

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE DE JIJEL

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET D'ENVIRONNEMENT



MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN BIOLOGIE

OPTION : ECOTOXICOLOGIE

THEME

**LA CONTAMINATION POTENTIELLE DES EAUX
D'ALIMENTATION DE LA VILLE DE JIJEL PAR LES
METAUX LOURDS SERAIT-ELLE RESPONSABLE DE
STRESS CELLULAIRE ?**

Soutenue publiquement : Juin 2008

NASSIMA BELLI

Devant le Jury:

Dr. NOUREDDINE AZOUZ

Pr. Université de Jijel

PRESIDENT

Dr. MESBAH LAHOUEL

M.C. Université de Jijel

RAPPORTEUR

Dr. SMAIL KHELILI

Pr. Université de Jijel

EXAMINATEUR

Dr. AHMED MENAD

M.C. Université de Constantine

EXAMINATEUR

Dr. SOUAD AMEDAH

M.C. Université de Constantine

EXAMINATRICE

جامعة جيجل
المكتبة المركزية
رقم الجرد: I.H/2011

571.9/5

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET D'ENVIRONNEMENT



MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER EN BIOLOGIE

OPTION : ECOTOXICOLOGIE

THEME

**LA CONTAMINATION POTENTIELLE DES EAUX
D'ALIMENTATION DE LA VILLE DE JIJEL PAR LES
METAUX LOURDS SERAIT-ELLE RESPONSABLE DE
STRESS CELLULAIRE ?**

Soutenu publiquement : Juin 2008

NASSIMA BELLI

Devant le Jury:

Dr. NOUREDDINE AZOUZ

Pr. Université de Jijel

PRESIDENT

Dr. MESBAH LAHOUEL

M.C. Université de Jijel

RAPPORTEUR

Dr. SMAIL KHELILI

Pr. Université de Jijel

EXAMINATEUR

Dr. AHMED MENAD

M.C. Université de Constantine

EXAMINATEUR

Dr. SOUAD AMEDAH

M.C. Université de Constantine

EXAMINATRICE

Remerciements

Ce travail a abouti grâce à la haute bienveillance de Dieu, le tout-puissant, qui m'a donné la volonté, la patience et fourni l'énergie et la force pour l'achever. Gracieux remerciements.

J'aimerais adresser, en premier lieu, ma plus sincère gratitude à mon encadreur, le docteur *Lahouel Mesbah*. ça ne sera pas suffisant pour lui exprimer toute ma grande reconnaissance pour la confiance et le grand soutien et disponibilité qu'il m'a accordé pour faire avancer ce travail. Il a fait preuve à la fois d'une grande expérience scientifique et humaine, patience, gentillesse, et d'un esprit responsable, critique et rigoureux.

Je remercie très chaleureusement le professeur *Leghouchi Essaid*, le doyen de la faculté des sciences de l'université de Jijel et le directeur de laboratoire de pharmacologie et de phytochimie de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma plus vive reconnaissance pour son soutien, ses conseils, sa compétence et sa disponibilité, mais aussi pour sa bonne humeur et sa modestie.

Je remercie très vivement monsieur le professeur *Azouz Noureddine* Le vice Recteur de l'université de Jijel d'avoir bien voulu présidé mon jury de soutenance et a être intéressé à mon travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de porter un éclairage différent :

Monsieur le professeur *Khelili Smail* de l'université de Jijel, monsieur le docteur *Menad Ahmed* de l'université de Constantine et madame le docteur *Amadahi Souad* de l'université de Constantine qui m'ont fait l'honneur de siéger à ce jury de soutenance.

J'exprime mes plus vifs remerciements, et ma reconnaissance toute particulière à l'égard de monsieur *Tekouk Mustapha* maître assistant en hydrogéologie à l'université de Jijel pour l'aide précieuse et chaleureuse qu'il m'a apporté, et qui a bien voulu me consacrer une précieuse partie de son temps pour discuter la partie géologique du travail, et m'a prodigué de fructueux conseils.

Je remercie vivement *Yahia* et l'ensemble du personnel des laboratoires de chimie et de biologie de la faculté des sciences pour leur aide et leur patience durant la période de réalisation de ce travail.

Je remercie pour leur amitié et la chaleureuse ambiance qu'elles ont fait générer au laboratoire *Samira, Fatima, Kranfla, Safia, Widad, Massika* et *Hasnaa*. Je remercie également toutes mes amies de la promotion précédente et plus particulièrement *Lilia* et *Hanane*.

Un grand merci tout spécial à *ma mère*, la perle précieuse de ma vie, toutes les pages noircies de ce manuscrit ne suffiront pas à la remercier pour le soutien et l'amour infini qu'elle m'a toujours apporté, à mon très cher *père*, la lumière et symbole de ma vie, que je lui souhaite un bon rétablissement, à ma sœur *Zoubida* et son époux *Nabil* et leur deux anges *Amir* et *Anis* et enfin à mon frère *Karim* qui n'ont cessé de me soutenir et d'encourager au cours de ce travail et pour m'avoir plus d'une fois remontée le moral, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon grand amour.

Enfin, une pieuse pensée à la mémoire de ma très chère amie et sœur *Sonia*... que je n'ai pu jamais oublier.

SOMMAIRE

Introduction	1
---------------------------	----------

CHAPITRE I : Les métaux lourds dans l'eau

I-1. Généralités sur l'eau	4
I-1-1 Les ressources en eau	4
I-1-2 Cycle de l'eau	4
I-1-3 L'eau dans l'organisme humain	5
I-1-4 L'eau et santé publique	6
I-2. La pollution métallique de l'eau	7
I-2-1 Définition d'une eau polluée	7
I-2-2 Pollution des écosystèmes aquatiques	7
I-2-3 Origines des polluants du milieu aquatique	8
I-2-4 La pollution métallique de l'eau	9
I-3. Lois, réglementations et normes	10
I-3-1 Normes de la qualité de l'eau potable	11
I-3-2 Les valeurs guides de l'OMS	11
I-3-3 La qualité chimique de l'eau de boisson	12

I-4. Généralités sur les métaux lourds.....	13
I-4-1 Définitions et caractéristiques	13
I-4-2 Rôle biologique.....	15
I-5. Sources des métaux lourds dans l'environnement aquatique	16
I-5-1 Sources naturelles.....	16
I-5-2 Sources anthropiques.....	17
I-5-2-1 Origine industrielle	18
I-5-2-2 Origine agricole	18
I-5-2-3 Origine domestique et urbaine	19
I-5-2-4 Origine routière	19
I-5-3 Le passage des métaux lourds dans l'environnement aquatique	20
I-5-3-1 Altération géologique.....	20
I-5-3-2 L'exploitation et utilisation	20
I-5-3-3 Les prélèvements d'eau	21
I-5-3-4 Retombées atmosphériques	21
I-5-3-5 Excrétions animales et humaines	21
I-5-4 Cycle géochimique de métaux lourds dans l'environnement	21
I-6.Principales propriétés physico-chimiques des métaux lourds	23
I-6-1 Solubilité	23
I-6-2 Stabilité.....	24
I-6-3 Volatilisation	24
I-7.Chimie environnemental des métaux lourds.....	24
I-7-1 Formes chimiques des métaux lourds dans l'environnement aquatique	24
I-7-2 Spéciation métallique.....	26
I-7-2-1 Définition.....	26
I-7-2-2 Espèces chimiques.....	26
I-7-2-3 Réactions et comportement des métaux lourds dans l'eau	27

I-7-2-4 Effets des conditions environnementales.....	30
I-7-2-5 Les interactions entre les métaux et autres polluants.....	31
I-8. La toxicité des métaux lourds	31
I-9. Les métaux de références.....	33
I-9-1 Cadmium.....	34
I-9-1-1 Utilisations.....	34
I-9-1-2 Toxicocinétique	34
I-9-1-3 Toxicité	35
I-9-1 Plomb.....	36
I-9-1-1 Utilisations	36
I-9-1-2 Toxicocinétique	37
I-9-1-3 Toxicité.....	37

CHAPITRE II : Métaux lourds et stress oxydant

II-1. Le stress oxydant.....	40
II-1-1 Concept.....	40
II-1-2 Définition	40
II-1-3 Généralités sur les radicaux libres d'oxygène	41
II-1-3-1 Métabolisme de l'oxygène dans la cellule	41
II-1-3-2 Définition des radicaux libres	42
II-1-3-3 Principaux radicaux libres.....	43
II-1-3-4 Sources des radicaux libres	45
II-1-3-5 Rôle physiologique des radicaux libres	51
II-1-3-6 Rôle pathologique des radicaux libres.....	51
II-1-4 Les moyens de défense contre les radicaux libres : les antioxydants.....	54

II-1-4-1 Les antioxydants enzymatiques	54
II-1-4-2 Les antioxydants non enzymatiques.....	56

II-2. Implication des métaux lourds dans la génération du stress oxydant..... 59

II-2-1 Mécanismes d'action d'un stress induit par les métaux	59
II-2-1-1 Les métaux lourds non essentiels : exemple du cadmium	59
II-2-1-2 Les métaux lourds essentiels : exemple du zinc.....	63

CHAPITRE III :Matériel et méthodes

III-1.Choix des sites d'études..... 67

III-2. Identification de la zone d'étude..... 68

III-2-1 Cadre géographique.....	68
III-2-2 Le contexte socio-économique	69
III-2-3 Description des sites retenus	69
III-2-4 Le réseau hydrographique.....	72

III-3.Caractéristiques climatologiques de la zone d'étude 72

III-3-1 Précipitation météorologique	72
III-3-2 La température	74

III-4. Cadre géologique 74

III-4-1 Localisation géologique de la zone d'étude	74
III-4-2 Stratigraphie.....	75
III-4-3 Formations susceptibles de libérer les métaux lourds	77

III-6. Analyse statistique des résultats	95
--	----

CHAPITRE VI : Résultats et interprétation

VI-1. Résultats d'analyse métallique.....	97
---	----

VI-1-1 Plomb.....	97
VI-1-2 Cadmium	99

VI-2. Synthèse des résultats de l'étude toxicologique	102
---	-----

VI-2-1 Variations <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante enzymatique.....	102
VI-2-1-1 Variations <i>in vitro</i> de l'activité enzymatique de la SOD.....	103
VI-2-1-2 Variations <i>in vitro</i> de l'activité enzymatique de la CAT	105
VI-2-2 Variations <i>in vitro</i> de La peroxydation lipidique	108
VI-2-3 Variations <i>in vivo</i> de l'activité antioxydante enzymatique.....	111
VI-2-3-1 Variations <i>in vivo</i> de l'activité enzymatique de la SOD	111
VI-2-3-2 Variations <i>in vivo</i> de l'activité enzymatique de la CAT	113
VI-2-4 Variations <i>in vivo</i> de La peroxydation lipidique	114
VI-2-5 Variations des taux de glutathion hépatique	116

CHAPITRE V : Discussion

V.1. Evaluation des degrés de contamination métallique et leurs origines éventuelles	120
---	-----

V.2.Evaluation des effets de métaux lourds sur le stress oxydant.....	129
Conclusion.....	140
Annexes.....	144
Références bibliographiques	150

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ALAD	Acide δ -aminolévulinique déshydratase
ALAS	Acide δ -aminolévulinique synthétase
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CEE	Communauté Economique Européenne
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
COX	Cycloxygénase
Cu/Zn- SOD	Superoxyde dismutase cytosolique
DCE2000/CE	Directive cadre européenne sur l'eau
DMA	Dose maximale admissible
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ETM	Eléments traces métalliques
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HSF1	Heat shok protein Factor 1
ISO	International organization for standardization
LO	Lipoxygénase
MDA	Malondialdéhyde
MT	Métallothioneine
NBT	Bleu de nitrotétrazolium
NO	Nitric oxide
O ²⁻	Anion superoxyde
OH [·]	Radical hydroxylé
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONM	Office national de météologie
Pb	Plomb
pH	Potentiel hydrogène
Ppm	Partie par million
RNS	Espece réactive d'azote
ROS	Reactive oxygen species
SAA	Absorption atomique
SH	Groupement thiol
SOD	Superoxyde dismutase
SOD Mn	Superoxyde dismutase mitochondriale
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
Temp	Température
TRX	Thiorédoxine

TSE
TS
UV
Zn

Tampon Tris-Sucrose-EDTA
Tampon Tris-Sucrose
UV/visible Spectrophotomètre
Zinc

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : le cycle de l'eau	4
Figure 2 : Les flux des matières transitant par le sol	5
Figure 3 : Cycle géochimique simplifié des métaux lourds	22
Figure 4 : Principales réactions des métaux lourds dans l'eau	27
Figure 5 : Les facteurs influençant la biodisponibilité et la toxicité des métaux lourds ...	32
Figure 6 : Les radicaux libres de l'oxygène produits en cascades à partir de l'oxygène fondamental (ou moléculaire : $^3\text{O}_2$ couramment représenté par O_2)	42
Figure 7 : Sites de production des ROS au niveau de la chaîne respiratoire	46
Figure 8 : Chaîne respiratoire mitochondriale	47
Figure 9 : Sources cellulaires de radicaux libres	49
Figure 10 : L'influence des facteurs abiotiques et biotiques sur les réponses physiologiques et biochimiques d'un organisme estuarien	50
Figure 11 : Processus de peroxydation lipidique	52
Figure 12 : Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant	53
Figure 13 : Schéma illustrant l'implication du GSH dans le métabolisme des xénobiotiques et des radicaux libres	56
Figure 14 : Régulation de la production des ROS par les systèmes de défenses antioxydantes	58
Figure 15 : schéma représentatif des effets toxiques de cadmium	60
Figure 16 : Mécanisme de stress oxydant Cd induit dans une cellule nerveuse	60
Figure 17 : Interactions entre le cadmium et le zinc liées aux métallothionéines	61
Figure 18 : Schéma général des conséquences biologiques du cadmium sur la cellule ...	62
Figure 19 : Les effets d'une carence en zinc	64
Figure 20 : Libération du zinc par différents composés oxydants	65
Figure 21 : Localisation géographique de la wilaya de Jijel	68

Figure 22 : Zones homogènes de la wilaya de Jijel.....	70
Figure 23 : Situation de bassin versant de l'oued Nil.....	71
Figure 24 : Carte hydrographique de la Wilaya de Jijel	72
Figure 25 : Carte Pluviométrique de la Wilaya de Jijel.....	73
Figure 26-A : Coupe géologique au niveau de la plaine alluviale de l'oued Nil	75
Figure 26-B : Esquisse géologique de la carte géologique de la Jijel	76
Figure 27 : Spectromètre d'absorption atomique SAA6200.....	81
Figure 28 : principe de fonctionnement de l'UV/VIS.....	82
Figure 29 : Réaction du MDA avec les molécules de TBA.....	93
Figure 30 : Concentration moyenne (en ug/l) \pm écart type du plomb contenue dans les eaux des sites retenus	98
Figure 31 : Concentration moyenne (en ug/l) \pm écart type du cadmium contenu dans les eaux des sites retenus	102
Figure 32 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc <i>in vitro</i>	104
Figure 33 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc <i>in vitro</i>	104
Figure 34 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc <i>in vitro</i>	107
Figure 35 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc <i>in vitro</i>	107
Figure 36 : Variations des taux du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines) généré suite à la peroxydation lipidique induite <i>in vitro</i> par le fer pour le témoin et par les différentes concentrations molaires des métaux étudiés pour les extraits traités	110
Figure 37 : Variations des taux du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines) généré suite à la peroxydation lipidique physiologique pour le témoin et par les différentes concentrations molaires des métaux étudiés pour les extraits traités	110

