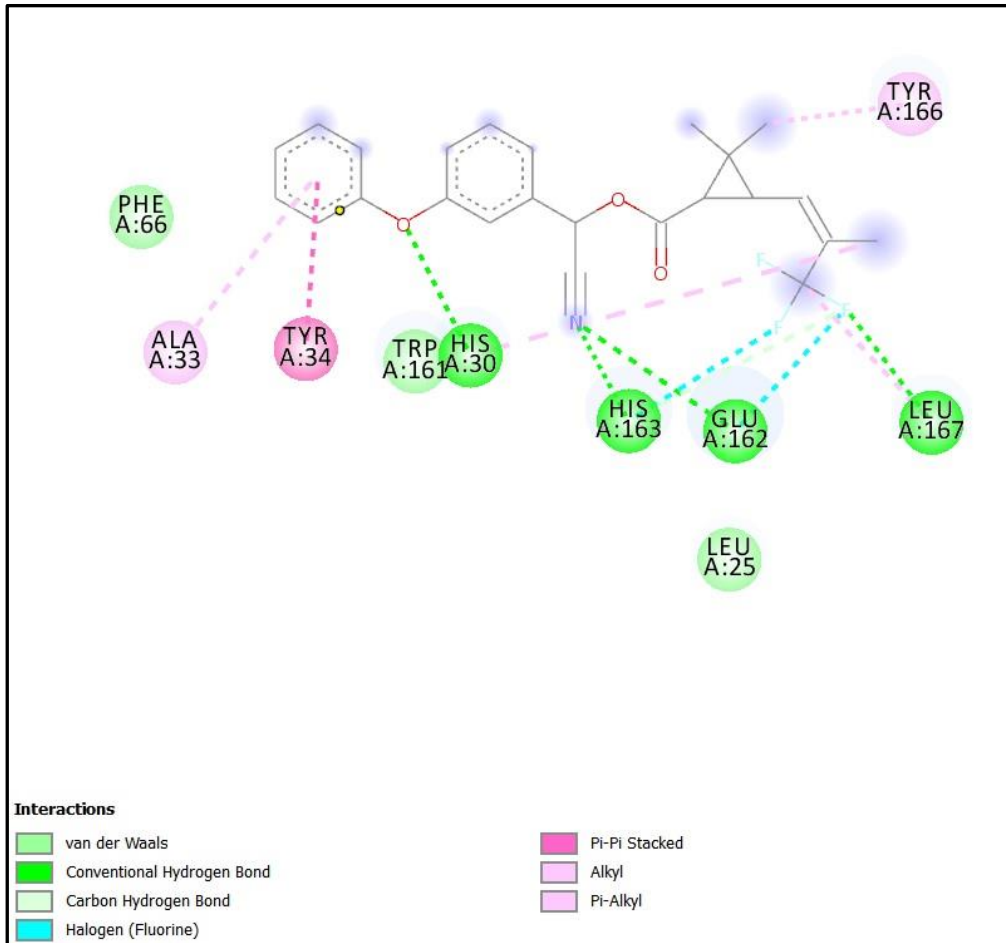


**Figure 29** : Complémentarité géométrique entre la lambda cyalothrine et la SOD (mode surface/ligand représenté en couleur jaune).

La complémentarité géométrique entre la lambda-cyhalothrine et la SOD se réfère à la forme et à la structure des deux molécules qui leur permettent de s'interagir de manière spécifique. Les enzymes comme la SOD possèdent des sites actifs qui peuvent se lier à des substrats spécifiques de manière à catalyser des réactions chimiques.

La figure suivante schématise et résume les différentes interactions qui ont été trouvées suite aux simulations réalisées à l'aide du Docking moléculaire.





**Figure 30:** Représentation en 2 D des interactions entre la lambda cyalothrine et le site actif de la SOD et des acides aminés impliqués.

La lambda cyalothrine en se positionnant au sein du site actif de la SOD, a permis la formation de diverses interactions (tableau 15).

**Tableau 15** : Les principales interactions entre la Lambda cyalothrine et la SOD (5T30).

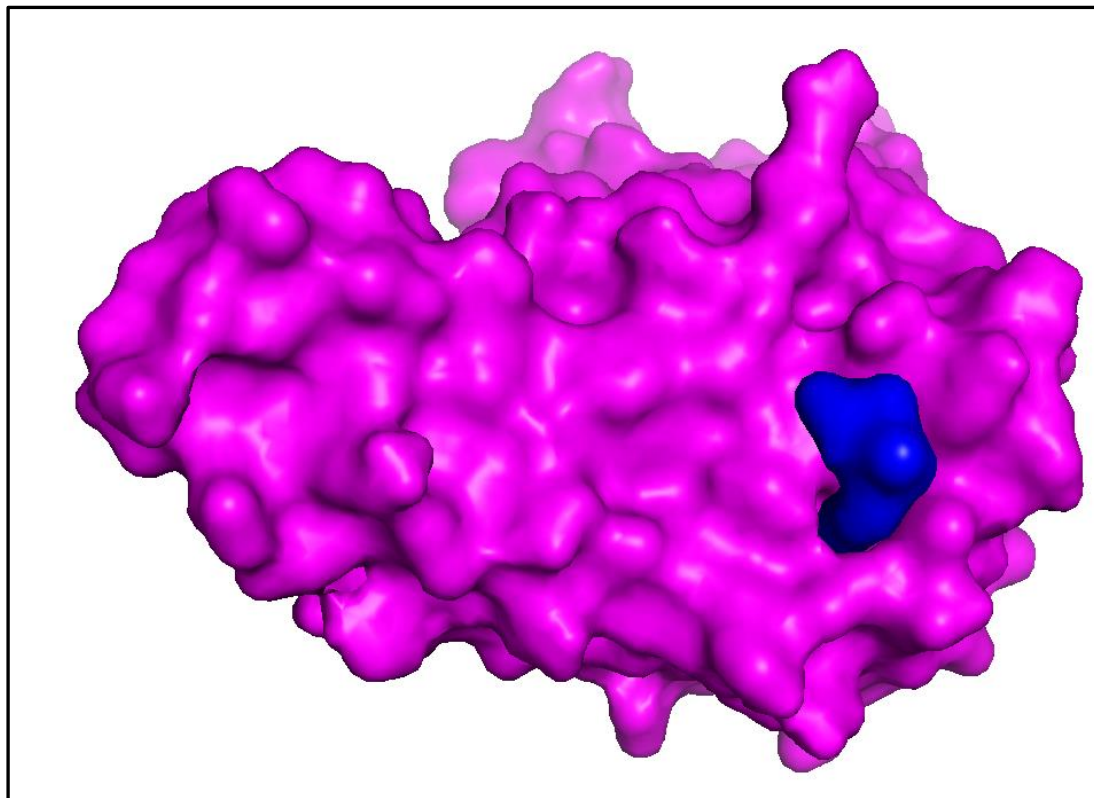
<b>Interactions</b>	<b>Acides aminés Impliqués</b>	<b>Distance (Å)</b>
Liaison hydrogène	HIS30	2.25
	GLU162	2.82
	HIS163	1.95
	LEU167	2.93
	HIS163	3.38
Halogènes	GLU162	3.53
	HIS163	3.48
Hydrophobique Pi – pi	TYR34	4.29
Hydrophobique Alkyl	LEU167	4.06
Hydrophobique Pi-alkyl	HIS30	4.86
	TYR166	3.70
	ALA33	4.90

Les modes d'interaction régissant la formation du complexe 5T30-lambda cyalothrine ont abouti à la formation de plusieurs types de liaisons dont des liaisons hydrogène et des liaisons hydrophobes avec 12 résidus différents (Tableau 15).

La complémentarité géométrique a montré que le ligand étudié est bien placé dans la cavité de l'enzyme humaine étudiée (5T30).

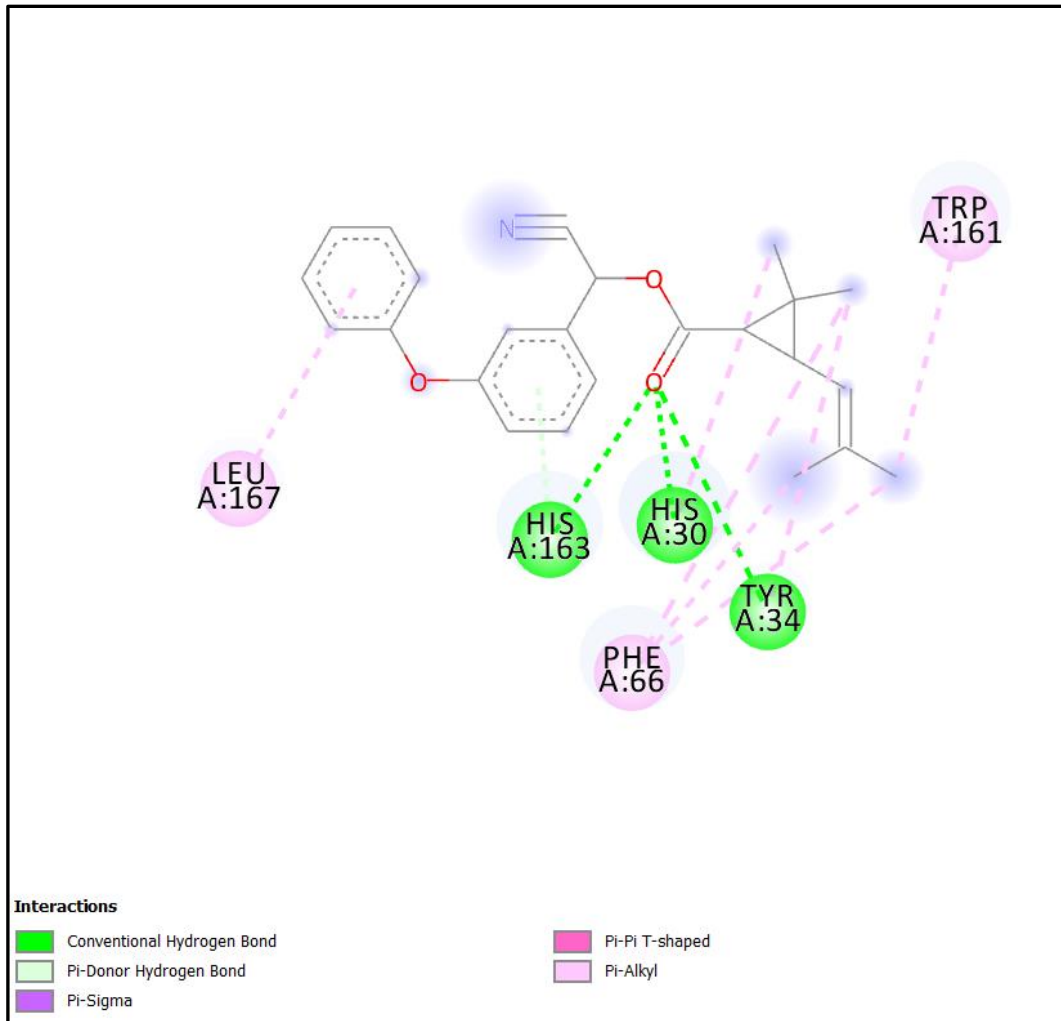
#### **4.1.3.8. Etude des interactions du complexe SOD – Cyperméthrine**

De la même manière la complémentarité géométrique entre et la cyperméthrine et la SOD est présentée sur la figure suivante :



**Figure 31** : Complémentarité géométrique entre la cyperméthrine et la SOD (mode surface/ligand représenté en couleur bleu)

La figure suivante schématise et résume les différentes interactions trouvées suite à la simulation réalisée à l'aide de l'Autodock Vina.