Figure 38 : Variations de l'activité enzymatique de Cu/Zn-SOD hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson.....	111
Figure 39 : Variations de l'activité enzymatique de Mn-SOD hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson.....	112
Figure 40 : Variations de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson	113
Figure 41 : Variations de l'activité enzymatique de la CAT mitochondriale hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson	114
Figure 42 : Variations des taux de MDA cytosolique (nmoles/g de foie) après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson	115
Figure 43 : Variations des taux de MDA mitochondriale (nmoles/mg de protéines) après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson.....	116
Figure 44 : Variations des concentrations en glutathion hépatique (mM/g de foie) après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson.....	117
Figure 45 : Mécanismes possibles du stress oxydant du plomb	134

LISTE DES REACTIONS

Réaction 1 : Formation de l'oxygène singulet (O^1_2)	43
Réaction 2 : Formation de l'anion superoxyde (O°_2)	43
Réaction 3 : Formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	43
Réaction 4 : Réaction d'Haber – Weiss	44
Réaction 5 : Réaction du Fenton	44
Réaction 6 : Interaction entre O°_2 et l'oxyde nitrique (NO°)	44
Réaction 7 : La réaction de NO° avec l' O°_2	45
Réaction 8 : Réaction de dismutation de l'anion superoxyde par la SOD	54
Réaction 9 : Réaction de dégradation de H_2O_2 en H_2O et O_2 par la CAT	55
Réaction 10 : Réaction d'oxydation du GSH en GSSG par la GPx	55
Réaction 11 : Réaction de réduction du GSSG en GSH par la GR	56
Réaction 12 : Inhibition de la réduction du NBT par l' O°_2 suite à la photoréaction de l' O_2 et de la riboflavine en présence de la méthionine	90
Réaction 13 : Réaction de complexation du MDA avec le TBA	92
Réaction 14 : Réaction de l'oxydation du GSH par le DTNB	94
Réaction 15 : Séquestration du cadmium par le GSH	138

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Origines et natures de différentes sources de pollution du milieu aquatique..	9
Tableau 2 : Valeurs guides des métaux lourds	12
Tableau 3 : Teneurs de quelques éléments contenus dans les principaux compartiments solides terrestres (en mg/kg)	17
Tableau 4 : Estimation des émissions polluantes (en mg/kg/an)	19
Tableau 5 : diverses formes chimiques des métaux dans l'eau	25
Tableau 6 : Répartition mensuelle des précipitations (en mm) : 1998-2007.....	73
Tableau 7 : Répartition mensuelle moyenne des températures en C°(1998-2007).....	74
Tableau 8 : Quantité des réactifs utilisée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage de cadmium.....	83
Tableau 9 : Concentrations moyennes de plomb \pm écarts types mesurées dans les sites retenus	97
Tableau 10 : Normes pour les maxima admissibles ou recommandés des concentrations du plomb dans l'eau potable (ug/l).....	99
Tableau 11 : Concentrations moyennes de cadmium \pm écarts types mesurées dans les sites retenus.....	100
Tableau 12 : Normes pour les maxima admissibles ou recommandés des concentrations du cadmium dans l'eau potable (ug/l)	101
Tableau 13 : Variation de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations des métaux lourds <i>in vitro</i>	103
Tableau 14 : Variation de l'activité enzymatique de la CAT mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations des métaux lourds <i>in vitro</i>	106
Tableau 15 : Variation des taux du MDA mitochondrial généré suite à une peroxydation lipidique induite <i>in vitro</i> par le plomb, le cadmium et le zinc	109
Tableau 16 : Variation de l'activité enzymatique de Cu/Zn-SOD et Mn-SOD hépatique des rats après contamination subchronique de 30 jours par les différentes concentrations du mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson.....	111
Tableau 17 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale hépatique des rats après contamination subchronique de 30 jours par les différentes concentrations du mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson	113

Tableau 18 : Variation des taux du MDA cytosolique et mitochondrial après administration de différentes concentrations des associations du plomb et du cadmium pendant 30 jours dans l'eau de boisson des rats 115

Tableau 19 : Variation des taux de GSH cytosolique hépatique après administration de différentes concentrations des associations du plomb et du cadmium pendant 30 jours dans l'eau de boisson des rats 119

4

INTRODUCTION

4

4

Introduction

L'environnement peut devenir une source de danger par le biais de phénomènes naturels, d'activités économiques (énergie, industrie, agriculture,...) et d'activités humaines (habitations, lieu de travail,...).

L'eau représente un vecteur important entre l'environnement et l'homme. Elle constitue le principal véhicule des effluents d'origines diverses (fertilisants, métaux lourds, pesticides), des microorganismes et des molécules biologiquement actives. Dans la quasi-totalité des pays, des études identifient des problèmes de la santé liés à des contaminations de l'eau. Ces études ne sont pas nouvelles. En 1855, John Snow avait publié des résultats de son étude novatrice des causes du choléra à Londres, dans laquelle il l'attribuait à l'eau potable contaminée par des eaux d'égout non traitées- marquant ainsi le début de l'épidémiologie (Emoto, 2002).

Aujourd'hui, la qualité de l'eau est au cœur de l'actualité sociale et médiatique et les risques véhiculés par l'eau représentent une préoccupation planétaire qu'il s'agisse de risques aigus ou de risques chroniques avec la problématique difficile des conséquences pour la santé humaine des faibles doses répétées de toxiques cumulatifs ou additifs. La situation actuelle est déjà inquiétante, dans l'ensemble du monde, il y a 2,3 millions d'habitants atteints de maladies liées à l'eau (WHO, 1992). Les maladies hydriques également appelées maladies «de l'eau sale» sont le résultat de la contamination de l'eau par des déchets humains, animaux et chimiques.

Les métaux lourds, sont naturellement présents dans l'eau à des concentrations très faibles. Le développement de l'activité industrielle (exploitations minières, industries métallurgiques et chimiques) et de l'activité agricole (pesticides, engrais) depuis le siècle dernier a entraîné des apports parfois intenses de ces éléments qui deviennent des polluants problématiques pour l'eau (Chatain, 2004). Les métaux peuvent constituer un sérieux problème de santé publique du fait de leur grande toxicité et de leur caractère bioaccumulatif. En effet, si certains métaux sont souvent indispensables au métabolisme des êtres vivants (oligoéléments), nombre d'entre eux sont toxiques lorsque leur concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas par exemple du fer, du manganèse, du cuivre, du zinc ou du nickel. D'autres comme le cadmium, le mercure ou le plomb ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être préjudiciables (Gardas, 2000).

Avec le cadmium, le plomb fait partie des trois métaux classés comme polluants prioritaires de l'eau par la Communauté Economique Européenne (CEE) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Une attention toute particulière est actuellement portée à la contamination des sources d'eau par ces deux métaux. En cela, ces deux métaux représentent

Introduction

des excellents modèles pour l'étude de l'incidence des autres métaux sur la santé et l'environnement.

De plus, il apparaît aujourd'hui, que les analyses physicochimiques sont insuffisantes pour caractériser l'état de cette contamination, car elles ne prennent généralement pas en compte les notions de mélanges, des interactions possibles, de spéciation ou de biodisponibilité des métaux lourds dans un milieu complexe comme l'eau (Sobhi, 1997). Il est nécessaire donc, de compléter ces mesures par des données biologiques permettant d'évaluer l'effet potentiel global des métaux lourds présents dans l'eau.

Cette nouvelle approche suscite à l'heure actuelle bien des recherches qui utilisent des biomarqueurs comme des outils biologiques performants pour évaluer la toxicité du plomb et du cadmium au niveau cellulaire et moléculaire notamment à des faibles concentrations. Parmi ces biomarqueurs, nous allons nous focaliser, dans ce travail sur l'étude des biomarqueurs de stress oxydant. L'exposition au plomb et au cadmium engendre une perturbation de la balance anti-prooxydante, dont l'origine est la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) (Frelon, 2001). L'aptitude de la cellule à gérer les conséquences du stress métallique dépend de leur capacité à mobiliser ses systèmes de défenses antioxydantes (Silvestre, 2005). Dans le cas où ces systèmes sont dépassés, les ROS s'attaquent aux macromolécules biologiques dans l'environnement direct de leur production, et provoquent des dommages lipidiques, une oxydation des protéines et des atteintes de l'ADN nucléaire et mitochondriale (Joris, 2005).

Dans ce mémoire, nous nous sommes donc attachés à évaluer dans la première partie du travail, les degrés et les origines éventuelles de la contamination des sources d'eaux de la ville de Jijel par des métaux lourds (plomb et cadmium) et à décrire dans la seconde partie les effets de ces métaux sur les bio marqueurs enzymatiques (la catalase, la superoxyde dismutase) et non enzymatiques (la peroxydation lipidique, le glutathion total) du stress oxydant mitochondrial et cytosolique, en utilisant les concentrations environnementales détectées à partir des analyses physicochimiques, mais aussi d'autres concentrations supérieures à la teneur environnementale maximale trouvée.

Chapitre I :
LES METAUX LOURDS DANS
L'EAU

I-1. Généralités sur l'eau

L'eau, constitue l'une des ressources naturelles « critiques » de la planète. Leur mise en valeur et le soin apporté à leur gestion conservatoire ont beaucoup contribué à l'épanouissement des civilisations successives. A contrario, leur dégradation, a pu être dans le passé une cause de déclin durable ; elle constitue toujours aujourd'hui une menace importante pour l'avenir de la terre (Gogenet, 2007).

I-1-1 Les ressources en eau

Vu de l'espace, la terre est une planète bleue, sa couleur lui vient de l'eau qui occupe deux tiers de sa surface, seulement 2,5 % de ces ressources sont constituées d'eaux douces. Sur ces 2,5% les réservoirs disponibles pour l'être humain sous forme de fleuves, lacs et réservoirs ne représentent que 0,26 % de la totalité de l'eau douce, ce qui représente environ 0,007 % de toute l'eau de la planète (Wilser, 2004).

I-1-2 Cycle de l'eau

L'hydrosphère et l'atmosphère ont été créées grâce au dégazage des métaux en fusion dans le manteau de la terre. Ce phénomène a encore lieu aujourd'hui et s'effectue via les volcans qui expulsent vapeur d'eau et gaz carbonique lors des éruptions (Averlant et al, 2006). Presque la même quantité d'eau que celle présente dans l'hydrosphère serait encore actuellement présente dans le manteau de la terre. Elle circule entre les océans, les continents et l'atmosphère (figure 1), ce mouvement perpétuel est entretenu par l'énergie solaire.

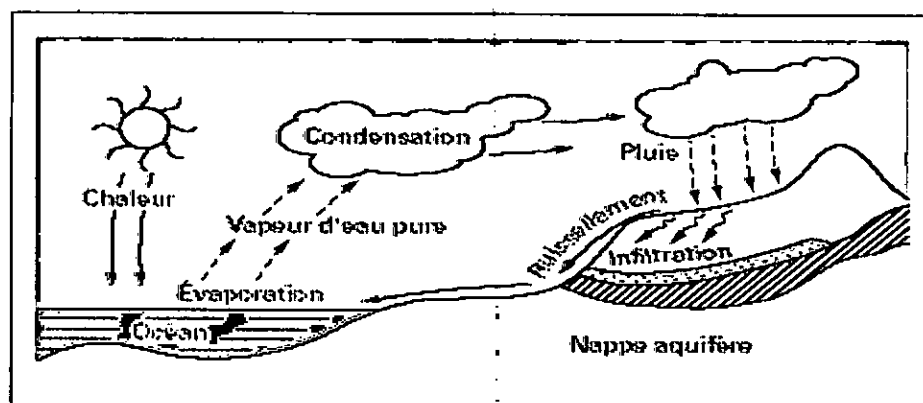


Figure 1 : le cycle de l'eau (Chatain, 2004).

Au cours de son cycle, l'eau joue un rôle prépondérant dans les transferts des matières entre les différents réservoirs, elle peut se charger en composants des sols et des roches mères, elle peut

également acquérir des sels minéraux en grandes quantités (calcium, magnésium, sulfates...) ou d'autres composés (fer, manganèse,...) (Audry, 2003). D'autres éléments liés à l'activité de l'homme peuvent être entraînés (nitrates, nitrites, pesticides, métaux lourds,...) (figure 2).

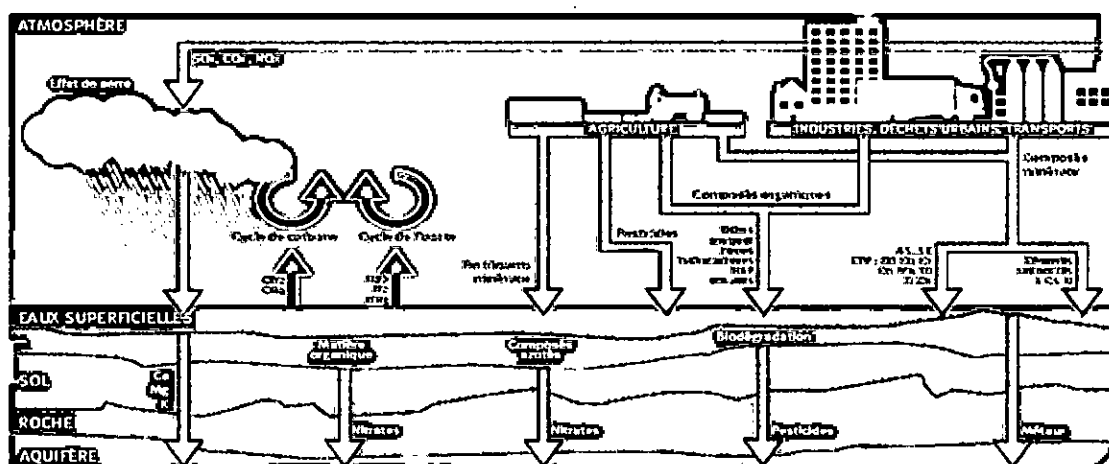


Figure 2 : Les flux des matières transitant par le sol (Wilser, 2004).

I-1-3 L'eau dans l'organisme humain

D'un point de vue biologique, c'est dans l'eau que la vie est apparue et c'est grâce à elle qu'elle se maintient (Kan et al, 2002). De tous les composants de l'organisme humain, l'eau est quantitativement le plus important, elle représente 60 à 70% du poids corporel chez les adultes, ce qui correspond à quelques 40 litres d'eau (Moss, 1980). Une partie de cette eau se trouve dans le sang, le reste entre dans la composition des organes (Ross, 1999).

L'eau assure le contact physique des molécules. Elle est aussi le milieu où se déroulent toutes les réactions et transmissions entre les cellules sur divers plans (physiologique, chimique, électrochimique...). Les cellules absorbent aussi les différents types de rayonnements (lumière visible, ultraviolet, infrarouge,...) dont les résonances entretiennent l'équilibre de la fonction vitale des cellules à travers l'eau organique. Ainsi, l'eau, en mémorisant toutes ces données, permet au cerveau de capter, traiter et transmettre les informations aux cellules pour développer les programmes d'activités cellulaires (modification d'ADN,...). L'eau est donc un relais essentiel et en même temps un vecteur d'information sur le milieu environnant (Emoto, 2002).

I -1-4 L'eau et santé publique

La santé humaine est étroitement liée à la qualité d'eau consommée ; comme le disait le biologiste Renne Kuintone «Notre organisme n'est autre qu'un gigantesque aquarium dans lequel baignent des milliards de cellules» (Emoto, 2002).

La qualité d'eau de consommation est un facteur déterminant pour le bien être humain et son développement. Les agents pathogènes ou polluants transportés dans les eaux de consommation ont déjà provoqué des sérieuses catastrophes sanitaires pour les personnes obligées d'utiliser pour leur consommation ou l'irrigation des eaux contaminées.

Les conséquences peuvent être graves, telle l'épidémie de choléra en Amérique du Sud en 1991/1992 ou encore la contamination par l'arsenic au Bangladesh, l'arsenic qui se trouve dans les eaux de lixiviation des sédiments s'infiltrer dans les nappes d'eau. Plus de 25 % des 4 millions de puits tubulaires qui sont la principale source d'eau de boisson ont une teneur dangereuse en arsenic (> 0.01 mg/l). Près de 75 millions de personnes sont exposées à l'empoisonnement par l'arsenic, qui peut provoquer des cancers du sein, des maladies des reins et du foie, des problèmes respiratoires et la mort. Environ 24 millions de personnes ont déjà été contaminées par l'arsenic (Nicolau, 2005).

En début du XXI^e siècle, la terre et ses formes de vies diverses et abondantes, notamment ses 6 milliards d'être humains sont confrontés à une grave crise de la qualité de l'eau (UNESCO, 2003). Les maladies Hydriques causent, estime-t-on, 12 millions de morts par an, la plupart des victimes sont des enfants vivants dans des pays en développement (UNESCO, 2003).

L'Organisation Mondiale de la Santé(OMS) affirme, avec insistance, que 80 % des maladies proviennent de l'eau de boisson, dont les cancers divers, les maladies mentales, les hypertensions, les attaques cardiaques, Alzheimer, et les rhumatismes (WHO, 1992).

I -2. La pollution métallique de l'eau

Parmi les différents types de pollution, le problème posé par la pollution des écosystèmes aquatiques due aux métaux lourds est tout à fait singulier. Il est lié à la spécificité de la contamination, souvent multiéléments, et aux caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, température,...). La pollution de l'eau par les métaux lourds est particulièrement problématique en raison de leur non biodégradabilité par rapport à la pollution organique et de leur toxicité (Audry, 2003).

I -2-1 Définition d'une eau polluée

L'eau à l'état naturel, superficielle ou souterraine, n'est jamais pure ; c'est un milieu vivant qui se charge très rapidement de divers éléments en contact des milieux qu'elle traverse et sur lesquelles elle ruisselle. Ces éléments peuvent être présents dans l'eau sous trois états (gaz, solide, liquide), possédant un caractère minéral ou organique parfois toxique, et à l'état particulaire, avoir des dimensions très variables (Zmirou, 2000).

On parle d'une pollution de l'eau lorsque celle-ci renferme des substances dont les teneurs sont telles que cette eau présente des risques pour la santé (Metiche, 2004).

I -2-2 La pollution des écosystèmes aquatiques

A cause du cycle de l'eau, les écosystèmes aquatiques sont susceptibles d'être contaminés par des pollutions accidentelles ou chroniques (Audry, 2003).

Un écosystème est dit pollué lorsque son équilibre a été modifié de façon durable et pratiquement irréversible par l'apport, en quantités trop importantes, soit de substances plus ou moins toxiques d'origines naturelles ou issues d'activités humaines (engrais, produits phytosanitaires, nitrates, métaux lourds, pesticides, hormones,...) ou encore d'eau trop chaude. Ces polluants peuvent entraîner divers types de nuisances : augmenter la mortalité de certaines espèces animales ou végétales jusqu'à parfois les faire disparaître, altérer leurs capacités physiologiques, détériorer la qualité de l'eau au point de la rendre impropre à certains usages comme l'alimentation humaine (Moss, 1980).

La Directive Cadre Européenne sur l'eau (DCE2000/CE) étend la définition classique physico-chimique de la qualité de l'eau à une notion globale de l'état écologique des eaux superficielles et du bon état chimique des eaux souterraines. Elle introduit la conception relativement nouvelle de «bon état écologique de masse d'eau» comme objectif général commun en 2015. Cette directive spécifie dans son article 2, définition 35 qu'une norme (ou seuil) de qualité environnementale de l'eau correspond à «la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biota qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement», ceci implique que ce seuil puisse protéger les organismes pélagiques, les organismes benthiques, les prédateurs et la santé humaine (Roche et al, 2005).

Deux notions sont associées dans ce domaine : la pollution et la contamination (Alloway , 1995 ; Baize, 1997).

- La pollution est définie par Alloway (1995) comme l'introduction par l'homme dans l'environnement de substances ou d'énergies risquant :
 - ✓ de mettre en danger la santé humaine,
 - ✓ de nuire aux ressources vivantes et aux écosystèmes,
 - ✓ de porter atteinte aux structures et à la préservation de l'environnement,
 - ✓ ou d'interférer avec les usages légitimes de l'environnement.

Cette notion est fortement associée à celle de la toxicité.

- La contamination ou les apports anthropiques ne semblent pas provoquer des effets manifestants nuisibles sur l'environnement, mais provoque :
 - ✓ un accroissement des teneurs suite aux activités humaines (Crine, 1993),
 - ✓ un accroissement des risques (Crosnier, 1999).

I-2-3 origines des polluants du milieu aquatique

En rejetant des effluents contaminés dans le milieu aquatique, les activités humaines industrielles, agricoles ou urbaines polluent les eaux. On peut distinguer trois grandes familles de pollutions, la pollution physique, chimique et biologique (tableau 1).

Tableau 1 : Origines et natures de différentes sources de pollution du milieu aquatique (Nicolau, 2005).

Types de pollution	Natures	Origines
Physique	Rejets d'eau chaude	Centrales thermiques, nucléaires
	Matières en suspension	Rejets urbains, érosion des sols
Chimique	Matières organiques	Effluents domestiques, agricoles, agroalimentaires
	Fertilisants (nitrates, phosphates)	Agriculture, lessives
	Métaux (Pb, Cd, Hg, Al, As)	Industrie, agriculture, déchets
	Pesticides (insecticides, herbicides, fongicides)	Industrie, agriculture
	Organochlorés (BCP, solvants)	Industrie
	Composés organiques de synthèse	Industrie
	Détergents	Effluents domestiques
	Hydrocarbures	Industrie pétrolière, transports
Biologique	Bactéries, virus, champignons	Effluents urbains, agricoles

Le déversement dans le milieu aquatique d'effluents contaminés n'est pas la seule source de pollution des eaux de surfaces ou souterraines. En effet, l'eau de pluie permet aux polluants rejetés dans l'atmosphère de retomber sur les sols et lessive les zones polluées par ruissellement et/ou infiltration. Ces xénobiotiques peuvent rejoindre le milieu aquatique (Biney et al, 2001).

I -2-4 La pollution métallique de l'eau

Les métaux lourds sont présents généralement en quantité très faible (à l'état de trace) dans la croûte terrestre. Leur présence dans les eaux naturelles résulte de processus naturels (érosion et altération, émission volcaniques, diffusion d'aérosols à partir des sols et de l'eau de mer) et de l'activité humaine (industrie, agriculture, urbanisation, exploitation minière). Cette dernière est aujourd'hui considérée comme la principale source de contamination des eaux par les métaux lourds.

De grandes quantités de métaux sont rejetées par l'homme dans l'environnement.

La plupart de ces métaux sont toxiques pour les êtres vivants et, directement ou indirectement pour les populations humaines. Des concentrations de l'ordre de nanogrammes ou de microgramme de ces métaux, sont suffisantes pour provoquer des effets biologiques toxiques sur les organismes ou rendre l'eau impropre à la consommation (Chassin et al, 1996 ; Cuita, 2003).

L'industrie a souvent privilégié les sites à proximité des fleuves pour trois raisons : pour le transport de matières premières, pour l'alimentation en eau, qui permet de refroidir les installations, et pour les possibilités de rejets des effluents industriels. Pendant des dizaines d'années les fleuves ont hérités des rejets industriels et des eaux résiduaires, déchets liquides résultant de l'extraction ou de la transformation de matières premières, et de toutes formes d'activités de production (Miquel, 2001).

L'eau est un élément particulièrement important pour les polluants en générale et les métaux lourds en particulier, car l'eau va entraîner des réactions liées à l'acidité, l'alcalinité, la température, l'oxygène,...etc. Les milieux aquatiques sont très sensibles aux métaux lourds par l'existence de deux phénomènes de bioaccumulation et de biomagnification, les métaux lourds se concentrent au fur et à mesure des absorptions dans la chaîne alimentaire (Beliefert et al, 2001).

I-3. Lois, réglementations et normes

Selon l'OMS, une eau de boisson saine ne présente aucun risque notable pour la santé d'une personne qui la consommerait sur toute sa vie, compte tenu des variations de sensibilité éventuelles entre les différents stades de la vie. Les plus exposés aux risques de maladies véhiculées par l'eau sont les nourrissons et les jeunes enfants, les personnes affaiblies ou vivant dans des mauvaises conditions d'hygiène et les personnes âgées (OMS, 2004). En Algérie, la loi relative à l'eau a pour objet la protection des systèmes aquatiques et des milieux hydriques contre toute forme de pollution susceptible d'altérer la qualité des eaux et de nuire à leurs différents usages. Selon cette loi, les rejets d'effluents, les déversements ou les dépôts de matières de toute nature risquant de nuire

- à la capacité de régénération naturelle des eaux ;
- aux exigences de l'utilisation des eaux ;
- à la santé et la salubrité publiques ;
- à la protection des écosystèmes aquatiques ;
- à l'écoulement normal des eaux ;
- aux activités de loisirs nautiques

sont interdits (Journal Officiel de la République Algérienne, 2005) .

L'eau de boisson contient une grande variété de contaminants microbiens et chimiques susceptibles de provoquer des effets préjudiciables pour la santé humaine (Mecum, 1999).

Il convient en théorie de surveiller une infinité de paramètres et de disposer d'une infinité de seuils normatifs, ce qui, d'un point pratique, n'est pas envisageable (Ross, 1999). Dans l'eau brute comme dans l'eau distribuée aux consommateurs, la détection de ces constituants est souvent lente, complexe et coûteuse, ce qui limite la possibilité d'alerte précoce et l'accessibilité économique. Par conséquent chaque pays détermine un nombre de paramètres à surveiller permettant de garantir l'absence d'effets résiduels pour la santé liés à la consommation de l'eau.

Un contrôle efficace de l'eau de boisson s'appuie sur une législation, des normes et des codes appropriés et sur leurs applications. La nature et la forme de ces normes peuvent varier d'un pays ou d'une région à l'autre (Mecum, 1999). La formulation précise de la législation de chaque pays dépendra de considérations nationales, constitutionnelles et d'autres. Il n'existe pas d'approche unique, universellement applicable malgré la tendance actuelle à la standardisation des normes notamment dans les pays industrialisés (Ross, 1999).

I -3-1 Normes de la qualité de l'eau potable

Ce sont des normes qui visent à s'assurer que l'eau de boisson est exempte de microorganismes pathogènes et que les composés chimiques toxiques susceptibles d'être présents dans l'eau se maintiennent à des concentrations qui ne présentent pas des risques pour la santé publique ; c'est la garantie d'une eau de qualité (Smets, 2005).

Les normes s'appuient, en général sur les études scientifiques et sur les travaux médicaux montrant la dangerosité d'un produit et établissant sa dose maximale admissible (DMA), c'est-à-dire la quantité du produit qu'un individu peut absorber sans danger quotidiennement tout au long de sa vie. Par sécurité, la valeur de la norme sera largement inférieure à cette dose, afin d'éviter le développement de pathologies malgré le dépassement de seuil. Dans ce cas la norme a valeur de « Sonnette d'alarme », bien qu'elle soit dépassée, il n'y a pas de danger immédiat et les autorités sanitaires ont le temps de prendre des mesures pour éviter tout problème (OMS, 2004).

I -3-2 Les valeurs guides de l'OMS

Au niveau international, c'est l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) créée en 1948 qui est chargée non pas de préparer des normes sur l'eau potable, mais des valeurs guides à partir

desquelles les différents pays peuvent élaborer leurs propres recommandations ou normes de qualité de l'eau potable. Il ne s'agit pas à proprement parler de normes parce l'OMS s'adresse à l'ensemble des pays développés ou en voie de développement où les conditions de vie sont très variables (Ross, 1999).

Dans son volume 1, intitulé Directives de qualité pour l'eau de boisson (1994), l'OMS présente les recommandations concernant l'eau potable qui ont été préparées par plusieurs institutions et plus de 200 experts provenant de près de 40 pays. Ces experts se sont basés sur de nombreuses études épidémiologiques, des études de risques, des études toxicologiques et divers bilans pour recommander ces valeurs (Smets, 2005).

I -3-4 La qualité chimique de l'eau de boisson

Les préoccupations sanitaires associées aux constituants chimiques de l'eau de boisson sont de nature différentes de celles suscitées par la contamination microbienne et résulte principalement de la capacité de ces constituants chimiques à provoquer des effets nocifs pour la santé à l'issue de durée d'exposition prolongée. Des valeurs guides ont été établis pour de nombreux constituants chimiques de l'eau de boisson y compris les métaux lourds (Tableau 2).

Tableau 2 : Valeurs guides des métaux lourds (OMS, 2004).

Constituants chimiques	Recommandations OMS
As	10 ug /l
Cd	3,0 ug /l
Cr	50 ug /l (chrome total)
Cu	2,0 mg/l
Hg	1,0 ug /l
Ni	20 ug /l
Pb	10 ug /l
Se	10 ug /l
Zn	5 mg /l

Le dépassement d'une valeur guide n'entraîne pas nécessairement un risque important pour la santé. Par conséquent, les déviations par rapport aux valeurs, que soit à court terme ou à long terme, n'implique pas nécessairement que l'eau soit impropre à la consommation. La valeur et la durée que peut atteindre ce dépassement sans nuire à la santé publique dépendent de la substance particulière en cause. Néanmoins tout dépassement doit être un signal indiquant la nécessité au minimum, d'étudier sa cause en vue de prendre, si c'est nécessaire, des mesures correctives, et de solliciter l'avis et les conseils de l'autorité responsable de la santé publique (OMS, 2004).

I-4. Généralités sur les métaux lourds

L'histoire des métaux lourds n'a pas été écrite. Et pourtant, ils paraissent étroitement liés à la civilisation ; L'or, l'argent et le cuivre ont permis de fabriquer les premières pièces de monnaie. Sans métaux lourds, il n'y aurait pas eu de distribution d'eau potable à Rome par les canalisations en plomb, ni peintures, car les peintures anciennes ont résisté au temps grâce aux métaux incorporés aux pigments, ni vitraux dans les cathédrales, ni miroirs, ni étames d'un amalgame d'étain et de mercure...l'homme a utilisé les métaux lourds et continue à les utiliser. Parfois avec excès, souvent avec inconscience ou pire, en toute conscience.

Si les métaux lourds ont fait la civilisation moderne, ils peuvent aussi la défaire, car ces métaux lourds sont aussi des toxiques puissants (Joris, 2005).

I-4-1 Définitions et caractéristiques

Le terme «métaux lourds» a une définition assez large. Actuellement, ce terme désigne les métaux ayant une toxicité pour l'environnement. Auparavant la classification des éléments sous le terme de «métal lourd» se faisait essentiellement selon un critère de densité qui a lui aussi évolué. En effet, la densité minimale pour laquelle un métal était qualifié de lourd était de 4, puis le chimiste Laped à passer à 5g/cm^3 en 1964 (Le floche, 2004). En suite ce terme de «métaux lourds» est passé dans le langage courant et a été utilisé pour qualifier les éléments de densité supérieure à 5g/cm^3 , de numéro atomique élevé en général supérieur à celui de Sodium ($Z=11$), et ayant une toxicologie reconnue (Pearson, 1963 ; Jeannot et al, 2001 ; Le floche, 2004).

Cependant l'appellation «métaux lourds» est relativement floue (Gadd, 1992), et pour différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation «métaux lourds» l'appellation «éléments traces métalliques» ETM ou par extension «éléments traces».