**Figure 32:** Représentation en 2D des interactions entre la cyperméthrine et le site actif de la SOD et des acides aminés impliqués.

La cyperméthrine se positionne au sein du site actif de la SOD en formant diverses interactions comme résumé dans le tableau suivant :

**Tableau 16** : Les principales interactions entre la cyperméthrine et la SOD (5T30).

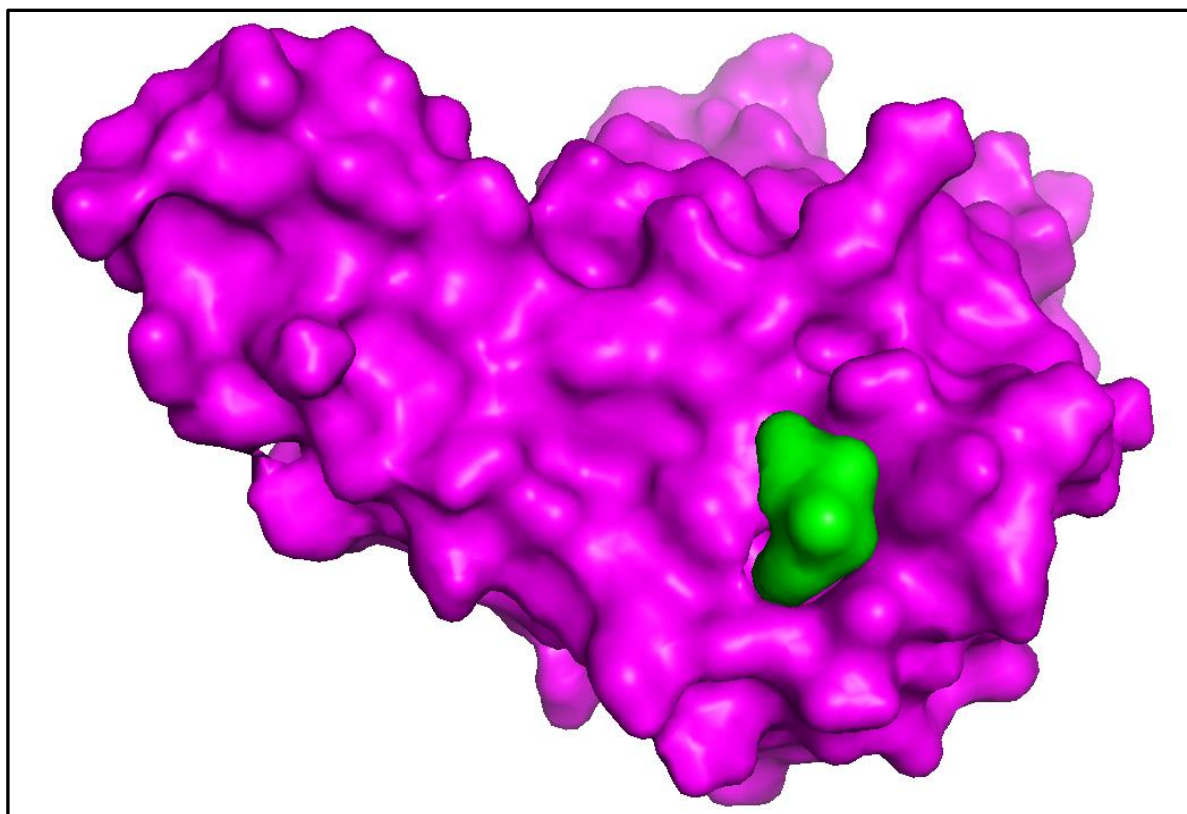
<b>Interactions</b>	<b>Acides aminés Impliqués</b>	<b>Distance (Å)</b>
Liaison hydrogène	HIS30	2,03184
	TYR34	2,93651
	HIS163	2,97667
		3,09215
Hydrophobic Pi-Sigma	HIS163	3,8333
Hydrophobic Pi-Pi	HIS163	4,9975
Hydrophobic Pi-Alkyl	LEU167	4,92853
	HIS30	5,1917
	TYR34	4,62792
	PHE66	4,90465
		5,37869
		4,51283
	TRP161	4,8567

La visualisation des interactions entre la cyperméthrine et le site actif de la SOD a montré l'existence de liaison hydrogène formée avec les résidus HIS30, TYR34 et HIS163.

Le composé a également été stabilisé par des interactions hydrophobiques par les résidus HIS163, LEU167, HIS30, TYR34, PHE66 et TRP161.

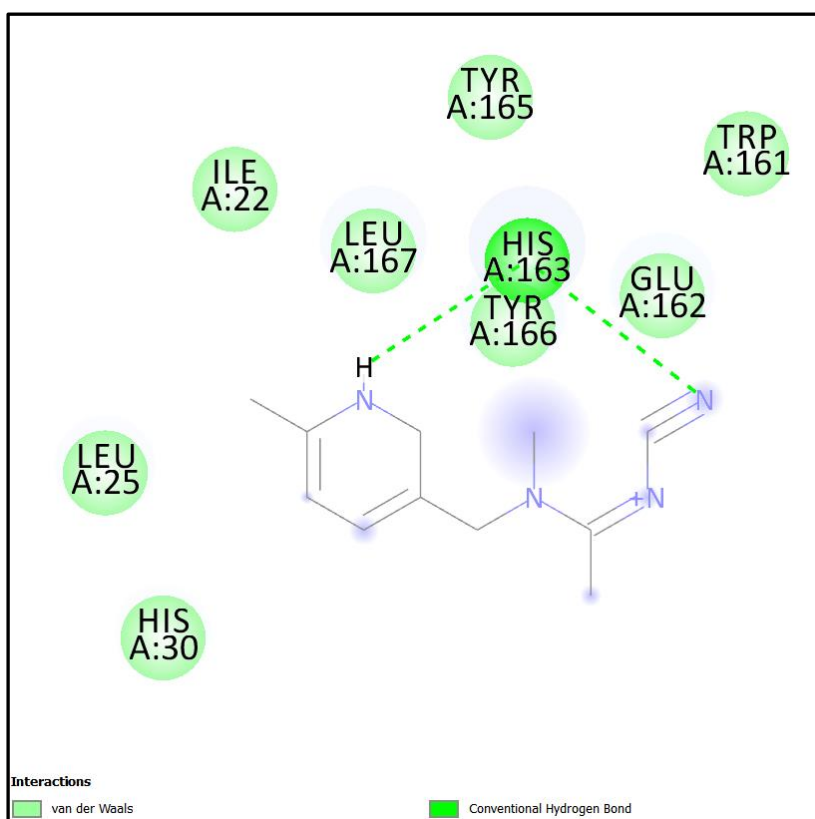
#### **4.1.3.9. Etude des interactions du complexe SOD – Acétamipride**

De la même manière la complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la SOD est présentée sur la figure suivante :



**Figure 33 :** Complémentarité géométrique entre l'acétamipride et la SOD (mode surface/ligand représenté en couleur verte).

La figure suivante schématise et résume les différentes interactions trouvées suite à la stimulation réalisée à l'aide de l'Autodock Vina



**Figure 34 :** Représentation en 2D des interactions entre l’acétamipride et le site actif de la SOD et des acides aminés impliqués.

L’acétamipride placé dans le site actif de la SOD a abouti aux interactions résumées dans le tableau 17.

**Tableau 17 :** Principales interactions entre l’acétamipride et la SOD (5T30).

Interactions	Acide aminé impliqué	Distance (Å)
Liaison hydrogène	HIS163	2.26
		2.65

Les interactions entre la cyperméthrine et le site actif de la SOD ont montré que les liaisons mises en jeu dans la formation du complexe étaient de type liaison hydrogène.

L’objectif de notre travail était d’appliquer les techniques du Docking moléculaire permettant de prédire le mode d’inclusion et le mode d’interaction de chacun des pesticides

étudiés au sein des sites actifs des trois enzymes (GST, CAT et SOD) d'une part et l'évaluation de leurs énergie d'interactions (scoring) d'autre part.

Nous avons choisi, dans cette partie, d'étudier les interactions pouvant avoir lieu entre les pesticides et les GST plutôt que d'étudier la GPx, car ces dernières ont une capacité de détoxification. En effet, ce sont des enzymes multifonctionnelles, impliquées dans les processus de désintoxication.

La formation de complexes stables dépend de la fixation des ligands dans le site actif de l'enzyme étudiée. L'étude de la conformation géométrique des pesticides dans les sites actifs des enzymes GST, SOD et CAT, a montré que les ligands ont été bien positionnés dans les cavités des trois sites actifs. L'implication de plusieurs résidus du site actif dans les interactions survenues ont contribué à la stabilisation des complexes formés et ont permis une meilleure fixation des pesticides au niveau des sites actifs.

Les scores permettent de quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. Ce sont des données numériques qui nous renseignent sur l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Il s'agit d'une estimation de l'affinité entre récepteurs et ligands. Au vu des résultats précédemment présentés, il a été trouvé que pour toutes les enzymes étudiées ; la GST, la CAT et la SOD, c'est la lambda cyalothrine qui présentaient les meilleures énergies de complexations. Si on considère que l'énergie de complexations est un facteur significatif d'inhibition, la Lambda cyalothrine se classerait au premier rang parmi tous les pesticides étudiés et, représenterait le meilleur ligand complexé à la glutathion s-transférase, à la catalase et à la superoxyde dismutase.