La terminologie des « métaux lourds » est souvent employée pour désigner un groupe de 65 micropolluants minéraux, de densité supérieur à 5g/cm^3 et pouvant former des sulfures (Adriano, 1986 ; Bourrelier et al, 1998). L'arsenic (métalloïde) et sélénium (élément non métallique) sont ainsi souvent classés abusivement dans cette catégorie (Brown et al, 1979), en plus certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (par exemple le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas des métaux (c'est le cas de l'arsenic) (Chiffolleau, 2001 ; Miquel, 2001 ; Panfili, 2004 ; Burnol et al, 2006). L'expression « Eléments en Traces Métalliques » (ETM) paraît être donc un bon compromis pour définir à la fois des éléments métalliques indispensables, des métaux non indispensables et des éléments non métalliques (Nieboer et al, 1980 ; Bourrelier et al, 1998). Par la suite, nous emploierons ; par souci de simplification ; le terme générique « métaux lourds », pour désigner les éléments métalliques faisant l'objet de notre étude (le plomb et le cadmium).

Les métaux lourds sont des corps simples, solides à température ambiante (hormis le mercure), doués d'un éclat particulier (éclat métallique) bons conducteurs de la chaleur et de l'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages. Ils sont abondamment utilisés par l'homme depuis l'antiquité, d'abord pour sa vie, puis son confort et ses loisirs (Pearson, 1963 ; Chiffolleau, 2001 ; Chatain, 2004 ; Casas, 2005).

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantité très faible (en concentration inférieure à 1 % en moyenne) ; ils ne représentent que 0,6 % du total des constituants minéraux de la croûte terrestre, alors que les éléments majeurs interviennent pour 99 ; 4 % (Martignon, 2007).

Depuis des siècles, les teneurs en métaux dans le milieu naturel ont peu varié, mais avec l'avènement de l'ère industrielle, les activités humaines sont devenues une nouvelle source d'émission des métaux lourds (Pagotto, 1999) les concentrant dans l'air (Nriagu, 1989), l'eau et les sols (Alloway, 1995 ; Baize, 1997) et représentent des risques de contaminations de la faune et la flore (Panfili, 2004).

A la différence de la grande majorité des polluants organiques, les métaux lourds ne sont pas synthétisés par l'homme (Coquery et al, 2004). Il les a extraits, raffinés, enrichis et convertis en formes chimiques qui peuvent souvent se montrer plus solubles que les formes naturelles. Par l'intermédiaire de l'air, des déchets ménagers et industriels, des déjections animales et des engrais, notre environnement s'est enrichi d'une série de métaux lourds qui ne possèdent plus leur stabilité originelle (Verloo, 2003). La surexploitation des métaux a augmenté exagérément

leur dissémination et leur distribution dans les écosystèmes qui n'y sont pas exposés naturellement. Les espèces qui ne sont pas adaptées de vivre en présence de concentrations élevées en métaux peuvent ainsi être mises en danger (Coquery et al, 2004).

La toxicité des métaux lourds dépend de leurs teneurs dans le milieu, mais aussi de leurs formes chimiques (spéciation), qui sont elle-même conditionnée par les caractéristiques physico-chimiques et minéralogiques du milieu. En effet c'est la spéciation qui gouverne la mobilité et la biodisponibilité d'un élément (Le goff, 2004).

En plus de leur grande toxicité, les métaux sont susceptibles d'entraîner des nuisances même s'ils sont rejetés en quantités très faibles à cause de l'existence de phénomène de bioaccumulation (Picot, 2003). La bioaccumulation est le processus d'assimilation et de concentration des métaux dans les organismes. Celui-ci se déroule en trois temps (Nicolau, 2005):

- Assimilation ,
- La bioaccumulation par individu,
- La bioaccumulation entre individus (chaîne trophique).

I -4-2 Rôle biologique

Au niveau biologique, les métaux lourds peuvent être repartis selon deux grandes catégories. La première réunit tous les éléments présents à l'état de traces, mais indispensables à la vie des organismes vivants (microorganismes, plantes, animaux, et humains) (Pagotto, 1999). Le chrome par exemple potentialise l'action de l'insuline, diminue le stockage des graisses dans l'organisme, indispensable au métabolisme des glucides, intervient dans le métabolisme lipidique et réduit le taux de cholestérol sanguin. Le cuivre est un puissant anti-inflammatoire, intervient avec le fer dans la formation des globules rouges et stimule les défenses immunitaires (Corralés, 1987). Le zinc qui est considéré comme le minéral le plus important en raison de la multiplicité de ses rôles, est un anti-infectieux, anti-oxydant et facteur anti-vieillessement, régule le taux de sucre dans le sang, participe à la respiration cellulaire et la formation des membranes cellulaires, régularise l'activité hormonale et le système nerveux central, indispensable à la croissance des cellules, co-facteur enzymatique, stimule la reproduction,...etc. (Joyce, 2002).

Si ces éléments sont en trop faibles concentrations dans le milieu, des phénomènes de carence peuvent s'observer chez les organismes vivants. Ainsi, un manque de fer peut être à l'origine d'une diminution du développement phytoplanctonique (Nicolau, 2005), les rats

déficients en cuivre développent des anémies (Toulan, 2004), chez l'homme, les carences en ces éléments peuvent entraîner des désordres métaboliques ayant des conséquences plus ou moins graves (lésions de la peau, perte de goût, problèmes cardiovasculaires, anémies, anomalies congénitales,...) (Fischer et al, 2001).

En revanche, des teneurs trop élevées, peuvent avoir l'effet inverse et rendre ces éléments toxiques (Nicolau, 2005). Ainsi, il a été démontré que la présence anormale de cuivre dans l'eau de boisson peut entraîner des altérations du foie pouvant aller jusqu'au développement d'une cirrhose chez les jeunes enfants (Toulan, 2004). La toxicité de ces éléments due essentiellement à leur assimilation par l'organisme qui ne les élimine pas (Pagotto, 1999; Joyce, 2002).

Ces éléments sont communément rassemblés sous le terme «d'oligo-éléments essentiels». On distingue dans cette catégorie les éléments suivants : Cu, Zn, Co, Fe, Ni, V, Mo, Se, Sn, Si, Cr et As (Olivier, 2001 ; Casas, 2005).

La deuxième catégorie regroupe, tous les éléments inutiles à la vie des organismes vivants (Nicolau, 2005) et qui n'ont aucun rôle biologique actuellement connu (Olivier, 2001), à l'exception de l'exemple d'une anhydrase carbonique à cadmium récemment caractérisée chez une diatomée marine (Joris, 2005). Ils sont considérés comme toxique dès qu'ils sont dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à très faibles concentrations. C'est le cas de Hg, Ag, Cd et Pb. Les êtres vivants doivent donc mettre en œuvre des processus qui permettent de limiter l'accumulation des ces métaux ou les stocker sous forme non toxique (Pagotto, 1999).

I-5. Sources des métaux dans l'environnement aquatique

I-5-1 Sources naturelles

Les métaux sont des éléments lourds concentrés dans le magma granitique. Depuis la formation de la terre, ils suivent un cycle géochimique qui conduit à une distribution hétérogène de leurs concentrations à la surface du globe (Blanquet et al, 2004). Les métaux lourds présents dans les roches, se concentrent au cours de la pédogenèse dans certains horizons particulièrement autour des massifs granitiques et constituent des stockes appelés fonds pédo-géochimique, qui préexistent dans le profil avant toute intervention humaine (Gardas, 2000). La concentration de ces métaux dépend, aussi bien de la teneur de la roche originelle (tableau 3) que des processus intervenus lors des périodes géologiques de formation de sol. De plus, ces processus sont influencés par le pH, le statut redox de sol, de la qualité de la matière organique, d'argile, d'hydroxyde et de carbonate (Brugneaux et al, 2004 ; Elbaz et al, 2005).

Tableau 3 : Teneurs de quelques éléments contenus dans les principaux compartiments solides terrestres (en mg/kg) (Panfili, 2004).

	Croûte terrestre (1) ; (2)	Roches volcaniques (1), (2)	Roches sédimentaires (1), (2)			Evapo-rites (3)
			Calcaires	Grés	Argiles	
As	1,5	0,04-0,1	1	1	13(900)	-
Cd	0,1	0,09-1,3	0,028	0,05	0,22(240)	-
Cr	100	4-2980	11	35	90(500)	10,6
Cu	50	13-90	5,5	30	39(300)	-
Hg	0,05	0,004-0,08	0,16	0,29	0,18	0,9
Pb	14	3-24	5,7	10	23(400)	0,6
Zn	75	52-100	20	30	120(1000)	2

(1) : Alloway (1995) ; (2) : Mathlesse (1984), (3) : Baize (1997)

Les valeurs entre parenthèses représentent les plus fortes anomalies géologiques mesurées

Le fond pédo-géochimique est donc par définition «la teneur naturelle ou originelle en métaux dans un sol en absence de tout processus d'apports ou d'exportation vers ou hors d'un site considéré» (Bourrelier et al, 1998). Cependant, en entend par« anomalie géochimique» une concentration naturelle en un métal (ou plusieurs) dans les roches, les sols ou les sédiments, qui est très significativement supérieure aux concentrations naturelles communes pour environnement lithologique et pédologique proche. Selon les métaux, les réserves les plus importantes se trouvent dans les roches et/ou les sédiments océaniques (Laperche et al, 2004).

I-5-2 Sources anthropogéniques

Le volume de métaux du globe n'a pas été changé par l'activité humaine (il n'y a ni création, ni suppression). L'activité humaine modifie juste le cycle suivant deux modes :

- ✓ En augmentant la quantité d'éléments mobilisés dans le cycle
- ✓ En changeant la répartition des métaux et les formes chimiques (ou spéciation), ce qui rend ces derniers plus réactifs et donc, potentiellement plus toxiques (Nicolau, 2005).

I -5-2-1 Origine industrielle

Les concentrations en métaux lourds mesurées dans la pédosphère, l'atmosphère et la biosphère sont liées pour l'essentielle à des émissions d'origine industrielle (Desjardin, 2002). Par ailleurs, la fonte des minerais issus des activités minières, la combustion des énergies fossiles, la manufacture industrielle des produits multiples et variés (colorants des matières plastiques, peintures, anticorrosives, produits médicaux, pharmaceutiques et cosmétiques, pneus de voitures, batteries, huile de moteur, revêtement des appareils ménagers, papiers, piles, encres,...etc.) introduisent des métaux dans l'atmosphère, métaux qui vont ensuite être introduits dans les eaux de surfaces et les sols via les précipitations (Blanquet et al; 2004). Il a été estimé que 85 % du Cadmium, 41% du Nickel et 66 % du Zinc atmosphérique avaient pour origine des apports anthropiques (Nriagu, 1989).

I -5-2-2 Origine agricole

Les pratiques agricoles ont pour objectif de permettre une production quantitativement et qualitativement optimale. Les plantes comme les animaux nécessitent des soins, tant pour croître, que pour ce bien porter. Cela implique l'utilisation de produits adéquats : produits phytosanitaires, médicaments vétérinaires,...etc. L'usage de tels produits peut entraîner effectivement l'existence dans l'environnement des résidus potentiellement dangereux dont les métaux lourds (Rico, 2000).

L'épandage de boues des stations d'épurations sur les parcelles agricoles, les dépôts atmosphériques, les fertilisations organiques et minérales, essentiellement les engrais phosphatés qui contiennent des teneurs significatives en Cadmium (Levassour et al, 2001), et les pesticides dont notamment les herbicides et les insecticides seraient responsables de l'accumulation des métaux lourds dans les couches superficielles des sols (Meeus et al, 1989 ; Nicholson et al, 1998 ; Boucheseiche et al ; 2002).

Les transferts vers les milieux aquatiques de ces métaux sont encore mal connus et leur contribution à la pollution des eaux n'est pas évaluée, certains experts estiment qu'à long terme 30 à 70 % de métaux lourds apportés aux sols seraient exportés par ruissellement et érosion vers les eaux de surfaces. Les voies de transferts latéraux (ruissellement superficiel et hypodermique) constituent quant à elles une source de pollution diffuse non négligeable (Thévenot et al, 2007).

I-5-2-3 Origine domestique et urbaine

Au sein des zones urbaines, on dénombre une quantité importante de sources de métaux lourds. Les ordures ménagères accumulées dans les décharges sauvages ou non mises à la norme constituent une source non négligeable en métaux lourds. Ils proviennent essentiellement des piles, les batteries, les vieilles carrosseries, les produits chimiques divers et autres métaux abandonnés sur les décharges (N'ladon, 2005). Le cas se produit avec les eaux usées issues des égouts des ménages et des effluents industriels qui libèrent également des lixiviats riches en métaux lourds. Une partie substantielle de ces métaux peut alors être transférée à la nappe et aux rivières lors des événements pluvieux (Vincent et al, 2004).

I-5-2-4 Origine routière

L'imperméabilité des surfaces (routes, toits, parkings...) produit une forte quantité d'eau chargée en produits polluants divers dont notamment les métaux lourds. Les risques de pollution apparaissent à la construction des réseaux routiers puis durant leur exploitation. Le tableau 4 présente une estimation des émissions polluantes en milieu routier (Pagotto, 1999).

Tableau 4 : Estimation des émissions polluantes (en mg/kg/an) (Pagotto, 1999).

	Véhicule			infrastructure		entretien
	Pneumatique	Garnitures De freins	Echappement	Chausse	Glissière	Sels de déglacage
Chrome	0,2	18,4	1,5	4,3	-	-
Plomb	2,6	438	72,27	0,01	2,0	8,5
Zinc	3798	2462	48,6	1,5	978	1,3
Cuivre	0,7	16080	19,9	1,4	0,2	3,4
Cadmium	0,9	0,3	0,04	0,002	0,2	0,6

I-5-3 Le passage des métaux lourds dans l'environnement aquatique

Les gisements de métaux lourds, enfouis dans les roches, deviennent accessibles et contaminants à maintes occasions :

I-5-3-1 Altération géologique

L'érosion des sols et des roches porteuses de métaux apparaît quand les processus d'érosion par le vent, de lessivage par la pluie, de décomposition de la matière organique et d'érosion par les eaux courantes détachent et transportent les particules de sol (Biger, 1996). Cette érosion dépend de la force d'énergie de ces processus (érosivité) et de la capacité du sol à leur résister (érodibilité). Ces deux aspects de l'érosion (érosivité et érodibilité) impliquent certains processus d'interactions chimiques, biologiques et mécaniques opérant à différentes échelles (Forstner et al, 1979).

I-5-3-2 L'exploitation et utilisation

Les activités minières participent à l'introduction indirecte de métaux dans les systèmes aquatiques. Ces activités affectent des zones relativement réduites ; par contre, ce sont les dépôts de résidus miniers qui sont les principales sources de libération de métaux. En effet, la mise en contact de roches sulfurées avec les eaux météorologiques et l'oxygène de l'air provoque l'altération rapide des sulfures et la mise en solution des métaux associés (Drever, 1988). Quand ces produits d'altération atteignent les rivières (par transport ou ruissellement principalement), une large dispersion métallique, à la fois en solution et (après adsorption) sous forme particulaire peut intervenir. L'érosion mécanique des terrils miniers peut également aboutir à l'introduction de métaux particuliers dans les eaux de rivières. Ces métaux en fonction de l'efficacité du recyclage naturel, peuvent être retrouvés à des distances considérables (plusieurs centaines de Km) de la source d'émission, provoquant ainsi une pollution diffuse des sols, des sous-sols et des sédiments (Salomons, 1995).

I -5-3-3 Les prélèvements d'eau

En puisant dans des nappes phréatiques de plus en plus profondes, on peut tomber sur une nappe contaminée par une roche très chargée en métaux lourds (Blanquet et al, 2004). Cette source de mobilisation des métaux d'origine géologique est la moins connue, mais aujourd'hui l'une des plus fréquentes, c'est peut être la raison de la concentration accrue d'arsenic au Bangladesh (Nicolau, 2005).

I -5-3-4 Retombées atmosphériques

Les aérosols ont été identifiés comme les vecteurs principaux des apports de métaux lourds aux eaux naturelles par l'atmosphère (Nriagu, 1989 ; Elbaz et al, 2005). Les principales sources des métaux lourds dans les aérosols atmosphériques proviennent des particules éoliennes arrachées aux sols, des volcans (800 à 14000 tonnes de Cd , 18000 à 27000 tonnes de Cu, 3200 à 4200 tonnes de Pb et 1000 tonnes de Hg), des embruns marins et des incendies des forêts (Miquel, 2001).

Des études ont également montré que la matière organique particulaire était la composante majoritaire des aérosols issus de zones non urbanisées, et que cette source biogène pouvait représenter entre 30 et 50 % des métaux présents dans les aérosols (Nriagu, 1989). Ainsi, la quantité de métaux apportée par l'atmosphère dépend de facteurs géographiques (zones isolées ou urbaines), climatiques mais aussi anthropiques (activités rurales et/ou industrielles) (Audry, 2003).

I -5-3-4 Excrétions animales et humaines

Les métaux lourds sont présents dans les aliments animaux et humains, particulièrement le zinc à relativement forte concentration. Ces métaux, concentrés dans les excréments, finissent généralement leur parcours dans l'environnement aquatique (Forstner et al, 1979).

I -5-4 Cycle géochimique de métaux lourds dans l'environnement

Une fois en circulation, les métaux lourds se distribuent dans tous les compartiments de la biosphère : terre, air et océans. Les échanges sont permanents et se chiffrent par milliers ou centaines de milliers de tonnes. Les flux d'origine naturels sont complétés par les flux d'origine

anthropiques (Miquel, 2001). De manière simplifiée, le cycle des métaux lourds suit trois étapes : émission, transport et dépôt (figure 3).

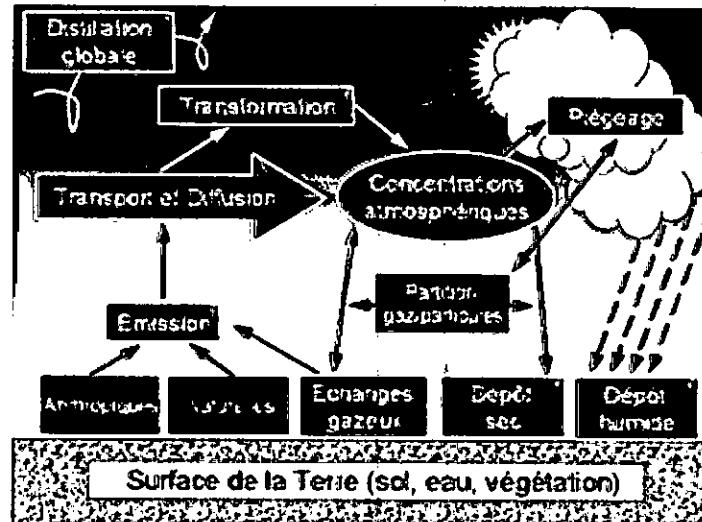


Figure 3 : Cycle géochimique simplifié des métaux lourds (Miquel, 2001)

Les métaux lourds sont des éléments abondants sur la surface de la terre, les gisements naturels, comme le pétrole et le charbon, entraînent la mobilisation des métaux au cours de leur exploitation. Les activités humaines produisent de leur part ces éléments de corps purs, d'alliages, de poussières, ... les métaux sont transférés dans l'atmosphère essentiellement sous forme de particules fines. Ces particules s'ajoutent à celles produites par les processus naturels (érosion, éolienne, volcanisme et production d'aérosols marins). Par ailleurs, les fumées de volcan, d'usine et d'échappement des moteurs thermiques entraînent des émissions de métaux à l'état de gaz. Ces émissions à haute température se refroidissent dans l'atmosphère et les métaux se condensent en très fines particules.

Au cours de leur cycle dans l'atmosphère, les métaux subissent des transformations physico-chimiques causées par différentes interactions :

- Interactions avec la lumière (réactions photochimiques).
- Interactions avec des espèces gazeuses (réactions acide base et d'oxydoréduction).
- Interactions avec l'eau (dissolution de l'aérosol dans la phase aqueuse) (Desbœuf, 2004).

Enfin, le dépôt peut être qualifié de sec (du à la gravitation) ou humide (issu de l'interaction entre l'eau et les métaux en particules généralement lors d'épisodes pluvieux).

Ainsi, on retrouve les métaux associés aux dépôts dans les plantes (bioaccumulation), dans les

sols et dans les systèmes aquatiques (Veschambre, 2006). Le destin final de métaux lourds dépendra de l'équilibre entre les phénomènes d'adsorption/précipitation sur les particules du sol, lixiviation dans les nappes phréatiques et d'absorption par les plantes. De plus, tous ces processus sont influencés par le pH, le statut redox du sol, de la qualité de la matière organique, d'argile, d'hydroxyde de carbonate,... (Alloway et al, 1999).

Au cours de son cycle, les temps de résidence de métaux lourds dans l'eau sont très variables selon les éléments (10 ans à 1 million d'années). Pour les métaux les plus influencés par l'activité humaine (Cu, Zn, Cd, Pb, Ni, Cr), les temps de résidences sont de l'ordre de 102 ans (Desbœuf, 2004).

I-6. Principales propriétés physico-chimiques des métaux lourds

I-6-1 La solubilité

La solubilité est la quantité maximale dissoute d'un composé dans un litre de solution à une température donnée. Elle est influencée outre la température, principalement par le pH, mais aussi par la pression, la fraction molaire de chaque composé dans le mélange de polluants et la teneur en matière organique (Ballirini et al, 1998). La solubilité d'un métal indique sa tendance à la mobilisation par lessivage ou par ruissellement. Les métaux solubles sont facilement transportables par l'eau, car ils suivent son écoulement et sont souvent peu adsorbés sur les sols (Hébrard et al, 2004). Ils sont assimilés par les organismes vivants (Jumarie et al, 2001).

Les métaux vont être plus ou moins mobiles, plus ou moins solubles. Dans l'eau, les métaux sont présents sous forme d'oxydes ou de sels, selon les métaux d'origine. Le plomb, par exemple, est un métal dont les composés inorganiques sont très peu hydrosolubles et de faible mobilité géochimique (c'est le cas par exemple de PbS , $PbCO_3$, $PbSO_4$), les composés halogènes du plomb (chlorure, bromure) ou les acétates de plomb étant plus solubles (Bodek et al, 1988 cité par Pichard, 2003). Les teneurs de plomb dans les eaux naturelles sont en conséquence très basses en dehors des zones minières où le pH de l'eau peut être très acide (Laperche et al, 2004). Le cadmium à l'état métallique est insoluble, ses sels le sont plus ou moins (la solubilité dépendant du contre ions et du pH). En milieu aquatique, le cadmium est relativement mobile et peut être transporté sous forme de cations hydratés ou de complexes inorganiques (HSDB, 2001 cités par Pichard, 2005). D'une manière générale, la plupart des sels sont solubles, et c'est sous cette forme que les métaux lourds contaminent l'environnement et en particulier l'alimentation (Lauglin et al, 1999 ; Miquel, 2001).

I-6-2 La stabilité

Contrairement aux contaminants organiques, les métaux lourds sont indéfiniment stables en tant que tels et ne peuvent être dégradés biologiquement ou chimiquement dans l'environnement. Dans le meilleur des cas, leur toxicité peut être réduite suite à leur forte adsorption sur les minéraux des sol, leur précipitation ou leur transformation en des formes chimiques moins solubles (Desbœuf, 2004). Le cadmium par exemple, ne se dégrade pas dans l'environnement, mais des processus physiques et chimiques peuvent modifier sa mobilité, sa biodisponibilité et son temps de séjour dans différents milieux. Mais, et dans certains cas, ce ne sont que de telles réactions de transformation qui conduisent à des composés toxiques (par exemple la méthylation du mercure).

Une des conséquences les plus sérieuses de la persistance des métaux est leur accumulation dans les chaînes alimentaires. Au bout de ces chaînes, les métaux peuvent atteindre des concentrations qui sont supérieures de plusieurs puissances de dizaines à celles trouvées dans l'eau ou dans l'air (Clamarie et al, 1994 ; Beliefert et al, 2001).

I-6-3 La volatilisation

D'une façon générale, les métaux lourds sont à considérer peu ou pas volatiles à l'exception du mercure. Les composés volatiles du mercure s'échappent facilement vers l'atmosphère (par dégazage de l'écorce terrestre, les activités volcaniques et les rejets anthropiques) et constituent une source importante de contamination de l'atmosphère (Ballirini et al, 1998). Il est également rapporté que les composés organiques de l'arsenic sont facilement volatiles. Cette propriété est souvent utilisée pour la détoxification de certains organismes (Le noble, 2003).

I-7. Chimie environnementale des métaux lourds

I-7-1 Formes chimiques des métaux dans l'environnement aquatique

Les métaux lourds sont présents dans l'ensemble des milieux aquatiques sous différentes formes chimiques (tableau 5). Ils se trouvent dans la phase dissoute et dans la phase particulaire (CIESM, 2002). La phase dissoute comprend des métaux sous forme d'ions libres hydratés, de

complexes dissous labiles organiques ou inorganiques, de complexes dissous non labiles organiques ou inorganiques, d'organométalliques (Tessier et al, 1995 ; Devez, 2004). Dans la phase particulaire, les métaux sont liés aux particules depuis l'adsorption faible jusqu'à la liaison au sein même de la matrice minérale (Blanquet et al, 2004).

Il est bien établi que les valeurs des concentrations des métaux lourds dans les eaux des écosystèmes aquatiques dépendent de la taille des filtres utilisés pour séparer les phases dissoutes et particulaires. Typiquement, une porosité de 0,45 µm est prise comme la séparation arbitraire pour différencier ces deux fractions (Audry, 2003). En réalité il existe un spectre continu de tailles des particules. L'existence de ce continuum a conduit des auteurs à définir opérationnellement la fraction « colloïde » (0,45µm -1nm) et la fraction « vrai dissous » (<1nm). De nombreuses études de spéciation ont trouvé des quantités non négligeables des métaux associés à la fraction colloïdale dans différents systèmes aquatiques (Kimball et al 1995 ; Santschi et al, 1997 cité par Audry, 2003 ; Citeau, 2004). Les colloïdes peuvent être de nature organique et inorganique (Hardivilier, 2005).

Tableau 5 : diverses formes chimiques des métaux dans l'eau (Campbell et al, 1986)

Diverses formes chimiques possibles		Exemple	
Phase dissoute	Ion métallique hydraté	$Cd(H_2O)_6^{2+}$	
	Complexe	Organique	Al-citrate, Cu-fulvate
		Inorganique	Cu-CO ₃
Phase colloïdale	Organique	Cu ²⁺ -acide humique	
	Inorganique	Pb ²⁺ -MnO ₂	
Phase particulaire		Métaux associés à des minéraux, sols, argiles, bactéries, micro algues, matrices organiques	

Le fractionnement par taille peut apporter des renseignements intéressants, la fraction biodisponible des métaux étant généralement associée aux particules les plus fines (Muller, 1996 cité par Devez, 2004), et est variable, selon le type d'organisme biologique ainsi que le niveau de contamination. La quantification en métal total donne donc une information importante sur sa dangerosité vis-à-vis du milieu, mais cette mesure ne suffit pas pour évaluer l'impact du métal

sur l'environnement (Alonso et al, 2004). L'indice de pollution d'un système, ne peut être donné que par une quantification des différentes espèces et formes chimiques du polluant recherché (Thévenot et al, 2007).

I -7-2 La spéciation métallique

L'étude de la toxicité des métaux lourds à l'état de traces dans les eaux naturelles passe par la connaissance de leur spéciation, car leur degré de nuisance n'est pas le même selon la forme chimique sous laquelle ils sont présents, en effet, la concentration totale d'un métal dans les sols et les eaux ne permet pas d'en déduire sa mobilité ni de connaître ses risques potentiels de toxicité. Du point de vue toxicité, l'influence d'un métal sur l'environnement n'est pas la même selon qu'il se présente sous forme d'un complexe organométallique ou sous forme d'un complexe minéral. De ce fait, l'analyse de spéciation est à la base de la compréhension du devenir des métaux lourds dans les eaux naturelles (Tessier et al, 1995).

I -7-2-1 Définition

D'un point de vue chimique, la spéciation, est défini comme l'identification, la détermination ainsi que la distribution et distinction des différentes formes physico-chimiques et différents états d'oxydoréduction d'un élément ou d'un groupe d'atomes distincts peuvent être possiblement ou effectivement présents dans différentes matrices (Florence et al, 1980 ; Florence, 1982 ; Kyle, 1987 ; Hetland et al, 1991 ; Sigg et al, 1992 ; Dechelette et al, 2004).

D'un point de vue environnementale, la spéciation est définie comme la distribution des espèces chimiques d'un élément donnée dans un système (Templeton et al, 2000). D'autres auteurs (Bernhard et al, 1986 ; Audry, 2003) incluent dans la notion de spéciation chimique, en plus de la distribution, la notion de transformation des espèces chimiques.

I -7-2-2 Espèces chimiques

Comme tous les éléments chimiques, les métaux lourds peuvent se présenter sous trois formes distinctes, dénommées «espèces chimiques» (Apostoli, 2006). Le dictionnaire de chimie d'Oxford (Daintith, 2004) définit l'espèce chimique comme «une entité chimique, qui peut être un atome particulière, un ion ou une molécule».

L'étude des différentes espèces chimiques des métaux est regroupée dans la spéciation, une sous-discipline de chimie analytique. Cette approche scientifique commence à être prise en compte par les spécialistes de l'environnement et plus récemment par les toxicologues et les écotoxicologues.

Tant au niveau de leur impact sur l'environnement que dans l'étude de tous leurs effets toxiques sur les êtres vivants, il devient absolument nécessaire maintenant de prendre en compte l'étude de différentes espèces chimiques intervenant dans les processus indésirables dont sont responsables les métaux lourds (Bourrelier et al, 1998).

I-7-2-3 Réactions et comportement des métaux lourds dans l'eau

Les réactions intervenant à la surface des solides jouent un rôle déterminant dans la répartition métallique entre phase particulaire et dissoute et, par conséquent, sur l'impact potentiel des métaux dans l'environnement aquatique (figure 4) (Jenne, 1986 ; Le goff, 2004).

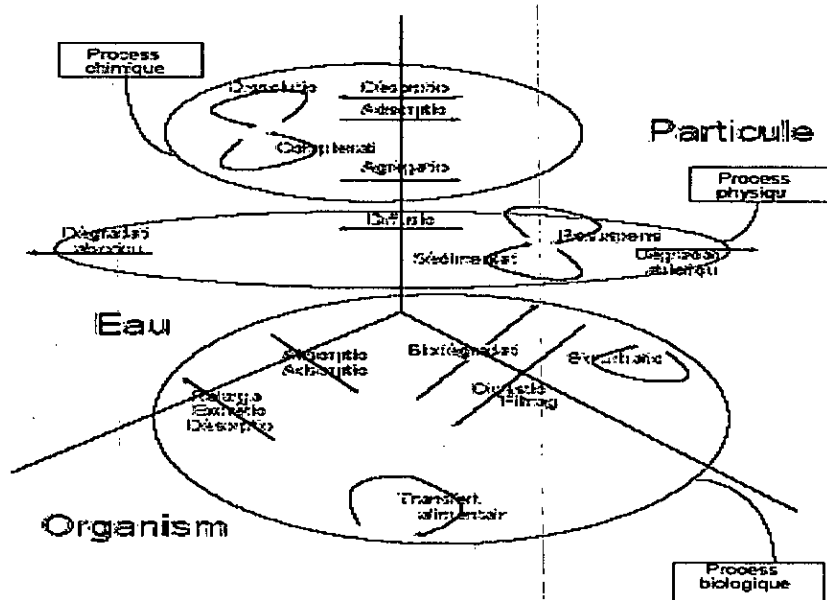


Figure 4 : Principales réactions des métaux lourds dans l'eau (Jenne, 1986).