La Lambda cyalothrine pourrait alors présenter un effet inhibiteur très importants par comparaison aux autres pesticides. Il nous sera, cependant, possible de supposer que c'est le pesticide le plus toxique de tous les pesticides étudiés.

La cyperméthrine se situe en second rang vis-à-vis des énergies d'interaction avec la GST et la SOD.



La lambda cyalothrine et la cyperméthrine appartiennent à la même famille chimique ; celle des pyréthrinoïdes de synthèse. Ces pesticides sont très connus pour leur grand pouvoir toxique ainsi que leur implication dans le stress oxydatif. Des études ont démontré que les pyréthrinoïdes sont facilement absorbés par les voies respiratoires après inhalation (Kavlock et al., 1979) et par le tractus gastro-intestinal après administration orale (Anadón et al., 2006). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré qu'une forte exposition humaine professionnelle et environnementale aux insecticides pyréthrinoïdes pourrait interagir avec le métabolisme des médicaments ou des xénobiotiques (Catinot et al., 1989).

Il a aussi été montré, dans des études antérieures, que la cytotoxicité des pesticides est attribuable à l'inhibition des fonctions protéiques, suite à la formation et aux interactions des complexes protéine-pesticide (Jin et al., 2007 ; Soderlund, 2012 ; Marsillach et al., 2013).

L'étude des interactions des pesticides avec les enzymes GST, SOD et CAT a montré qu'après la cyperméthrine et la lambda cyalothrine, c'est l'acétamipride qui s'est située en troisième rang pour la GST et la SOD. Pour la CAT le diazinon était le troisième pesticide qui a donné une énergie de complexation égale à -5.2 Kcal/mol.

Les énergies de complexations des pesticides avec les trois enzymes impliquées dans le stress oxydatif se sont avérées être très basses, les complexes formés sont alors très stables. Ces pesticides peuvent entrer en compétition avec les ligands naturels des enzymes en étant des antagonistes compétitifs, ceci pourrait causer une inhibition au niveau des trois enzymes et altérer ainsi les mécanismes de lutte contre le stress oxydatif utilisé par l'organisme.

En analysant les différents complexes formés, nous avons pu conclure que les principales interactions entre les pesticides étudiés et les sites actifs des trois enzymes étaient de types : interaction hydrogène. Celles-ci ont une grande importance et jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance moléculaire et l'affinité entre les entités chimiques.

Les liaisons hydrophobes, les interactions de type électrostatiques, les interactions halogène et les liaisons carbone hydrogène ont aussi été trouvées parmi les principales interactions entre les ligands et récepteurs étudiés. Elles jouent aussi un rôle primordial dans les interactions intermoléculaires, chacune possédant ses propres caractéristiques et conférant des spécificités aux interactions récepteur-ligand.

## 4.2. Etude 2

### 4.2.1. Etude comparative des interactions des différents pesticides avec la GST, la CAT et la SOD

Dans cette deuxième partie de l'étude *in silico* nous avons suivi une approche qui nous permettra de

Les pesticides qui ont été utilisés dans cette dernière partie de l'étude *in silico* sont les suivants : chlorpyrifos, thiaclopride, spiromésifène, cyperméthrine, bromuconazole, abamectine, chlorothalonil, méthomyl, spirotétramate, spirodiclofène, deltaméthrine, indoxacarbe. Ce choix a été basé sur l'étude expérimentale des biomarqueurs du stress oxydatif dans le foie et les reins précédemment présentée dans l'étude *in vivo*.

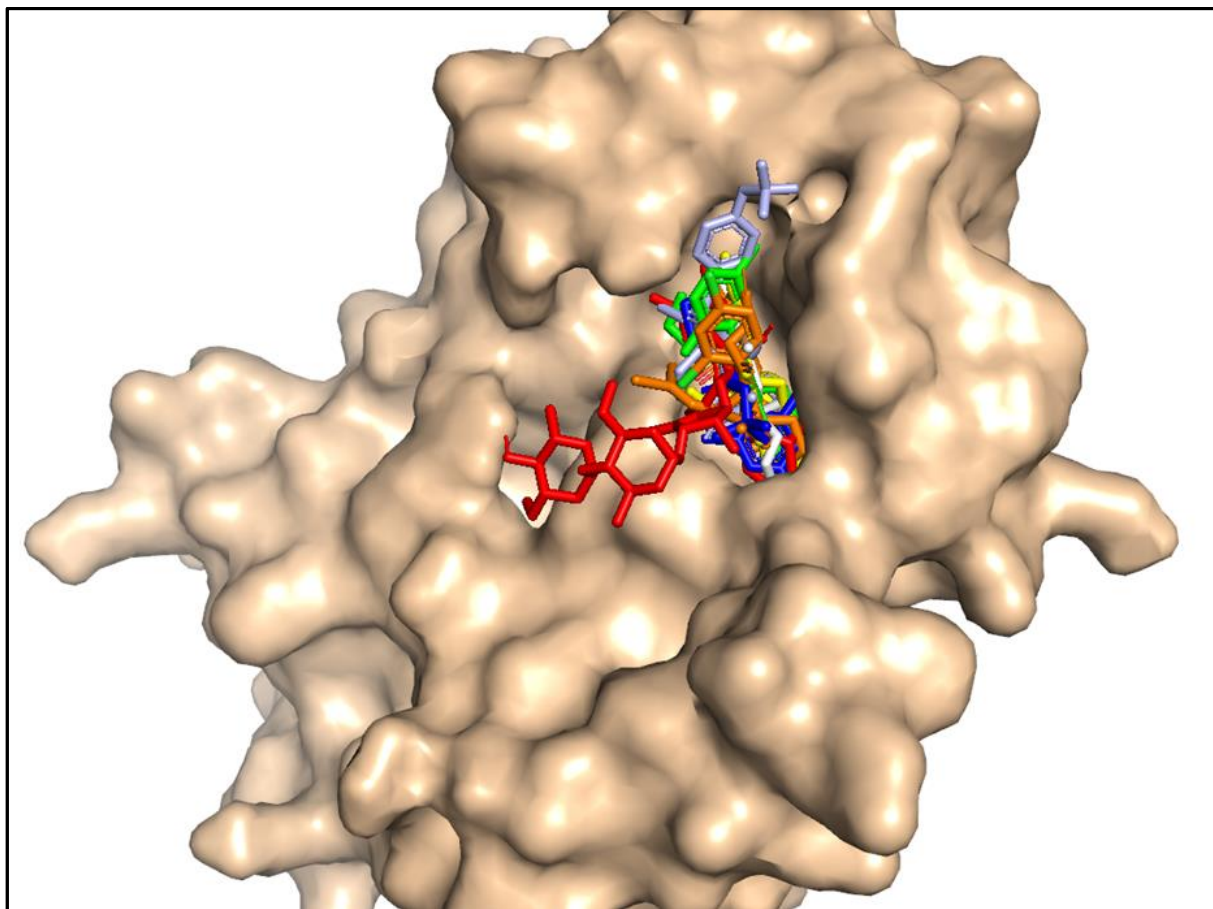
Les résultats de l'étude *in vivo* portant sur les biomarqueurs du stress oxydatif ont montré que les trois mélanges de pesticides M1, M2 et M3 ont provoqué une diminution des activités de la CAT, la SOD et la GPx dans le foie et les reins des rats traités.

Lors de la comparaison des taux des marqueurs du stress oxydatif dans les différents groupes II, III, et IV une diminution de l'activité de la CAT, la SOD et la GPx, dépendant du nombre des pesticides utilisés dans les trois mélanges, a été observée. Les résultats de cette étude nous ont permis de supposer qu'un effet de synergie entre les pesticides a pu avoir lieu.

Une étude comparative entre les acides aminés impliqués dans les interactions qui stabilisent les différents complexes pesticide-enzyme, a été réalisée, afin de mieux comprendre le mode d'interaction de chaque pesticide au sein du site actif de chaque enzyme et pour permettre d'avoir plus d'information sur l'effet synergique entre ces derniers.

Pour mieux comprendre les interactions pouvant avoir lieu dans le site actif de la GST avec les 12 pesticides, nous avons fait appel aux programmes Autodock vina, pymol et Biovia Discovery Studio. Toutes les poses ont été analysées, une par une, mais uniquement les meilleures poses ont été retenues pour l'étude.