Plusieurs réactions physico-chimiques ou biologiques conditionnent la spéciation d'un métal peuvent survenir dans un milieu aussi complexe que le milieu aquatique (Devez, 2004).

a) Réaction d'adsorption/absorption

Selon (Alloway, 1995), l'adsorption chimique des métaux est le processus chimique le plus important, affectant leur comportement et leur biodisponibilité. Elle est définie comme l'accumulation de matière à l'interface entre la phase aqueuse et un adsorbant solide (Sposito, 1986 ; Remon , 2006). C'est un processus significatif dans la baisse du cuivre dissous dans les eaux superficielles avec l'incorporation finale dans les sédiments (Devez, 2004).

La nature des substrats sur lesquels les métaux peuvent s'adsorber peut être très différente. On peut ainsi trouver des particules d'origine organique ou biologique (phytoplanctons, bactéries) (Blanchard, 2000), mais aussi des résidus de dégradation de la matière organique ou des substances humiques. Les argiles, les carbonates, les oxy (hydroxy) des de fer et, dans une moindre mesure la silice peuvent aussi adsorber les métaux.

L'absorption traduit, quant à elle, l'incorporation par diffusion du soluté à l'intérieur de la phase solide (Devez, 2004), d'un point de vue biologique, l'absorption est une assimilation d'une particule par un organisme vivant (Yong et al, 1992 ; Martinelli, 1999 ; Dechelette et al, 2004).

b) Précipitation et co-précipitation

La précipitation correspond au passage d'une espèce de l'état dissous à l'état solide (inverse la dissolution). Les réactions de précipitations/dissolutions contrôlent la composition dissoute de beaucoup de cations métalliques (Crosnier, 1999), ces réactions peuvent se produire dans la phase liquide ou à la surface de la phase solide (Panfili, 2004).

Selon (Evans, 1989), les cations métalliques précipitent le plus souvent avec les oxydes, les hydroxydes et les carbonates, et dans une moindre mesure avec les sulfures, les phosphates et les silicates.

Quant à la co-précipitation, elle peut être considérée comme la précipitation simultanée de plusieurs éléments. Cela se produit lorsqu'une phase minérale précipite et incorpore un élément exogène dans sa structure cristalline, en remplacement d'un atome constituant le minéral (Sposito, 1986 ; Alloway, 1995 ; Chatain, 2004).

c) Complexation

Une réaction de complexation se produit quand un cation métallique réagit avec un ligand (anion ou molécule). Les métaux lourds possèdent un cortège électronique important

et, ayant des orbitales superficielles peu soumises au noyau, ils perdent facilement un ou plusieurs électrons ; les cations métalliques formés jouent alors facilement le rôle d'accepteurs d'électrons (Evans, 1989). Les ligands

sont des atomes possédant une paire d'électrons libres. Ce sont généralement des éléments non métalliques, électronégatifs donneurs d'électrons comme O, N et S (Alloway, 1995).

La complexation entre un métal et un ligand est régie par l'affinité du métal pour le ligand. Dans les eaux naturelles, les principaux ligands regroupent les ions hydroxydes (OH⁻) et carbonates (CO₃²⁻) et la matière organique naturelle (Yong et al, 1992). D'une manière générale, trois grands types de complexation sont distingués :

- La formation d'oxydes et d'hydroxydes dans le domaine de pH des eaux naturelles de : $7 < \text{pH} < 8$ (Sigg et al, 1992 ; Town et al, 2002).
- La formation de complexes avec des ligands organiques (acides amines, acide acétique, le phénol, protéines, glucides, matières organiques naturelles, acides humiques et fulviques) (Carthy et al, 1996), et inorganiques (HCO₃⁻, CO₃²⁻, Cl⁻, SO₄²⁻, F⁻, S⁻) (Sigg et al, 1992) ;
- La formation de complexes intermédiaires à la surface des particules (Town et al, 2002)

d) Réactions biologiques

La composante biologique des systèmes aquatiques peut avoir un rôle important sur le partage du métal entre la forme dissoute et particulaire (Devez, 2004). L'oxydation bactérienne peut avoir lieu directement par les enzymes ou par l'intermédiaire de l'action qu'ont les microorganismes sur le pH et le potentiel redox. A titre d'exemple, on peut citer la transformation du mercure sous l'action des microorganismes en méthylmercure ou diméthylmercure. Les composés obtenus sont relativement volatiles, plus disponibles et d'une toxicité élevée (Martinelli, 1999). L'oxydation par voie bactérienne de Mn (II) en Mn (III) a été largement mise en évidence. Ces métaux antigéniques possèdent une réactivité potentielle (Audry, 2003). Les bactéries influencent également la répartition métallique entre phase dissoute et particulaire par leurs interventions dans des réactions de biodégradation des composés organométalliques, des réactions de précipitation antigénique et des réactions de dissolution de phase aqueuse (Berthelin et al, 1994).

e) Réactions photochimiques

Des études ont mis en évidence l'existence de réactions d'oxydoréduction sous l'action de l'énergie lumineuse, notamment pour le mercure. Dans le milieu aquatique, des réactions

Photochimiques conduisent à la réduction de mercure Hg^{2+} sous forme Hg^0 . Or, la forme réduite Hg^0 peut se volatiliser et quitter le milieu alors que la forme oxydée Hg^{2+} après méthylation peut se bioaccumuler le long de la chaîne trophique (Devez, 2004).

I-7-2-4 Effets des conditions environnementales

a) pH

Il revêt une importance toute particulière, d'une part sur les processus d'adsorption, et d'autre part sur la spéciation des métaux lourds en phase dissoute (Jérôme, 2006).

Le pH est considéré comme la variable maîtresse contrôlant le comportement métallique (mobilité, réactivité, biodisponibilité, bioaccumulation et toxicité) dans les systèmes aquatiques (Audry, 2003). D'une manière générale, lorsque le pH augmente, les cations métalliques (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , ...) sont moins solubles et les anions ($Cr_2O_4^{2-}$, AsO_4^{3-} , ...) sont plus solubles (Alloway ; 1995 ; Remon, 2006).

Des mesures effectuées dans une centaine des eaux océaniques et des eaux douces non contaminées montrent que les valeurs de pH sont relativement uniformes et se situent entre 6 et 8. En revanche, les influences anthropiques comme les pluies acides et les rejets d'effluents industriels et urbains peuvent rendre les eaux très acides (Panfili, 2004).

b) L'état d'oxydoréduction

Ce paramètre influence la dynamique des métaux lourds de différentes façons. Les espèces redox des métaux qui possèdent plus d'un état d'oxydation possible dans les eaux naturelles sont différemment mobiles, solubles, toxiques et réactifs (Audry, 2003). L'état d'oxydoréduction exerce également une influence sur la répartition entre phase dissoute et particulaire (Nolting et al, 1999).

c) La température

La température a un impact direct sur la mobilité des métaux en déplaçant les équilibres des réactions de dissolution/précipitation et co-précipitation, et un effet indirect, en modifiant d'autres paramètres tels que le pH. En effet, les changements de température peuvent modifier l'équilibre ionique de tous les acides et bases faibles présents dans l'eau, par l'effet qu'elle exerce sur la dissociation des acides et la solubilité du CO_2 . Cet effet est peu marqué, parce qu'en

général, une augmentation de température de 20 °C abaisse le pH de seulement 0,1 unité (Panfili, 2004).

d) La salinité

L'augmentation de la salinité entraîne la remobilisation des métaux sédimentaires par compétition des ions magnésium et calcium vis-à-vis des autres métaux sur les sites de fixation. Ceci a été observé pour le Cd et le Mg. Pour le Pb et le Cu les désorptions sont beaucoup plus faibles (Forstner et al, 1979).

I-7-2-5) Les interactions entre les métaux et autres polluants

La différence principale de l'étude du comportement des métaux lourds dans l'environnement aquatique réside dans la multitude des interactions qui ne peuvent pas être intégrées simultanément. Ainsi, par exemple, en présence du plomb, le cadmium est 80 fois moins adsorbé qu'en absence du plomb (Richter, 1999). De même le cuivre et le zinc sont en compétition pour les sites d'adsorption. Le phosphore peut interagir avec le plomb modifiant ainsi sa biodisponibilité. Il peut donc être considéré comme un moyen efficace de lutte contre la contamination des eaux souterraines (Betri et al, 1998). Certains hydrocarbures substitués tels que les phénols ou les acides carboxyliques peuvent se complexer avec les cations métalliques (Plassard et al, 1999). Ce type d'interaction peut présenter un risque de contamination des nappes souterraines.

De plus, la toxicité de certains métaux peut être exaltée par la présence des autres. Par exemple, il a été montré que le cadmium était 5 fois plus toxique lorsque il est en présence de cuivre (Martinelli, 1999).

I-8. La toxicité des métaux lourds

Une substance est dite toxique lorsque mise en contact avec un organisme vivant, elle peut entraîner chez lui une réaction spécifique ou un stress compromettant la réalisation de ses fonctions physiologiques au point d'avoir des effets néfastes sur lui-même et sur sa progéniture (Sasseville, 1980). Les métaux lourds sont connus depuis longtemps pour leurs risques potentiels sur la santé des sujets exposés.

La toxicité d'un métal se traduit par l'altération de la morphologie, du métabolisme et de la croissance d'un organisme vivant qui est en contact (Leita et al, 1995). La biodisponibilité (ou bioaccessibilité) d'un élément décrit son aptitude à être transféré d'un compartiment quelconque de l'environnement vers un organisme vivant (Weissenhorn, 1999). La toxicité d'un métal va d'abord dépendre de cette disponibilité puis de la sensibilité spécifique des organismes concernés (figure 5) (Crosnier, 1999).

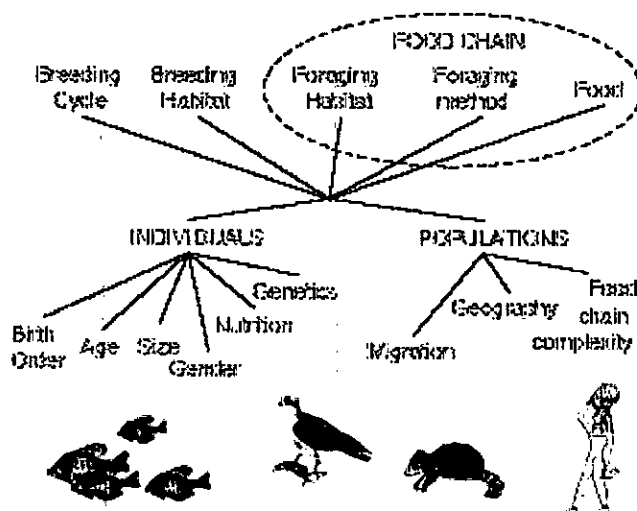


Figure 5 : Les facteurs influençant la biodisponibilité et la toxicité des métaux lourds (Peakall et al, 2003).

Tout élément est toxique quand il est absorbé en excès par rapport aux capacités d'assimilation de l'organisme, cela est particulièrement vrai pour les métaux lourds (Gardas, 2000). Les effets toxiques des métaux peuvent se traduire par :

- L'inhibition d'activités enzymatiques soit par interaction entre le métal et un groupe thiol de l'enzyme ou par déplacement d'un cofacteur métallique essentiel, par exemple, le plomb déplace le zinc de l'acide δ -aminolévulinique déshydratase (ALAD) (Lu, 1992). L'inhibition de la synthèse des enzymes, par exemple le nickel et le platine inhibent l'acide δ -aminolévulinique synthétase (ALAS), bloquant ainsi la synthèse de l'hème, composant important de l'hémoglobine et des cytochromes (Maines et al, 1977).
- La modification structurelle, la dénaturation et la rupture de l'intégrité des organites subcellulaires (Crosnier, 1999), par exemple, la structure du réticulum endoplasmique est

endommagée par certains métaux toxiques. Le cadmium s'accumule dans les lysosomes des cellules des tubules proximaux du rein, ou il se décompose en libérant l'ion Cd^{++} , qui inhibe les enzymes protéolytiques des lysosomes et entraîne des dommages cellulaires (Lu, 1992).

La toxicité de différents métaux lourds pour un même organisme est difficile à établir, car elle dépend de plusieurs facteurs tels que le niveau et la durée de l'exposition, la forme chimique du métal, la voie d'exposition, les complexes métal-protéine ainsi que des facteurs physiologiques comme l'âge, le sexe et les habitudes alimentaires (habitudes tabagiques, consommation d'alcool, des médicaments, carences alimentaires) (Chatain, 2004).

De plus, les modifications de la toxicité peuvent être consécutives aux interactions entre plusieurs métaux ou entre métaux et autres toxiques (effets aditifs, synergiques ou antagonistes possibles). Le mécanisme essentiel de ces interactions est la concurrence que se livrent les métaux et métalloïdes pour le même site de liaison (surtout le groupe thiol-SH) au niveau de diverses enzymes, du métal protéines (surtout la métallothioneine) et des tissus (membranes cellulaires et barrières entre organes).

Ces interactions peuvent jouer un rôle significatif dans le développement de maladies chroniques par suite de l'action des radicaux libres et du stress oxydatif (Bourrellet et al, 1998).

I-9. Les métaux de références

Parmi les métaux lourds et si on met à part le mercure, deux éléments se détachent nettement en ce qui concerne les risques pour la santé de certaines tranches de la population humaine : le cadmium et le plomb. D'autres éléments souvent étudiés ne représentent des risques pour la santé que dans des situations rares, voire exceptionnelles : c'est le cas du chrome et du nickel, métaux lourds relativement abondants ou du sélénium, zinc et cuivre, oligoéléments indispensables, dont la carence alimentaire présente un risque plus courant que la toxicité par excès (Chatain, 2004). L'objet de notre étude étant donc spécifiquement lié au cadmium et au plomb. Ce choix est dicté en partie, à cause de leur importante diffusion et donc leur impact sur un grand nombre d'individus- du à la pollution de l'environnement et notamment les systèmes aquatiques-en partie, pour la gravité de leurs effets toxiques.

I-9-1 Cadmium

Le nom du cadmium vient de latin *cadmia*, «calamine», ancien nom donné au carbonate de zinc. Ce métal n'a été découvert et isolé qu'au début de XIX^{ème} siècle et il est resté inexploité jusqu'à ce que ces potentialités industrielles soient mises en évidence. La production mondiale annuelle est de 20000 tonnes (Pillet, 2001).

Le cadmium est un métal blanc argenté, ses propriétés physico-chimiques présentent beaucoup de similitudes avec celles de zinc et de calcium, en particulier le rayon ionique, facilitant ainsi sa pénétration dans les organismes (Casas, 2005).

I-9-1-1 Utilisations

Le cadmium est un sous produit de métallurgie du zinc (3kg de cadmium en moyenne par tonne du zinc), mais aussi présent dans des minerais de cuivre, de plomb et dans certains phosphates naturels (Tunisie, Jordanie) (Joris, 2005).

Dans l'industrie globalement, le cadmium a cinq grandes applications : les batteries et piles nickel- cadmium (50 % de la consommation mondiale), les enduits (20%), les revêtements et les pigments (18%), les stabilisateurs dans les produits en matières plastiques et synthétiques (6%) et les alliages (6%) (Casas, 2005). On retrouve également de petites quantités de cadmium dans les tubes images de téléviseurs, les fils de téléphone et de trolley, les radiateurs d'automobiles, les barres de commande et les blindages de réacteurs nucléaires, les huiles de moteurs et les agents de vulcanisation de caoutchouc (Pillet, 2001).

I-9-1-2 Toxicocinétique

a) Absorption

L'absorption digestive des composés de cadmium est faible, de l'ordre de 3 à 7%, l'absorption pulmonaire dépend de la granulométrie et de la solubilité du composé. L'absorption percutanée est négligeable (Pichard, 2005).

b) Devenir dans l'organisme

Après absorption, ce métal est transporté par le sang, fixé à 70% aux erythrocytes au sein desquelles sa demi- vie biologique est de 40 à 80 jours. Il se concentre ensuite à 75% dans le foie et les reins, par liaisons avec la métallothéionéine tissulaire participant ainsi à l'accumulation de

ce métal au sein de ces organes (Pillet, 2001). Le complexe cadmium- métallothéionéine est lentement libéré dans le sang, puis réabsorbé par les reins (Tierra toxic, 2002).

c) Elimination

L'excrétion, faible et très lente, spécifique essentiellement par voie urinaire et très faiblement par voie fécale (< 1 %) et par la sueur et la salive. Le cadmium est un toxique cumulatif : sa demie vie biologique est estimée chez les souris et les rats entre 200 et 700 jours, chez certains primates, elle peut même dépasser 40 ans (Pillier, 2002).

II -9-1-3) Toxicité

a) Toxicité aiguë

L'ingestion de dérivés inorganiques du cadmium provoque chez l'homme des troubles digestifs intenses, caractérisés par des douleurs abdominales, des diarrhées, des nausées et des vomissements. Les pertes digestives sont responsables d'une hypo volémie et de désordres hydro électrolytiques (Pillet, 2001). Certains cas d'intoxications aigues ont été observés à la suite de l'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des récipients colorés par des pigments à base de cadmium (Joris, 2005).

L'insuffisance rénale est la conséquence des troubles hémodynamiques et d'un effet toxique direct sur les tubules rénaux. En cas d'intoxication massive, on observe un collapsus cardiovasculaire, une acidose métabolique intense et une coagulation de consommation entraînant la mort en quelques heures (Pillet, 2001).

b) Toxicité chronique

Les principaux effets à long terme d'une exposition à des niveaux élevés de cadmium sont les maladies rénales, les maladies obstructives respiratoires (limitées à l'exposition professionnelle) et les maladies des os. Une maladie appelée itai- itai a été observée pour la première fois au Japon. Elle a été associée à une consommation sur une longue durée d'aliments contenant des niveaux élevés de cadmium (Joris, 2005).

Les effets cancérogènes du cadmium ont été démontrés au cours d'études sur les animaux. Des études épidémiologiques menées sur des travailleurs exposés professionnellement laissent croire à la possibilité d'une association entre l'inhalation de cadmium et le cancer du poumon et la prostate (Pillier, 2002). La contribution à ces effets du tabagisme ou de l'exposition

à d'autres produits chimiques fait l'objet d'un débat. Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le cadmium parmi les substances cancérigènes pour les humains.

Plusieurs études expérimentales ont mis en évidence l'apparition d'hypertension artérielle et d'une diminution de la contractibilité du myocarde pour une exposition par voie orale à une dose supérieure ou égale à 1 ppm de cadmium. Les mécanismes d'effets hypertenseurs de cadmium n'ont en revanche pas été élucidés. Chez l'homme, une corrélation positive entre l'exposition au cadmium et l'élévation de la pression artérielle a été mise en évidence (Brillant, 1993).

I-9-2 Le plomb

Du latin plumbum, le plomb est le plus universellement répandu des métaux lourds (Lu, 1992). C'est un métal très réactif dont la dispersion dans l'environnement par l'activité humaine existe depuis plus de 7000 ans et les effets toxiques de ce métal sur l'homme se sont fait sentir dès l'antiquité (Laperche et al, 2004). La première exploitation industrielle du plomb remonte à la Grèce antique, puis à l'empire romain. Il est utilisé comme conservateur pour les aliments et le vin, comme cosmétique ou pour la fabrication des canalisations. Cette dernière utilisation a certainement contribué à une ingestion massive de plomb dans l'organisme. Le saturnisme chez la classe au pouvoir a même été suggéré comme une cause de la chute de l'empire romain (Nriagu, 1989). Depuis, la mobilisation de plomb n'a cessé d'augmenter. La production mondiale de plomb s'est accrue considérablement depuis 1923, date à laquelle fut commercialisé le premier gallon d'essence au plomb (Cossa, 1993).

Le plomb, est un métal bleu grisâtre, malléable et ductile dont le point de fusion est de 327 C° et le point d'ébullition de 1525 C° (Plante et al, 1998).

I-9-2-1 Utilisations

L'utilisation du plomb est directement liée à la métallurgie. Avec deux pics notables : sous l'empire romain pour la production de monnaie, les canalisations et la vaisselle ; et pendant la révolution industrielle pour l'industrie, l'imprimerie, les peintures et les carburants automobiles (Casas, 2005). Cette dernière utilisation qui consiste à ajouter du plomb à l'essence comme antidétonant est aujourd'hui interdite en Amérique de Nord et en Europe (Miquel, 2001). D'une manière générale, les utilisations du plomb peuvent être classées en cinq secteurs principaux : produits semi-fini (tuyaux, tubes, feuilles, plomb de chasse, siphons, capsules,...),

câbles électriques, accumulateurs (plaques, poudres), alliages (soudure, antifriction,...), chimie (oxydes, alkyle, ...) (Cossa, 1993).

I-9-2-2 Toxicocinétique

Le plomb présent dans l'environnement pénètre dans l'organisme humain par voie digestive, essentiellement via les aliments et l'eau de boissons ou aérienne, par inhalation des poussières atmosphériques contaminées. L'absorption percutanée n'est notable que pour les dérivés organiques (CIREI, 2001). Le taux d'absorption chez l'adulte est de l'ordre de 5 à 10 % alors qu'il est environ 50 % chez l'enfant. Les régimes carencés en fer, calcium, phosphore, zinc, vitamine B₁, manganèse ou fibres végétales l'augmentent (Miquel, 2001).

Après absorption, le plomb passe dans le sang ou il se répartit entre une forme non diffusible fixée aux hématites (95 %) et une forme plasmatique qui sera stockée dans les tissus mous, surtout le rein mais aussi le foie, la rate et le cerveau, (5 à 10 % de la charge totale). Les os contiennent plus de 90 % de la charge corporelle totale de plomb chez l'adulte et 75 % chez l'enfant. Le plomb est métabolisé de la même façon que le calcium lors de la minéralisation de l'os et y persiste jusqu'à ce que l'os se résorbe ; c'est ainsi qu'il s'accumule. La demi-vie de plomb emmagasiné dans les os est estimée à 20 ou 25 ans chez l'adulte alors qu'elle serait d'environ 1 an chez l'enfant (CIREI, 2001). La principale voie d'excrétion est urinaire : 75 % au moins du plomb absorbé est éliminé par cette voie. L'élimination lactée est faible (Rosset, 2006).

I-9-2-3 Toxicité

a) Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë au plomb se manifeste différemment selon qu'elle survient chez l'enfant ou chez l'adulte. Chez l'enfant, l'intoxication aiguë au plomb est caractérisée par l'anorexie, les vomissements, l'irritabilité et les troubles de comportements (Laperche et al, 2004), alors que chez l'adulte elle se manifeste cliniquement par un goût métallique, des douleurs abdominales (coliques) et la constipation. Ces symptômes se manifestent généralement lorsque la plombémie atteint 30 à 50 ug/dl (1,44 à 2,4 mol/l) (Casas, 2005). Par ailleurs, une intoxication sévère peut provoquer des convulsions, le coma et parfois même la mort et ce, tant chez l'enfant que chez l'adulte.

L'intoxication aiguë au plomb est très rare dans les pays développés, mais elle s'observe encore chez les travailleurs exposés à des fortes concentrations de plomb.

b) Toxicité chronique- le saturnisme

Le saturnisme est une maladie résultante d'une intoxication chronique, professionnelle ou domestique par le plomb. La population infantile est la plus exposée du fait du coefficient d'absorption du plomb plus élevé chez l'enfant que chez l'adulte (Laperche, 2004). Le sujet atteint peut être sujet à de nombreux effets toxiques :

- Troubles neurologiques (effets critique) : chez l'enfant à partir de 100 à 300 ug/l de plomb sanguin : troubles comportementaux, stagnation ou régression du développement intellectuel ; chez l'adulte à partir de 400 à 700 ug/l de plomb sanguin : fatigue, maladresse, irritabilité. Atteintes de système nerveux périphérique (Décloître, 1998)
- Troubles rénaux : insuffisance rénale chronique
- Troubles hématologiques : inhibition de l'activité enzymatique de la synthèse de l'hème
- Troubles cardiovasculaires : l'effet sur l'hypertension artérielle est suggéré mais non démontré
- Cancérogénicité : le plomb et ses composés inorganiques étaient classés par le CIRC (1987) dans le groupe 2B (potentiellement cancérogènes chez l'homme). Sa cancérogénicité a été démontrée chez l'animale mais insuffisamment démontré chez l'homme.

Chapitre II :
METAUX LOURDS ET STRESS
OXYDANT

II-1. Le stress oxydant

II-1-1 Concept

Du latin «stringer» (mettre en tension) (Silvestre, 2005), le terme «stress» est apparu autour de 1940, employé en mécanique et en physique, qui voulait dire «force, poids, tension, charge». Ce n'est qu'en 1963 que Han Selye utilise ce mot en médecine et formule le concept du stress sous le terme de «general adaptation syndrome» (Roeder, 2006).

Les psychologues furent pratiquement les seuls scientifiques intéressés par les travaux de Selye jusqu'à ce que, relativement récemment, l'avancée des découvertes en neuroendocrinologie et en immunologie (découverte de la cytokine, notamment) permit de décrire l'état de stress en terme physiologique et d'aborder ses mécanismes par des méthodes expérimentales (Lacost, 2001).

Au cours des deux dernières décennies, le nombre d'études portant sur la physiologie du stress a augmenté considérablement. Ceci est lié, d'une part, au fait qu'un nombre croissant de disciplines s'intéresse au stress (psychologie, physiologie, immunologie, toxicologie, écologie, écotoxicologie, neurologie, neurobiologie, endocrinologie, pathologie), et d'autre part, au fait que le concept de stress peut être appliqué à tous les niveaux d'organisation, depuis l'écosystème jusqu'à la molécule (Lacost, 2001 ; Roeder, 2006).

II-1-2 Définition

La survie de tout organisme nécessite qu'un état d'équilibre physiologique soit maintenu en toute circonstance. Cette notion d'équilibre physiologique fut établie par Claude Bernard au 19^e siècle, puis au début du 20^e siècle, Walter Cannon en 1935 introduit «homéostasie», du grec ; stasis : état, homoios : égal (Lacost, 2001).

Cet état d'équilibre est sans cesse menacé par diverses perturbations intrinsèques à l'organisme ou provenant de son environnement (Silvestre, 2005). Selye introduisit le terme «stress» pour désigner l'état dans lequel se trouve un organisme lorsqu'il fait face à des forces menaçant son intégrité (Lacost, 2001), et les réactions déclenchées par le stress visant à maintenir l'équilibre de cet organisme. Le stress est donc considéré aujourd'hui comme un état de déséquilibre physiologique provoqué par un facteur de stress et déclenche une réponse au stress.

Au niveau cellulaire, le stress oxydant cellulaire est classiquement défini comme étant la conséquence d'un déséquilibre entre les systèmes pro- producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense anti- oxydantes au profit de premiers(Rousselot et al, 2007) . Les causes d'un tel déséquilibre peuvent être endogènes ou exogènes à l'organisme, citons par exemple : le métabolisme cellulaire (respiration oxydative mitochondriale, dégradation de composés étrangers par le système cytochrome P450); l'action d'enzymes (xanthine oxydase ; lipoxygénases (LO), cyclooxygénases (COX), NADPHoxydase, etc.) ; de cytokines et de mitogènes ; la réponse immunitaire ; l'exposition excessive à des facteurs environnementaux (xénobiotiques, métaux lourds, irradiation ionisante, pathogènes, etc.) (Martin, 2003).

II -1-3 Généralités sur les radicaux libres d'oxygène

II -1-3-1 Métabolisme de l'oxygène dans la cellule

Découvert par Scheele en 1772, l'oxygène est un élément familier, indispensable à notre vie, à notre survie, à notre développement et à notre capacité d'adaptation (Ramonatoxo, 2006). Le seul rôle qui lui ait longtemps été attribué était d'alimenter la respiration cellulaire mitochondriale, génératrice d'énergie par voie des phosphorylations oxydatives ; en termes simples, l'oxygène était considéré comme une «poubelle» à électrons, destiné à être réduit en eau par une série d'addition d'électrons et de protons, tandis que l'énergie de cette réaction permettait la fabrication d'Adénosine TriPhosphates (ATP) (Deby et al, 2002).

Les radiologistes furent les premiers à tenir compte de la toxicité de l'oxygène en «l'utilisant» pour le traitement des tumeurs cancéreuses. Il faudra attendre la seconde moitié du 20^e siècle pour que les recherches biochimiques commencent à s'intéresser au «métabolisme» de l'oxygène (Fridovich, 1978).

Il est maintenant connu que l'utilisation de l'oxygène par les organismes aérobies implique l'intervention d'enzymes spécialisées et que des «excès» ou des «erreurs» de métabolisation sont possibles, conduisant aux dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (Soares, 2005).

II -1-3-2 Définition de radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, qui possède sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires (ou non appariés) (Berger et al, 2001). Le champ magnétique créé par sa rotation ou spin, n'est donc pas compensé par la rotation inverse d'un électron apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et rend le radical libre extrêmement instable et apte à réagir avec différentes molécules stables (soit, il accepte ou il transfère un électron) pour appairer son électron (Garait, 2006), notamment lors des réactions en chaînes dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation lipidique (Soares, 2005). Le métabolisme cellulaire produit, à l'état physiologique, plusieurs variétés des radicaux libres (figure 6). Dans certaines conditions pathologiques, ces radicaux peuvent être modulés qualitativement et quantitativement (Afonso et al, 2007). Tous les radicaux libres ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité étant variable selon la nature du radical (Servais, 2004). Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), comme le monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$) ne sont pas très réactifs, mais constituent des radicaux précurseurs et peuvent déclencher des réactions en chaînes qui formeront des radicaux libres beaucoup plus réactifs capables d'agresser les composantes cellulaires et matricielles (Afonso et al, 2007).

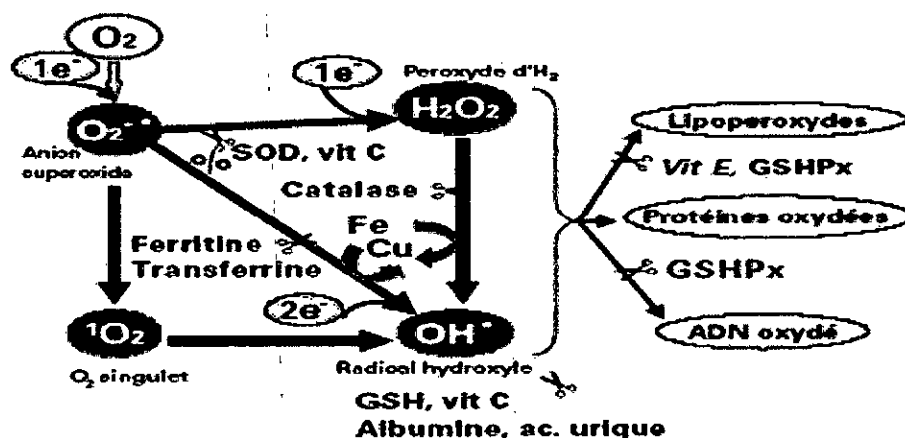


Figure 6 : Les radicaux libres de l'oxygène produits en cascades à partir de l'oxygène fondamental (ou moléculaire : 3O_2 couramment représenté par O_2) (Deby et al, 2002).