#### 4.2.1.1. Etude des interactions des pesticides avec la GST

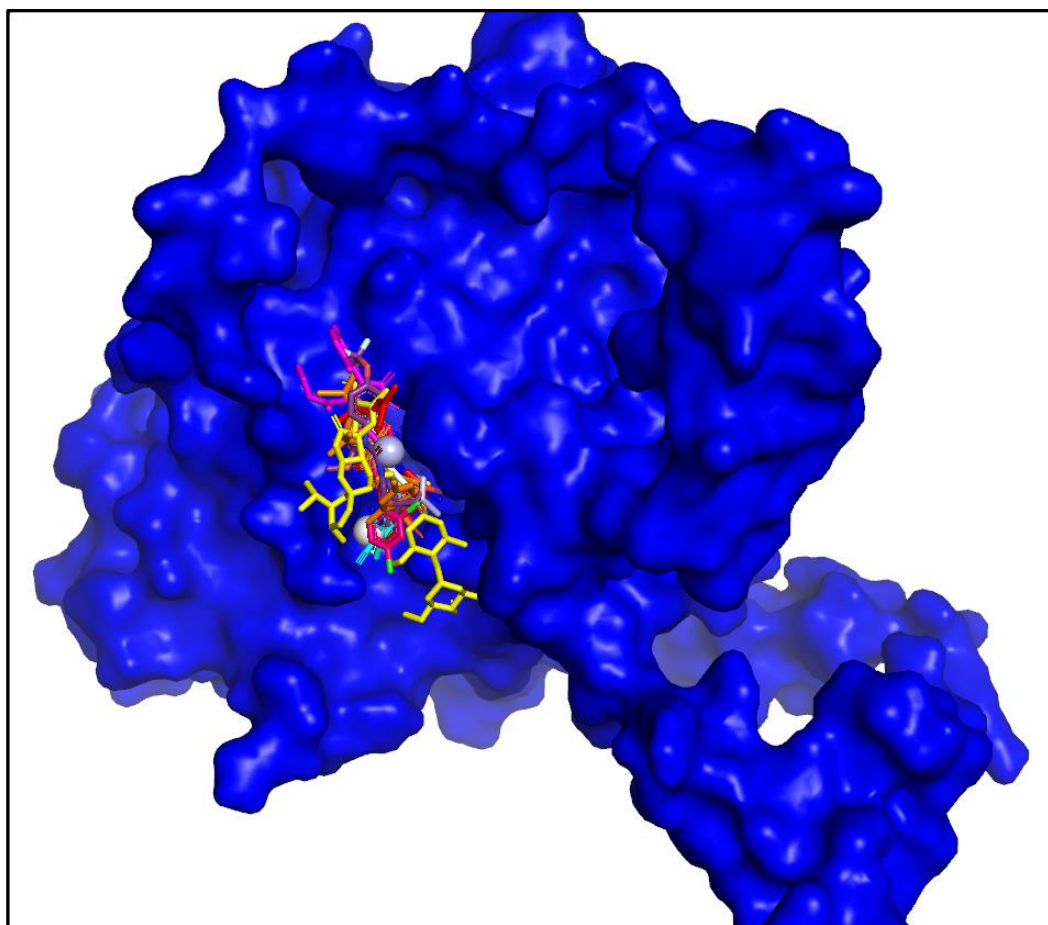


**Figure 35** : Représentation du positionnement des 12 pesticides dans le site actif de la GST

**Tableau 18 :** Tableau comparatif des résidus impliqués dans les interactions des mélanges M1, M2 et M3 avec la GST.

Mélange 3											
Mélange 2											
Mélange 1											
CHLOR-PYRIFOS	THIACLOPRID	SPIRO-MESIFENE	CYPER-METHRINE	BROMU-CONAZOLE	ABAME-CTINE	CHLORO-THALONIL	METHO-MYL	SPIRO-TETRAMATE	SPIRO-DICLOFENE	DELTA-METHRINE	ININDOXACARBE
	ALA100										
	GLU162										
	ARG69										
	ARG15				ARG15			ARG15	ARG15	ARG15	ARG15
PHE220				PHE220	PHE220	PHE220		PHE220	PHE220	PHE220	PHE220
					LEU107			LEU107	LEU107	LEU107	
					ALA216			ALA216	ALA216		ALA216
PHE222		PHE222	PHE222	PHE222	PHE222	PHE222		PHE222	PHE222	PHE222	PHE222
					PHE10						PHE10
					VAL111	VAL111				VAL111	
					LEU213						
					PRO110						
					MET208						MET208
					GLN54						
							GLY14				
							SER18				
						LEU108				LEU108	
											ARG45
			VAL55								VAL55
			TYR9	TYR9							

#### 4.2.1.2. Etude des interactions des pesticides avec la CAT

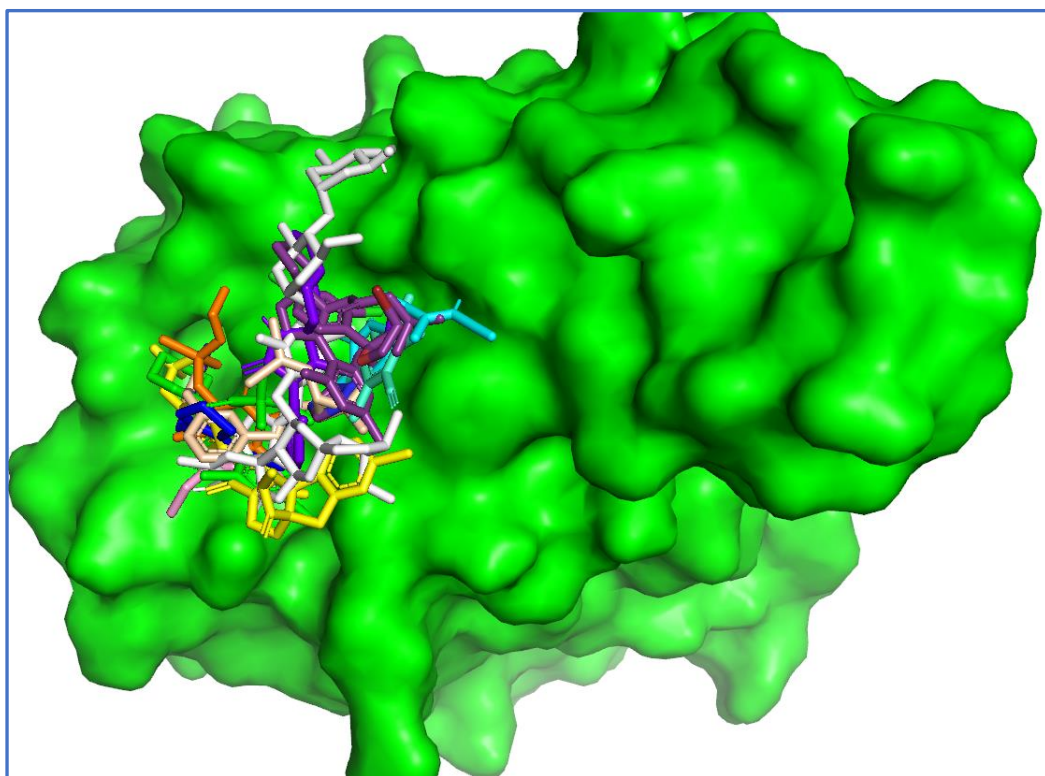


**Figure 36** : Représentation du positionnement des 12 pesticides dans le site actif de la CAT.

**Tableau 19** : Tableau comparatif des résidus impliqués dans les interactions des mélanges M1, M2 et M3 avec la CAT.

Mélange 3											
Mélange 2											
Mélange 1											
CHLOR-PYRIFOS	THIACLO-PRID	SPIRO-MESIFENE	CYPER-METHRINE	BROMU-CONAZOLE	ABAME-CTINE	CHLORO-THALONIL	METHO-MYL	SPIRO-TETRAMATE	SPIRO-DICLOFENE	DELTA-METHRINE	DO-XACARBE
PHE161		PHE161		PHE161		PHE161				PHE161	PHE161
PRO162		PRO162		PRO162	PRO162	PRO162			PRO162	PRO162	PRO162
VAL73		VAL73		VAL73	VAL73	VAL73				VAL73	VAL73
		VAL74		VAL74		VAL74				VAL74	VAL74
		ILE165		ILE165		ILE165				ILE165	ILE165
HEM-2000		HEM-2000		HEM2000	HEM2000	HEM2000		HEM2000	HEM2000	HEM2000	HEM2000
ALA357	ALA-357	ALA357		ALA357	ALA357			ALA357	ALA357	ALA357	ALA357
	PHE356	PHE356			PHE356			PHE356			
					ILE159					ILE159	
					PRO158			PRO158		PRO158	
ASP360			ASP360								
					GLY353			GLY353			
					HIS364						
						HIS166					
											GLN352
								LYS349			
							ASP128				
					PRO70						
							GLN-168				

#### 4.2.1.3. Etude des interactions des pesticides avec la SOD



**Figure 37** : Représentation du positionnement des 12 pesticides dans le site actif de la SOD.

**Tableau 20** : Tableau comparatif des résidus impliqués dans les interactions des mélanges M1, M2 et M3 avec la SOD.

Mélange 3											
Mélange 2											
Mélange 1											
CHLOR-PYRIFOS	THIACLO-PRID	SPIRO-MESIFENE	CYPER-METHRINE	BROMU-CONAZOLE	ABAME-CTINE	CHLORO-THALONIL	METHO-MYL	SPIRO-TETRAMATE	SPIRO-DICLOFENE	DELTA-METHRINE	DO-XACARBE
		PHE66		PHE66	PHE66	PHE66	PHE66		PHE66	PHE66	
		TYR34		TYR34	TYR34		TYR34	TYR34		TYR34	
		HIS163	HIS163			HIS163	HIS163	HIS163	HIS163	HIS163	HIS163
HIS30		HIS30		HIS30	HIS30	HIS30	HIS30	HIS30	HIS30	HIS30	
			GLU162					GLU162			GLU162
LEU167								LEU167		LEU167	LEU167
	TRP161	TRP161			TRP161	TRP161		TRP161	TRP161		
		ALA33		ALA33	ALA33	ALA33				ALA33	ALA33
					ALA32						
					LYS29						
					ASN36						
											TYR166
											ASN67
											ASN37
											SER121
LEU25											
ILE22											
TYR166											

Les résultats de l'analyse visuelle du positionnement des pesticides au sein des sites actifs de la CAT, la SOD et la GST et des tableaux comparatifs des acides aminés des enzymes qui interagissent avec les 12 composés ont montrés que les 12 molécules sont bien placées dans la même cavité mène au même site actif, et ce pour les trois enzymes étudiées.

Il a aussi été trouvé que les pesticides des trois mélanges présentaient plusieurs interactions avec les mêmes acides aminés du site actifs de chacune des enzymes étudiées.

Le nombre de ces interactions varie de 3 à 10 interactions communes entre les différents complexes du mélange M1, M2 et M3.



Pour la GST, les tableaux comparatifs des résidus impliqués dans les interactions des mélanges M1, M2 et M3 avec cette enzyme, ont montré que les résidus communs impliqués dans les interactions des trois mélanges sont au nombre de quatre, qui sont ARG15, PHE220, ALA216 et PHE222.

Pour la CAT, les résidus communs impliqués dans l'interaction enzyme- pesticide sont PHE161, PRO162, VAL73, VAL74, ILE165, HEM2000 et ALA357.

Pour la SOD, les résidus HIS163, LEU167 et ALA33 sont communément impliqués dans les interactions des trois mélanges de pesticides étudiés avec l'enzyme.

Selon les résultats de l'étude *in vivo* précédemment présentés, il a été trouvé que les mélanges contenant le plus grand nombre de pesticides sont ceux qui présentaient le plus grand effet sur les activités des enzymes CAT, GST et SOD.

Dans cette étude et en partant du même principe, celui d'étudier et de comparer les trois mélanges utilisés dans l'étude *in vivo*, en utilisant un nombre croissant de pesticides pour chaque mélange, nous avons tenté d'étudier les interactions entrant en jeu et permettant d'avoir ces résultats.

L'étude *in silico* des différentes interactions entre les pesticides des trois mélanges de pesticides et les trois enzymes étudiés, a montré que les pesticides appartenant aux mélanges M1, M2 et M3 ont occupé le même site actif dans les différentes enzymes étudiées et ont interagi avec les mêmes résidus

Ces résultats nous laissent supposer que le type de la synergie entre les différentes substances est une synergie additive. Cette dernière, dépend du nombre des sites actifs saturés par les pesticides.

Il faut signaler que cette hypothèse est soutenue par les résultats expérimentaux qui ont montrés que le mélange M3 qui est composés de 12 pesticides était celui qui a provoqué la diminution la plus marquée de l'activité des trois enzymes CAT, SOD et GPx, par comparaison avec le M1 et le M2 qui étaient formulés par un nombre inférieur de pesticides : 9 et 10 respectivement.

On ne peut toutefois pas exclure la possibilité que d'autres types d'interactions puissent avoir lieu, à savoir, la potentialisation. Le changement de la conformation d'une enzyme après avoir eu des liaisons avec des ligands dépasse les capacités de notre logiciel. Notre hypothèse pourrait être confirmée avec les techniques d'une autre approche en faisant appel à la dynamique moléculaire DM.

# **Conclusion**

---

## IV. Conclusion

L'usage de pesticides s'avère être en constante augmentation à travers tous les pays du monde et, en particulier, dans les pays en voie de développement ou le recours à ces produits est de plus en plus fréquent.

Les pesticides sont largement utilisés dans l'agriculture, en Algérie, pour assurer l'accroissement quantitatif et qualitatif des rendements agricoles. Cependant, leur utilisation et leur dispersion au sein des agro-systèmes pose un véritable problème de santé publique, notamment pour les agriculteurs qui sont directement exposés à ces produits chimiques.

En Algérie, les conditions défavorables de l'utilisation de ces produits comme l'utilisation de pesticides hautement toxiques interdits en Europe et en Amérique, l'absence de suivi, de surveillance et de sensibilisation des agriculteurs et vendeurs de ces produits vis-à-vis de leurs dangers, ainsi que l'absence d'une législation régissant leur utilisation font, aujourd'hui, que ces produits chimiques constituent un risque majeur pour la santé dans ce pays.

Au cours de ce travail de recherche, qui s'inscrit dans l'analyse du risque lié à l'exposition à des substances chimiques, nous avons essayé d'étudier et d'expliquer les effets néfastes que peuvent avoir les pesticides les plus utilisés en Algérie, sur la santé de l'homme. Nous avons mis l'accent sur les mélanges de pesticides, les formulations de pesticides et les DJA afin de mimer au mieux l'exposition réelle à ces produits. Notre travail soutient la théorie reliant l'exposition aux pesticides aux risques d'apparition de pathologies.

Afin de vérifier cette hypothèse et apporter les éléments de réponses permettant de tirer des conclusions solides sur les risques liés aux pesticides, nous avons fait appel à différentes approches ; *in vitro*, *in vivo* et *in silico*.

La première, *in vitro*, nous a permis de mettre en évidence la toxicité des mélanges de pesticides par comparaison aux produits pris individuellement. Les résultats ont montré que les mélanges de pesticides, ont inhibé la viabilité dans plus de 60 % des cellules HT29, alors que les pesticides utilisés seuls étaient pas ou moins toxiques.

La cytotoxicité sur les cellules A549 était nettement plus marquée que celle des cellules HUVEC. Pour cette lignée cellulaire, une augmentation de la cytotoxicité dépendant du nombre de pesticides utilisés dans les mélanges testés, a été observée.

Il a été constaté que les pesticides agissaient différemment sur la viabilité cellulaire. Leurs effets étaient dépendants du type de lignée cellulaire utilisée pour chaque étude. Il est à

noter, que la cytotoxicité était plus marquée dans les mélanges de pesticides. L'étude de la cytotoxicité des mélanges a montré que des effets de synergie peuvent avoir lieu.

La seconde étude, *in vivo*, a montré que l'exposition aux pesticides à des doses correspondantes à leur DJA, a pu provoquer des perturbations dans les différents paramètres biochimiques étudiés au même titre que des altérations du statut redox. En effet, La croissance physiologique des rats a été influencée par le traitement aux pesticides, une diminution du poids corporel et des poids relatifs des organes a été observée. De plus, l'exploration de la fonction hépatique a révélé une perturbation des transaminases et des protéines totales. Concernant la fonction rénale, les résultats ont montré que les mélanges de pesticides ont significativement augmenté les niveaux de l'urée plasmatique et de la créatinine chez les rats traités avec les mélanges de pesticides par comparaison au groupe témoin. Des perturbations dans les taux du cholestérol, des triglycérides, HDL et LDL ont aussi été observées.

Il a aussi été trouvé que les mélanges des pesticides étudiés ont provoqué une diminution des activités des CAT, SOD et GPx dans le foie et les reins des rats traités.

Les résultats de l'étude *in silico* ont montré que les pesticides utilisés dans cette étude ont une grande affinité pour les enzymes étudiées et que les complexes formés sont stabilisés par un nombre important de différents types de liaisons. Cependant, d'autres études seraient nécessaires pour confirmer les hypothèses soulevées dans ces travaux.

La démonstration d'un lien de causalité entre l'exposition aux pesticides et la présence d'un impact sur la santé chez l'homme est très difficile à mettre en place. A cela s'ajoutent les difficultés liées à l'évaluation de l'exposition professionnelle ou de l'ensemble de la population générale.

S'il reste encore difficile d'évaluer expérimentalement toutes les combinaisons possibles de pesticides, il est cependant indispensable d'évaluer les effets de mélanges représentatifs, retenus sur la base de leur fréquence d'exposition. De plus, il faut pouvoir considérer les effets des mélanges de pesticides sur de longues périodes d'exposition, afin que les effets de cumulation ou de répétitions soient pris en compte.

Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches qui permettent d'intégrer des paramètres plus pertinents dans la prédiction des effets de mélanges.

## Perspectives

Plusieurs pistes de recherche pourraient être explorées afin de mieux évaluer et expliquer les phénomènes observés dans notre étude.

Tout d'abord, des études de génotoxicité, qu'elles soient réalisées *in vivo* ou *in vitro*, pourraient permettre de déterminer si des dommages à l'ADN sont directement liés à l'exposition aux pesticides. Cela nous aiderait à comprendre si les pesticides peuvent causer des altérations génétiques et les conséquences que cela pourrait avoir sur la santé humaine.

En outre, il serait intéressant de se pencher sur la recherche de modifications épigénétiques associées à l'exposition aux pesticides. Les modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, peuvent influencer l'expression des gènes sans modifier directement la séquence d'ADN. L'étude de ces modifications pourrait fournir des informations précieuses sur les mécanismes sous-jacents aux effets des pesticides sur la santé humaine.

En complément du docking moléculaire, il serait bénéfique de recourir à des méthodes permettant la détermination de paramètres pharmacocinétiques. Par exemple, l'utilisation de la modélisation informatique pourrait être utilisée pour prédire les profils ADME-T (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicologie) des pesticides. Ces profils nous renseigneraient sur la manière dont les pesticides sont absorbés, distribués, métabolisés et excrétés dans le corps humain, ce qui pourrait aider à évaluer leur potentiel toxicologique.

En somme, l'intégration d'études de génotoxicité, d'analyses épigénétiques et de modélisation pharmacocinétique fournirait une approche plus complète pour mieux comprendre les effets des pesticides sur la santé humaine. Ces pistes de recherche complémentaires pourraient contribuer à élargir notre compréhension des mécanismes d'action des pesticides et de leurs conséquences sur la santé, permettant ainsi de mieux évaluer et atténuer les risques associés à leur utilisation.

**Références**  
**bibliographiques**

## V. Références bibliographiques

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., & Rezaie, A. (2004). Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, *10*(6), 141-147.
- Abhilash, P. C., & Singh, N. (2009). Pesticide use and application: an Indian scenario. *Journal of hazardous materials*, *165*(1-3), 1-12.
- Abolaji, A. O., Awogbindin, I. O., Adedara, I. A., & Farombi, E. O. (2017). Insecticide chlorpyrifos and fungicide carbendazim, common food contaminants mixture, induce hepatic, renal, and splenic oxidative damage in female rats. *Human & experimental toxicology*, *36*(5), 483-493.
- Acker, C. I., & Nogueira, C. W. (2012). Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats. *Chemosphere*, *89*(5), 602-608.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.
- Airaksinen, R., Rantakokko, P., Eriksson, J. G., Blomstedt, P., Kajantie, E., & Kiviranta, H. (2011). Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants. *Diabetes care*, *34*(9), 1972-1979.
- Akhgari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R., & Sabzevari, O. (2003). Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & experimental toxicology*, *22*(4), 205-211.
- Akhtar, A. Z. H. A. R., Deshmukh, A. A., Raut, C. G., Somkuwar, A. P., & Bhagat, S. S. (2012). Prallethrin induced serum biochemical changes in Wistar rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *102*(2), 160-168.
- Al-Attar, A. M., Elnaggar, M. H., & Almalki, E. A. (2018). Physiological study on the influence of some plant oils in rats exposed to a sublethal concentration of diazinon. *Saudi journal of biological sciences*, *25*(4), 786-796.
- Anadon, A., Martinez, M., Martinez, M. A., Diaz, M. J., & Martinez-Larranaga, M. R. (2006). Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. *Toxicology Letters*, *165*(1), 47-56.
- Andersen, H. R., Debes, F., Wohlfahrt-Veje, C., Murata, K., & Grandjean, P. (2015). Occupational pesticide exposure in early pregnancy associated with sex-specific neurobehavioral deficits in the children at school age. *Neurotoxicology and teratology*, *47*, 1-9.
- Anderson, S. E., & Meade, B. J. (2014). Potential health effects associated with dermal exposure to occupational chemicals. *Environmental health insights*, *8*, EHI-S15258.
- Auberto, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Grill, J.N, Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Voltz, M. (2005). Pesticides, agriculture et environnement : réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. *Quæ, Versailles Cedex*, pp 5, ISBN : 978-2-7592-0048-1.
- Baker JR, E. L., Landrigan, P. J., Glueck, C. J., Zack JR, M. M., Liddle, J. A., Burse, V. W., ... & Needham, L. L. (1980). Metabolic consequences of exposure to polychlorinated biphenyls (PCB) in sewage sludge. *American journal of epidemiology*, *112*(4), 553-563.

- Barnabe, C., Jones, C. A., Bernatsky, S., Peschken, C. A., Voaklander, D., Homik, J., ... & Hemmelgarn, B. (2017). Inflammatory Arthritis prevalence and health services use in the first nations and non-first nations populations of Alberta, Canada. *Arthritis care & research*, 69(4), 467-474.
- Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M., & Soulas, G. (1996). Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et gestion des sols*, 3(4), 279-296.
- Bastos, A. M. X., Souza, M. D. C. B. D., Almeida Filho, G. L. D., Krauss, T. M., Pavesi, T., & Silva, L. E. D. (2013). Organochlorine compound levels in fertile and infertile women from Rio de Janeiro, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 57, 346-353.
- Bebe, F. N., & Panemangalore, M. (2003). Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos modifies endogenous antioxidants in tissues of rats. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 38(3), 349-363.
- Bellinger, D. C., Stiles, K. M., & Needleman, H. L. (1992). Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. *Pediatrics*, 90(6), 855-861.
- Bhardwaj, S., Srivastava, M. K., Kapoor, U., & Srivastava, L. P. (2010). A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations. *Food and chemical toxicology*, 48(5), 1185-1190.
- Bosma, H., Van Boxtel, M. P. J., Ponds, R. W. H. M., Houx, P. J., & Jolles, J. (2000). Pesticide exposure and risk of mild cognitive dysfunction. *The Lancet*, 356(9233), 912-913.
- Boussabbeh, M., Ben Salem, I., Hamdi, M., Ben Fradj, S., Abid-Essefi, S., & Bacha, H. (2016). Diazinon, an organophosphate pesticide, induces oxidative stress and genotoxicity in cells deriving from large intestine. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2882-2889.
- Braun, J. M., Kalkbrenner, A. E., Just, A. C., Yolton, K., Calafat, A. M., Sjödin, A., ... & Lanphear, B. P. (2014). Gestational exposure to endocrine-disrupting chemicals and reciprocal social, repetitive, and stereotypic behaviors in 4-and 5-year-old children: the HOME study. *Environmental health perspectives*, 122(5), 513-520.
- Brooijmans, N., & Kuntz, I. D. (2003). Molecular recognition and docking algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 32(1), 335-373.
- Butterfield, D. A., & Lauderback, C. M. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid  $\beta$ -peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1050-1060.
- Calvet, R. (2005). *Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*. France agricole éditions.
- Catinot, R., Hoellinger, H., Sonnier, M., & Pichon, J. (1989). In vitro covalent binding of the pyrethroids cismethrin, cypermethrin and deltamethrin to rat liver homogenate and microsomes. *Archives of toxicology*, 63(3), 214-220.
- Chase, K. H., Wong, O., Thomas, D., Berney, B. W., & Simon, R. K. (1982). Clinical and metabolic abnormalities associated with occupational exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs). *Journal of Occupational Medicine*, 109-114.
- Chevalier, P., Cordier, S., Dab, W., Gérin, M., Gosselin, P., Quénel, P., ... & Quénel, P. (2003). Santé environnementale. *Environnement et santé publique*, 59-86.



- Crowell, M.D.; Broome, K.G.; Eason, C.T.; Fairweather, A.A.C.; Ogilvie, A.A.C. and Murphy, E.C. (2013): How long do vertebrate pesticides persist in living mammals? Priorities for research. DOC Research and Development Series 337, Department of Conservation, pp:1-18, Wellington, NZ.
- Curl, C. L., Fenske, R. A., & Elgethun, K. (2003). Organophosphorus pesticide exposure of urban and suburban preschool children with organic and conventional diets. *Environmental health perspectives*, 111(3), 377-382.
- Čermák, V., Dostál, V., Jelínek, M., Libusová, L., Kovář, J., Rösel, D., & Brábek, J. (2020). Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *European journal of cell biology*, 99(4), 151075.
- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1402-1419.
- De Graaf, L., Boulanger, M., Bureau, M., Bouvier, G., Meryet-Figuere, M., Tual, S., ... & Baldi, I. (2022). Occupational pesticide exposure, cancer and chronic neurological disorders: A systematic review of epidemiological studies in greenspace workers. *Environmental Research*, 203, 111822.
- Derache, R., (1989). Toxicologie & sécurité des aliments. Lavoisier, Paris, PP 106,107, 112-115, 300-304 ISBN : 2-85206-572-X.
- Eason, C. T., Fagerstone, K. A., Eisemann, J. D., Humphrys, S., O'Hare, J. R., & Lapidge, S. J. (2010). A review of existing and potential New World and Australasian vertebrate pesticides with a rationale for linking use patterns to registration requirements. *International Journal of Pest Management*, 56(2), 109-125.
- Edelstein CL. (2008) Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Advanced Chronic Kidney Diseases* 15:222–234.
- El-Demerdash, F. M. (2011). Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food and chemical toxicology*, 49(6), 1346-1352.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77
- Eraslan, G., Kanbur, M., & Silici, S. (2009). Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 86-91.
- Farag, A. T., Eweidah, M. H., & El-Okazy, A. M. (2000). Reproductive toxicology of acephate in male mice. *Reproductive Toxicology*, 14(5), 457-462.
- Farag, R. S., Latif, A., El-Gawad, A., & Dogheim, S. M. (2011). Monitoring of pesticide residues in some Egyptian herbs, fruits and vegetables. *International food research Journal*, 18(2).
- Ferber, R., Hreljac, A., & Kendall, K. D. (2009). Suspected mechanisms in the cause of overuse running injuries: a clinical review. *Sports health*, 1(3), 242-246.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.

- Fritschi, L., McLaughlin, J., Sergi, C. M., Calaf, G. M., Le Curieux, F., Forastiere, F., ... & Jameson, C. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Red*, *114*(2), 70134-70138.
- Gaberell, L., Viret G., & Grandjean M. (2020). Brazil, South Africa, Ukraine: high-risk destinations. *Public eye*. 10. September 2020. <https://www.publiceye.ch/en/topics/pesticides/banned-in-europe/high-risk-destinations>. Consulté le 24 Mai 2021.
- Gangemi, S., Miozzi, E., Teodoro, M., Briguglio, G., De Luca, A., Alibrando, C., ... & Libra, M. (2016). Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans. *Molecular medicine reports*, *14*(5), 4475-4488.
- Goel, A., Dani, V., & Dhawan, D. K. (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chemico-biological interactions*, *156*(2-3), 131-140.
- Gomes, J., Dawodu, A. H., Lloyd, O., Revitt, D. M., & Anilal, S. V. (1999). Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides. *Human & experimental toxicology*, *18*(1), 33-37.
- Goncharov, A., Haase, R. F., Santiago-Rivera, A., Morse, G., McCaffrey, R. J., Rej, R., ... & Akwesasne Task Force on the Environment. (2008). High serum PCBs are associated with elevation of serum lipids and cardiovascular disease in a Native American population. *Environmental research*, *106*(2), 226-239.
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., ... & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, *16*(5), 490-491.
- Haubruge, E., & Amichot, M. (1998). Insect and mite resistance mechanisms to insecticides. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*.
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, *57*(5), 715S-725S.
- Harari, R., Julvez, J., Murata, K., Barr, D., Bellinger, D. C., Debes, F., & Grandjean, P. (2010). Neurobehavioral deficits and increased blood pressure in school-age children prenatally exposed to pesticides. *Environmental health perspectives*, *118*(6), 890-896.
- Hariri, A. T., Moallem, S. A., Mahmoudi, M., Memar, B., & Hosseinzadeh, H. (2010). Sub-acute effects of diazinon on biochemical indices and specific biomarkers in rats: protective effects of crocin and safranal. *Food and chemical toxicology*, *48*(10), 2803-2808.
- Hermann, J. C., Marti-Arbona, R., Fedorov, A. A., Fedorov, E., Almo, S. C., Shoichet, B. K., & Raushel, F. M. (2007). Structure-based activity prediction for an enzyme of unknown function. *Nature*, *448*(7155), 775-779.
- Hernández, A. F., López, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., ... & Pla, A. (2005). Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicology letters*, *159*(1), 13-21.
- Hertel, C., Quader, H., Robinson, D. G., & Marmé, D. (1980). Anti-microtubular herbicides and fungicides affect Ca<sup>2+</sup> transport in plant mitochondria. *Planta*, *149*, 336-340.

- Hocine, L., Merzouk, H., Merzouk, S. A., Ghorzi, H., Youbi, M., & Narce, M. (2016). The effects of alpha-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns. *Pesticide biochemistry and physiology*, *134*, 49-54.
- Hoffman, L., & Hardej, D. (2012). Ethylene bisdithiocarbamate pesticides cause cytotoxicity in transformed and normal human colon cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *34*(2), 556-573.
- Hreljac, I., Zajc, I., Lah, T., & Filipič, M. (2008). Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, *49*(5), 360-367.
- Huang, S. Y., Grinter, S. Z., & Zou, X. (2010). Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *12*(40), 12899-12908.
- Ige, J. O., Gbadegesin, M. A., Olugbami, J. O., Adegoke, A. M., Odunola, O. A., Anetor, G. O., & Anetor, J. I. (2021). A Common Insecticide Induced-Oxidative Stress in Wistar Rats: Significance for Humans and Implications for Nutritional Modulation of Insecticide Toxicity. *Journal of the American College of Nutrition*, *40*(7), 608-616.
- Irace-Guigand, S., Aaron, J. J., Scribe, P., & Barcelo, D. (2004). A comparison of the environmental impact of pesticide multiresidues and their occurrence in river waters surveyed by liquid chromatography coupled in tandem with UV diode array detection and mass spectrometry. *Chemosphere*, *55*(7), 973-981.
- James, K. A., & Hall, D. A. (2015). Groundwater pesticide levels and the association with Parkinson disease. *International journal of toxicology*, *34*(3), 266-273.
- Jansson, C., Plato, N., Johansson, A. L. V., Nyren, O., & Lagergren, J. (2006). Airborne occupational exposures and risk of oesophageal and cardia adenocarcinoma. *Occupational and Environmental Medicine*, *63*(2), 107-112.
- Jas, N. (2010). Pesticides et santé des travailleurs agricoles en France. Questions anciennes, nouveaux enjeux. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA*, *59*(59), 47-59.
- JEFCA: WHO technical report, Volume 240. (1962) Principles governing consumer safety in relation to pesticide residues Geneva: World Health Organization, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40536/1/WHO\\_TRS\\_240.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40536/1/WHO_TRS_240.pdf), last accessed 26/01/2019.
- Jensen, B. H., Petersen, A., Christiansen, S., Boberg, J., Axelstad, M., Herrmann, S. S., ... & Hass, U. (2013). Probabilistic assessment of the cumulative dietary exposure of the population of Denmark to endocrine disrupting pesticides. *Food and chemical toxicology*, *55*, 113-120.
- Jin, J., Davis, J., Zhu, D., Kashima, D. T., Leroueil, M., Pan, C., ... & Zhang, J. (2007). Identification of novel proteins affected by rotenone in mitochondria of dopaminergic cells. *BMC neuroscience*, *8*(1), 1-14.
- John, S., Kale, M., Rathore, N., & Bhatnagar, D. (2001). Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*, *12*(9), 500-504.
- Jorgensen, W. L. (2009). Efficient drug lead discovery and optimization. *Accounts of chemical research*, *42*(6), 724-733.

- Kavlock, R., Chernoff, N., Baron, R., Linder, R., Rogers, E., Carver, B., ... & Simmon, V. (1979). Toxicity studies with decamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. *Journal of environmental pathology and toxicology*, 2(3), 751-765.
- Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, 23(1), 21-48.
- Khan, A. A., Shah, M. A., & Rahman, S. U. (2013). Occupational exposure to pesticides and its effects on health status of workers in Swat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Journal of Biology and Life Sciences*, 4(2), 43.
- Kheddam-Benadjal, N. (2012). *Enquête sur la gestion des pesticides en Algérie et recherche d'une méthode de lutte alternative contre Meloidogyne incognita (Nematoda: Meloidogynidae)* (Doctoral dissertation).
- Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G., & Langer, T. (2008). Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—what can we learn from earlier mistakes?. *Journal of computer-aided molecular design*, 22(3), 213-228.
- Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., ... & Cheatham, T. E. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research*, 33(12), 889-897.
- Konsoula, R., & Barile, F. A. (2005). Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicology in vitro*, 19(5), 675-684.
- Kurtio, P., Vartiainen, T., & Savolainen, K. (1990). Environmental and biological monitoring of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides and ethylenethiourea. *Occupational and Environmental Medicine*, 47(3), 203-206.
- Lasram, M. M., Annabi, A. B., El Elj, N., Selmi, S., Kamoun, A., El-Fazaa, S., & Gharbi, N. (2009). Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult Wistar rats. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 1052-1055.
- Lawrence, R. A., & Burk, R. F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), 952-958.
- Li, Q., Nagahara, N., Takahashi, H., Takeda, K., Okumura, K., & Minami, M. (2002). Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-activated killer: a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition. *Toxicology*, 172(3), 181-190.
- Linnainmaa, K. (1983). Sister chromatid exchanges among workers occupationally exposed to phenoxy acid herbicides 2, 4-D and MCPA. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 3(3), 269-279.
- Lovaković, B. T., Pizent, A., Kašuba, V., Kopjar, N., Micek, V., Mendaš, G., ... & Želježić, D. (2017). Effects of sub-chronic exposure to terbuthylazine on DNA damage, oxidative stress and parent compound/metabolite levels in adult male rats. *Food and chemical toxicology*, 108, 93-103.
- Maalej, A., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Fki, I., Marrekchi, R., & Sayadi, S. (2017). Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food and chemical toxicology*, 106, 455-465.

- MacFarlane, E., Carey, R., Keegel, T., El-Zaemay, S., & Fritschi, L. (2013). Dermal exposure associated with occupational end use of pesticides and the role of protective measures. *Safety and health at work*, 4(3), 136-141.
- Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of computer-aided molecular design*, 27(3), 221-234.
- Mansour, S. A., Heikal, T. M., Mossa, A. H., & Refaie, A. A. (2008). Toxic effects of five insecticides and their mixture on male albino rats. *J Egypt Soc Toxicol*, 39, 85-94.
- Marsillach, J., Costa, L. G., & Furlong, C. E. (2013). Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology*, 307, 46-54.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595-603.
- Matthews, G. (2006). pesticides health safty and the environment, Blackwell, pp 2, 8, ISBN 1-4051-3091-1.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- Mehta, G., Singh, S., Pandey, S., & Sharma, L. (2008). Cytotoxic response of endosulfan and chlorpyrifos pesticides in poultry lymphocyte culture. *Toxicology International*, 15(2), 97.
- Mesnage, R., Bernay, B., & Séralini, G. E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 313(2-3), 122-128.
- Meyer, A., Alexandre, P. C. B., de Rezende Chrisman, J., Markowitz, S. B., Koifman, R. J., & Koifman, S. (2011). Esophageal cancer among Brazilian agricultural workers: case–control study based on death certificates. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(2), 151-155.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1977). Superoxide dismutase:“positive” spectrophotometric assays. *Analytical biochemistry*, 79(1-2), 553-560.
- Moisan, F., Spinosi, J., Delabre, L., Gourlet, V., Mazurie, J. L., Bénatru, I., ... & Elbaz, A. (2015). Association of Parkinson’s disease and its subtypes with agricultural pesticide exposures in men: a case–control study in France. *Environmental health perspectives*, 123(11), 1123-1129.
- Mokhtari, M. (2011). Recherche de résidus de quelques pesticides par couplage CPG/SM dans quelques fruits et légumes. *Thèse de Magister, Ecole Nationale Polytechnique (ENP)*, Alger, 103 p.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mossalam, H. H., Abd-El Aty, O. A., Morgan, E. N., Youssaf, S., & Mackawy, A. M. H. (2011). Biochemical and ultra structure studies of the antioxidant effect of aqueous extract of hibiscus sabdariffa on the nephrotoxicity induced by organophosphorous pesticide (malathion) on the adult albino rats. *Journal of American Science*, 7(12), 561-572.
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of toxicology*, 91(2), 549-599.

- Moussaoui K M et Tchoulak K. (2005). Enquête sur l'utilisation des pesticides en Algérie, Résultats et analyse. *Ecole Nationale Polytechnique*, Algérie, 10p
- Moussaoui, K. M., Boussahel, R., Tchoulak, Y., Haouchine, O., Benmami, M., & Dalachi, N. (2005). Utilisation. Evaluation, et impacts des pesticides en Algérie, Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement : *Ecole Nationale Polytechnique*.
- Murthy, R. S. R., & Pathak, Y. (2016). In vitro blood interaction and pharmacological and toxicological characterization of nanosystems. In *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization* (pp. 210-238). CRC Press.
- Ojha, A., Yaduvanshi, S. K., & Srivastava, N. (2011). Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(2), 148-156.
- Oturan, M. A., & Mouchel, J. M. (Eds.). (2007). *Pesticides : impacts environnementaux, gestion et traitements*. Presses de l'Ecole nationale des ponts et chaussées. Paris, pp 17, 32 ISBN : 978-2-85978-431-7
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 245(3), 194-205.
- Park, S., Johnson, D. K., Ishizawa, C. I., Parilla, P. A., & Davis, M. F. (2009). Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Cellulose*, 16(4), 641-647.
- Penel, N., & Vansteene, D. (2007). Cancers and pesticides: current data. *Bulletin du Cancer*, 94(1), 15-22.
- Pothu, U. K., Thammisetty, A. K., & Nelakuditi, L. K. (2019). Evaluation of cholinesterase and lipid profile levels in chronic pesticide exposed persons. *Journal of family medicine and primary care*, 8(6), 2073.
- Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., & Shrivastava, S. (2000). A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology*, 21(4), 435-440.
- Ramade F., 2005, Eléments d'écologie : Ecologie appliquée, 6<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, pp221, ISBN : 2 10 00 6838 5
- Reffstrup, T. K., Larsen, J. C., & Meyer, O. (2010). Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 56(2), 174-192.
- Regnault-Roger, C., Fabres G., Phylogene B-J. (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement, Lavoisier, Paris, pp 20, 45, 73 ISBN : 2-7430-0785-0
- Richardson, J. R., Roy, A., Shalat, S. L., Von Stein, R. T., Hossain, M. M., Buckley, B., ... & German, D. C. (2014). Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease. *JAMA neurology*, 71(3), 284-290.
- Rivero, J., Luzardo, O. P., Henríquez-Hernández, L. A., Machín, R. P., Pestano, J., Zumbado, M., ... & Valerón, P. F. (2015). In vitro evaluation of oestrogenic/androgenic activity of the serum

- organochlorine pesticide mixtures previously described in a breast cancer case–control study. *Science of the total environment*, 537, 197-202.
- Salameh, P. R., Baldi, I., Brochard, P., Raheison, C., Abi Saleh, B., & Salamon, R. (2003). Respiratory symptoms in children and exposure to pesticides. *European Respiratory Journal*, 22(3), 507-512.
- Samanic, C. M., De Roos, A. J., Stewart, P. A., Rajaraman, P., Waters, M. A., & Inskip, P. D. (2008). Occupational exposure to pesticides and risk of adult brain tumors. *American journal of epidemiology*, 167(8), 976-985.
- Sankar, P., Telang, A. G., & Manimaran, A. (2012). Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(5), 487-493.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., & Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(2), 295-301.
- Schachterle, S., Brittain, R. D., & Mills, J. D. (1994). Analysis of pesticide residues in food using gas chromatography—tandem mass spectrometry with a benchtop ion trap mass spectrometer. *Journal of Chromatography A*, 683(1), 185-193.
- SESSION, R., & DU COMITÉ, D. U. C. S. U. R. L. E. (2007). Programme Mixte FAO/OMS Sur Les Normes Alimentaires Commission Du Codex Alimentarius. *Proceedings of the Vingt Et Unième Session*.
- Seth, V., Banerjee, B. D., & Chakravorty, A. K. (2001). Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of rats exposed to propoxur. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 71(3), 133-139.
- Shakoori, A. R., Aziz, F., Alam, J., & Ali, S. S. (1990). Toxic effects of Talstar, a new synthetic pyrethroid, on blood and liver of rabbit. *Pakistan journal of zoology*, 22(3), 289-300.
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of toxicology*, 86(2), 165-181.
- Soltaninejad, K., & Abdollahi, M. (2009). Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med Sci Monit*, 15(3), 75-90.
- Takakura, N., Sanders, P., Fessard, V., & Le Hégarat, L. (2013). In vitro combined cytotoxic effects of pesticide cocktails simultaneously found in the French diet. *Food and chemical toxicology*, 52, 153-162.
- Takamatsu, M., Oki, M., Maeda, K., Inoue, Y., Hirayama, H., & Yoshizuka, K. (1984). PCBs in blood of workers exposed to PCBs and their health status. *American Journal of Industrial Medicine*, 5(1-2), 59-68.
- Testud, F., & Grillet, J. P. (2007). *Produits phytosanitaires: intoxications aiguës et risques professionnels*. Éditions Eska. pp 51, ISBN : 978 2 7472 1145 2

- Thiruchelvam, M., Richfield, E. K., Goodman, B. M., Baggs, R. B., & Cory-Slechta, D. A. (2002). Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology*, *23*(4-5), 621-633.
- Tillman, P. G., Hammes, G. G., Sacher, M., Connair, M., Brady, E. A., & Wing, K. D. (2002). Toxicity of a formulation of the insecticide indoxacarb to the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae), and the big-eyed bug, *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *58*(1), 92-100.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, *418*(6898), 671-677.
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine*, *14*, 5541.
- Tokunaga, S., & Kataoka, K. (2003). A Longitudinal Analysis on the Association of Serum Lipids and Lipoproteins Concentrations with Blood Polychlorinated Biphenyls Level in Chronic "Yusho" Patients.
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, *86*(1), 271-278.
- Upton, K., De Roos, A. J., Thompson, M. L., Sathyanarayana, S., Scholes, D., Barr, D. B., & Holt, V. L. (2013). Organochlorine pesticides and risk of endometriosis: findings from a population-based case-control study. *Environmental health perspectives*, *121*(11-12), 1319-1324.
- Uzun, F. G., Demir, F., Kalender, S., Bas, H., & Kalender, Y. (2010). Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos-induced lung toxicity in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(6), 1714-1720.
- Vigneshwaran, S., Sirajudheen, P., Nabeena, C. P., & Meenakshi, S. (2021). Remediation of Persistent Organic Pesticides from Wastewater Matrices—Present and Future Conceptions. In *Pollution Control Technologies* (pp. 7-37). Springer, Singapore.
- Wätjen, W., & Beyersmann, D. (2004). Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals*, *17*(1), 65-78.
- Yan, D., Zhang, Y., Liu, L., Shi, N., & Yan, H. (2018). Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: dose-response meta-analysis of observational studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *96*, 57-63.
- Yehia, M. A., El-Banna, S. G., & Okab, A. B. (2007). Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *59*(3-4), 215-225.
- Yousef, M. I., El-Demerdash, F. M., Kamel, K. I., & Al-Salhen, K. S. (2003). Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin. *Toxicology*, *189*(3), 223-234.
- Zaahkoug, S., Helal, E., Abd-Rabo, T. E., & Rashed, S. Z. (2000). Carbamate Toxicity and Protective effect of vit. A and vit. E on some biochemical aspects of male albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, *1*(1), 60-77.



Zarkovic, N. (2003). 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Molecular aspects of medicine*, 24(4-5), 281-291.

Zerin, T., Kim, Y. S., Hong, S. Y., & Song, H. Y. (2012). Protective effect of methylprednisolone on paraquat-induced A549 cell cytotoxicity via induction of efflux transporter, P-glycoprotein expression. *Toxicology letters*, 208(2), 101-107.

Zhang, Z. Y., Liu, X. J., & Hong, X. Y. (2007). Effects of home preparation on pesticide residues in cabbage. *Food Control*, 18(12), 1484-1487.

# Résumés

---

## Résumé

L'objectif de ce travail de doctorat est de déterminer les effets toxicologiques *in vitro*, *in vivo* et *in silico* de mélanges de pesticides représentatifs des produits phytosanitaires les plus utilisés sur les fruits et légumes du marché Algérien. Nous avons mis l'accent sur les mélanges de pesticides, les formulations de pesticides et les DJA afin de mimer au mieux l'exposition réelle des consommateurs et des agriculteurs à ces produits.

La première étude, *in vitro*, nous a permis de mettre en évidence la toxicité des mélanges de pesticides par comparaison aux produits pris individuellement. Les résultats ont montré que les mélanges de pesticides, ont inhibé la viabilité des cellules HT-29 et A549 alors que les pesticides utilisés seuls étaient pas ou moins toxiques. Pour la lignée cellulaire HUVEC, une augmentation de la cytotoxicité dépendant du nombre de pesticides utilisé dans les mélanges testés, a été observée. Il a aussi été constaté que les pesticides agissaient différemment sur la viabilité cellulaire. Leurs effets dépendent du type de lignée cellulaire utilisée. La cytotoxicité était plus marquée dans les mélanges de pesticides.

La seconde étude, *in vivo*, réalisé sur des rats Wistar a montré que l'exposition aux pesticides à des doses correspondant à leur DJA, a pu provoquer des perturbations dans les différents paramètres biochimiques étudiés au même titre que des altérations du statut redox. Une diminution du poids corporel et des poids relatifs des organes a aussi été observée. De plus, l'évaluation de la fonction hépatique a révélé une perturbation des transaminases et des protéines totales. Les résultats de l'évaluation de la fonction rénale ont montré que les mélanges de pesticides ont significativement augmenté les niveaux de l'urée plasmatique et de la créatinine chez les rats traités avec les mélanges de pesticides par comparaison au groupe témoin. Des perturbations dans les taux du cholestérol, des triglycérides, HDL et LDL ont aussi été observées. Il a aussi été trouvé que les mélanges des pesticides étudiés ont provoqué une diminution des activités des CAT, SOD et GPx dans le foie et les reins des rats traités.

Les résultats de l'étude *in silico* ont montré que les pesticides utilisés dans cette étude ont une grande affinité pour les enzymes étudiées et que les complexes formés sont stabilisés par un nombre important de différents types de liaisons.

Cependant, plusieurs pistes de recherche pourraient être explorées pour permettre de mieux évaluer et expliquer les phénomènes observés dans notre étude.

**Mots clés :** Mélanges de pesticides ; cytotoxicité ; culture cellulaire ; stress oxydant ; rats Wistar ; Docking moléculaire.

## Abstract

The objective of this doctoral work is to identify the *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* toxicological effects of pesticide mixtures representative of Algerian's daily fruits and vegetables intake. In order to simulate the real exposure of consumers and farmers to pesticides, the following fundamental points have been considered: pesticide mixtures, pesticide formulations, and ADIs.

The *in vitro* study allowed us to highlight the toxicity of pesticide mixtures compared to individual products. The results showed that pesticide mixtures inhibited the viability of HT-29 and A549 cells, whereas the pesticides used individually were non-toxic or less toxic. For the HUVEC cell line, an increase in cytotoxicity depending on the number of pesticides used in the tested mixtures was observed. It was also found that pesticides acted differently on cell viability and their effects depended on the type of cell line used. Cytotoxicity was more pronounced in pesticide mixtures.

The second *in vivo* study, conducted on Wistar rats, showed that exposure to pesticides using ADIs could cause disturbances in various biochemical parameters, as well as alterations in the redox status. A decrease in body weight and relative organ weights was also observed. Furthermore, the evaluation of liver function revealed disturbances in transaminases and total proteins. Results of the renal function evaluation showed that pesticide mixtures significantly increased plasma urea and creatinine levels in rats treated with the pesticide mixtures compared to the control group. A disturbance in cholesterol, triglyceride, HDL, and LDL levels was also observed. It was also found that the pesticide mixture caused a decrease in CAT, SOD, and GPx activities in the liver and kidneys of treated rats.

The results of the *in silico* study showed that the tested pesticides have a high affinity for GST, CAT and SOD enzymes, and the formed complexes are stabilized by different types of bonds.

This study revealed various adverse effects on human health due to the synergistic effects of pesticides. However, several research avenues could be explored to better assess and explain this finding.

**Keywords:** Pesticide mixtures ; cytotoxicity ; cell culture ; oxidative stress ; Wistar rats ; molecular docking.

## ملخص

الهدف من عمل الدكتوراه هذا هو تحديد التأثيرات السمية *in vivo, in vitro* و *in silico* لأمزجة من منتجات الصحة النباتية الأكثر استخدامًا على الفواكه والخضروات المباعة في السوق الجزائري. نتائج الأبحاث *in vitro* سمحت لنا بتسليط الضوء على سمية مجموعة أمزجة منتجات الصحة النباتية مقارنة بالمنتجات المأخوذة بشكل فردي. أظهرت النتائج أن أمزجة المنتجات المدروسة أثرت سلبًا على نمو خلايا HT-29 و 549A، في حين أن المبيدات المستخدمة بمفردها أظهرت أقل سمية أو عدمها اتجاه هذه الخلايا. بالنسبة للخلايا HUVEC، لوحظت زيادة في السمية الخلوية والتي تختلف اعتمادًا على عدد المنتجات المستخدمة في الأمزجة المختبرة. مكنت نتائج البحث هذه من التأكيد أن آثار النتائج تعتمد على نوع الخلية المستخدم في كل دراسة كما. أظهرت دراسة السمية الخلوية للأمزجة المدروسة أنه يمكن حدوث تأثيرات تآزرية.

أظهرت الدراسة الثانية *in vivo* أن التعرض لمجموعة من أمزجة منتجات الصحة المدروسة بجرعات تتناسب مع ADI الخاص بكل منتج منها، يمكن أن يسبب اضطرابات في المعايير البيوكيميائية. لوحظ تأثير في النمو الفسيولوجي للفئران المعالجة بالمبيدات، كما لوحظ انخفاض في وزن الجسم وأوزان الأعضاء النسبية المدروسة. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت دراسة وظائف الكبد حدوث اضطراب في مستويات ناقلات الأمين والبروتينات الكلية. فيما يتعلق بوظيفة الكلى، أوضحت النتائج أن أمزجة المنتجات المستعملة أدت إلى زيادة معنوية في مستويات اليوريا والكرياتينين في البلازما لدى الفئران المعالجة مقارنة بالمجموعة الغير معرضة لهاته المواد. تم ايضا ملاحظة اضطرابات في مستويات الكوليسترول والدهون الثلاثية HDL و LDL. كما وجد أن مخاليط المبيدات المدروسة تسببت في انخفاض نشاط CAT و SOD و GPx في الكبد والكلى للفئران المعالجة.

أظهرت نتائج الدراسة *in silico* أن المبيدات الحشرية المستخدمة في هذه الدراسة لها انجذاب كبير للإنزيمات المدروسة SOD, GST, و CAT وأن المجمعات المتكونة يتم تثبيتها بواسطة عدد كبير من أنواع الروابط المختلفة. كشفت هذه الدراسة عن العديد من الآثار الضارة على صحة الإنسان بسبب التأثيرات التآزرية لمنتجات الصحة النباتية ومع ذلك، ستكون هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتأكيد الفرضيات التي أثبتت في هذا العمل البحثي ومتابعتها.

**كلمات البحث:** أمزجة منتجات الصحة النباتية ؛ السمية الخلوية ؛ الزرع الخلوي ؛ الاكسدة ؛ فئران ويستار ؛ الالتحام الجزيئي.