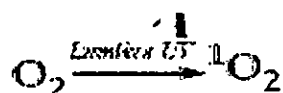
La chimie moderne prouve que la structure de l'oxygène est très particulière et unique : la molécule d'oxygène est diatomique (O_2) dont les deux atomes d'oxygènes sont réunis par une liaison simple, et qui comporte deux électrons célibataires de spins différents. Une molécule avec un électron célibataire est appelée «radical libre» ou «doublet». L' O_2 a deux électrons célibataires et est appelé «triplet» (Deby et al, 2002). Il est donc susceptible de capter facilement

1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en $O^{\bullet-}_2$ puis en H_2O_2 . Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (En anglais : Reactive Oxygen Species : ROS).

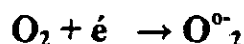
II-1-3-3 Principaux radicaux libres

a) Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS)

L'oxygène singulet (O^1_2) : L' O^1_2 représente l'état excité de l'oxygène moléculaire dans sa forme $^1\Delta_g$ et se caractérise par la présence des électrons périphériques à spins antiparallèles (Badouard, 2006). De ce fait, il est très instable et extrêmement réactif vis-à-vis des molécules riches en électrons. L' O^1_2 peut être produit quand plusieurs pigments biologiques tels que les chlorophylles, sont en présence de la lumière et d'oxygène selon la réaction 1 (Simon, 2004) :

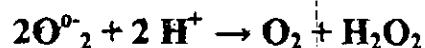


- L'anion superoxyde ($O^{\bullet-}_2$) : La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde comme la montre la réaction 2 (Hansford et al, 1997 ; Frelon, 2001).



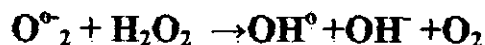
L'anion superoxyde est une espèce relativement peu réactive mais présente un précurseur d'autres espèces plus agressives et est le médiateur des réactions oxydatives en chaîne.

- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) : Lorsqu'un second électron s'ajoute à l'anion superoxyde, O^{2-}_2 est formé. Au pH physiologique, cet anion se protonne très rapidement pour former le peroxyde d'hydrogène (Frelon, 2001). Toutefois, la principale production de H_2O_2 résulte dans la dismutation de l' $O^{\bullet-}_2$ catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) suivant la réaction 3 (Coulon, 2005) :

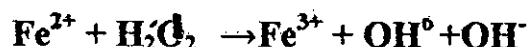


Bien qu'il ne s'agisse pas d'un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant (Bourdon, 2000). De plus sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut exercer son action néfaste sur des distances relativement grandes (Hadi, 2004).

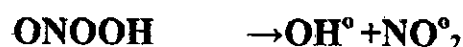
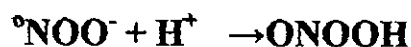
- **Le radical hydroxyle (OH^\bullet)** : Il peut être issu de l'interaction de $\text{O}^{\bullet-}_2$ et H_2O_2 en présence de métaux de transition (Fe/Cu) suivant la réaction 4 d'Haber - Weiss (Bourdon, 2004) :



L'interaction des métaux réduits avec H_2O_2 génère également OH^\bullet comme il a été observé par Fenton en 1894 selon la réaction 5 (Marfak, 2003) :



L'interaction entre $\text{O}^{\bullet-}_2$ et l'oxyde nitrique (NO^\bullet) est une autre source de ce radical (Bourdon, 2004) selon le schéma réactionnel 6 :

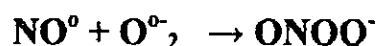


Avec une durée de vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène (Marfak, 2003). Il réagit avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant dans son voisinage (protéines, lipides, ADN,...) entraînant ainsi de multiples dommages. Il apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Frelon, 2001).

- **Les radicaux peroxydes (ROO^\bullet)** : Ils se forment par l'addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres carbonés. Ils sont peu réactifs, mais sont capables de diffuser à travers les membranes biologiques (Badouard, 2006).
- **Les hydroperoxydes organiques (ROOH)** : Ils sont les formes hydrogénées des radicaux peroxydes. Ils sont réactifs et se redécomposent en radicaux peroxydes ou en radicaux alcoxydes (Haton, 2005).
- **Les radicaux alcoxydes (RO^\bullet)** : Ils se produisent lors de la dégradation des peroxydes organiques. Ils sont très réactifs (Marfak, 2003).

b) Les espèces réactives de l'azote (RNS)

- **L'oxyde nitrique (NO^o)** : Le NO^o, molécule gazeuse peu réactive et hautement diffusible dans les membranes biologiques, est présent dans tous les types de cellules (Maission et al, 2002). Il provient notamment de la réaction catalysée par la NO synthase mitochondriale entre l'atome de l'azote appartenant à la L- argénine et une molécule d'oxygène (Sarr, 2004). De nombreuses fonctions lui ont été découvertes : neurotransmetteur, messenger, détecteur d'oxygène, poison ou protecteur cellulaire, ... (Maission et al, 2002). Cependant, le NO^o n'est pas dénué de toxicité car il est capable de générer des ions nitrites (NO⁻²) ou de fixer un groupement nitroxy sur les acides aminés, comme la tyrosine pour générer la nitrotyrosine. Lorsque le NO^o interagit avec les métaux de transition (principalement le fer), il se produit une réaction de M- nitrosylation, qui aboutit à la formation de complexe métal- nitrosyl (M-NO), au niveau de différentes métallo- enzymes dont les hémoprotéines (Wink et al, 1997).
- **L'ion peroxonitrite (ONOO⁻)** : Il est formé par la réaction 7 de NO^o avec l'O^{o-2} :



L'ion ONOO⁻ est considéré comme une espèce réactive de l'azote mais aussi de l'oxygène, sa protonation en acide (ONOOH) donne une espèce très oxydante (Sarr, 2004). L'autoxydation du NO^o par O₂ est à l'origine de la formation d'anhydride nitreux, le N₂O₃. Ainsi chaque (RNS) possède une réactivité qui lui est propre et peut agir sur divers constituants cellulaires (Douki et al, 2004).

II-1-3-4 Sources des radicaux libres

a) Sources endogènes

Dans l'organisme il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus. La réaction chimique de Fenton produit des ROS dans la cellule. Les autres sources cellulaires de ROS sont enzymatiques et non enzymatiques (Drôge, 2002).

➤ **La chaîne respiratoire mitochondriale**

La chaîne respiratoire mitochondriale étant la principale source endogène des radicaux libres, notamment l'O^{o-2}. Cette production est un événement physiologique correspond à une fuite des électrons au niveau des complexes I et III (figure 7) (Beaudeau et al, 2006). Selon certains auteurs 1 à 4 voire 5 % de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS (Garait, 2006 ; Kelley et al, 2006). Ce chiffre doit toutefois être

reconsidéré à la baisse puisque ces estimations sont réalisées à partir de mesures *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentrations saturantes en substrats (Boveris et al, 1979). Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%).

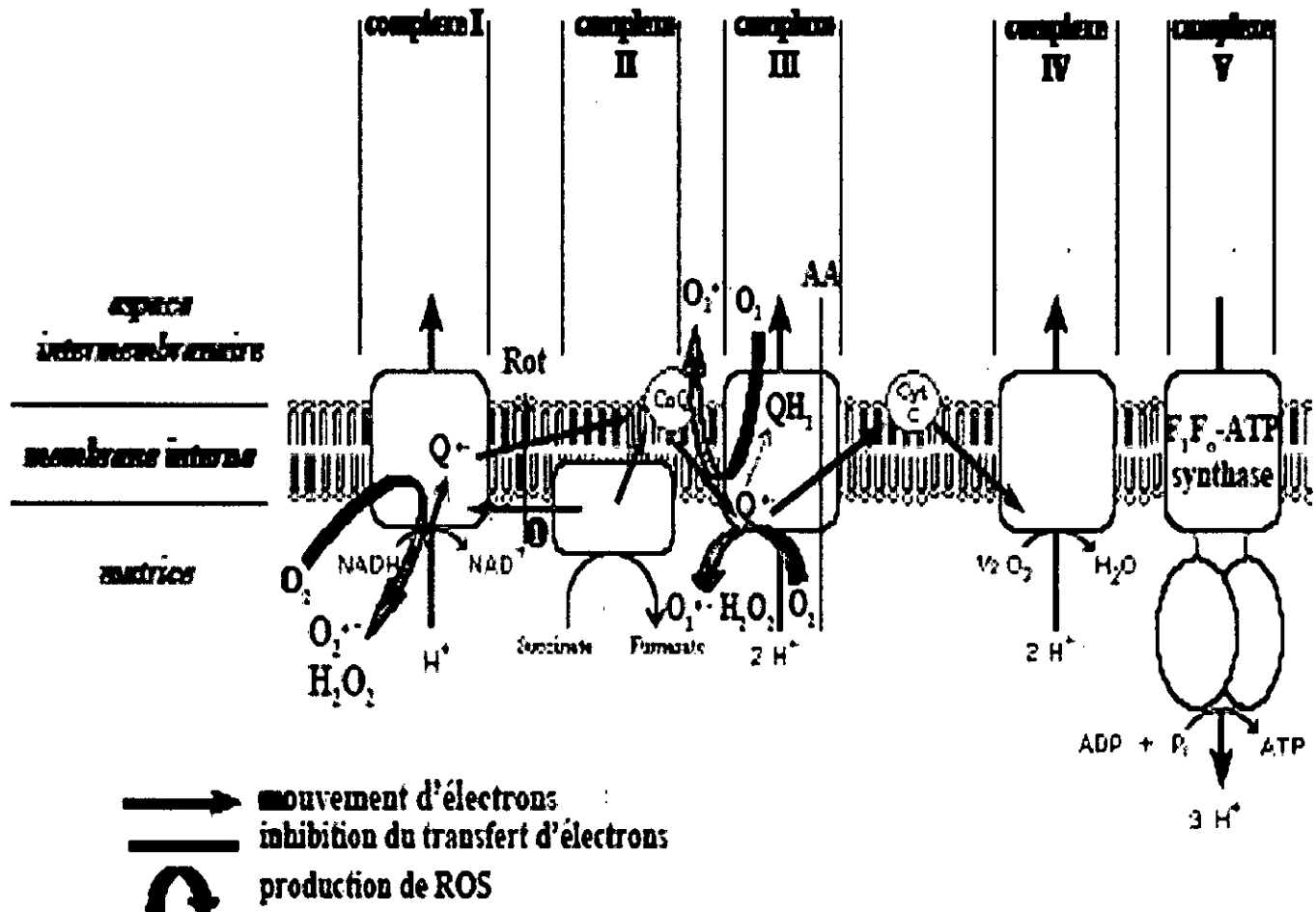


Figure 7 : Sites de production des ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Garait, 2006).

Au cours de la respiration cellulaire, la mitochondrie génère de l'ATP via la réduction de l'oxygène par une série d'addition d'électron et d'ions H^+ (membrane interne de la mitochondrie) (Girardi, 2006). Au cours du transport électronique, il y a production d' $O_2^{\bullet-}$ (complexe I : NADHdéhydrogénase et complexe III : Cytochrome c – coenzyme Q oxydoréductase) qui est ensuite convertit en H_2O_2 ou OH^{\bullet} (Figure 8).

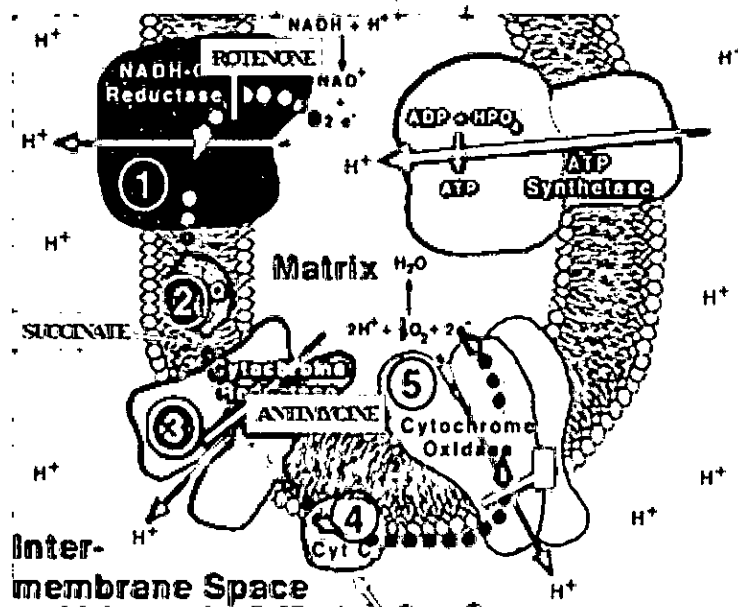


Figure 8 : Chaîne respiratoire mitochondriale (Girardi,2006).

Lors des réactions de transfert d'électrons, la fuite des électrons peut conduire à l'oxydation de l'oxygène moléculaire (Haton, 2005). Le complexe III est à l'origine de la plus grande partie des O[•]₂ (par le cycle Q) dans le cœur et les poumons, alors que le complexe I semble être la source primaire de production dans le cerveau (Munnich , 1994 ; Simon, 2004).

➤ **L'auto- oxydation des molécules**

L'auto- oxydation des molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une source importante de ROS. Le produit direct de ces auto- oxydations est l'O[•]₂. L'auto- oxydation de glucose génère également les ROS, cette réaction réduit l'oxygène moléculaire dans des conditions physiologiques conduisant à la formation d' acétoaldéhydes, d' H₂O₂ et d'intermédiaires radicalaires (Bourdon, 2000). L'impact de ces auto- oxydations sur la régulation du stress oxydant n'est pas encore clairement défini (Servais, 2004).

➤ **Peroxisomes**

Le peroxysome est une source importante dans la production cellulaire de H₂O₂ car cet organe contient de nombreuses enzymes générant du H₂O₂ (Boveris et al, 1979). Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxydomale afin de réaliser des réactions dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein. Il semble cependant que seule une

faible quantité de H_2O_2 produite au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (Servais, 2004 ; Garait, 2006).

➤ Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et autres produits métaboliques toxiques (Freeman et al, 1983). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui produit O°_2 et H_2O_2 en agissant sur des substrats endogènes (stéroïdes) et sur des substrats exogènes (détoxification des xénobiotiques) (Haton, 2005). Il semble que cette production radicalaire régule les fonctions du réticulum comme par exemple la sécrétion des protéines (Servais, 2004).

➤ Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et xanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène (Garait, 2006). Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie, et les intestins. La localisation de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique (Servais, 2004).

➤ NADPH oxydase

C'est une enzyme localisée principalement au sein du lysosome des macrophages ou de neutrophiles. Elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les microorganismes. Il semble qu'il existe une NADPHoxydase dans les cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Servais, 2004).

La NADPHoxydase phagocytaire représente une source majeure de production des ROS dans le cadre de la réponse immunitaire, elle permet de transférer les électrons du NADAH à l' O_2 pour la destruction des organismes à l'intérieur de phagolysosome dans le cadre d'un phénomène appelé explosion ou flambée oxydative (Deby et al, 2002).

➤ Lipoxygénase et cyclooxygénase

Elles sont deux enzymes membranaires qui appartiennent à la voie de synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines thromboxanes et leukotriènes). Ces métabolites sont impliqués dans la transmission des informations entre les cellules et notamment au cours

des processus inflammatoires. Ces deux voies de synthèses sont constituées d'une série d'étapes d'oxydation impliquant des intermédiaires radicalaires (Servais, 2004).

➤ Myéloperoxydase (MPO)

Cette enzyme est exprimée spécifiquement par les neutrophiles, elle catalyse en présence de H_2O_2 et d'ion Cl^- la formation de dérivés halogénés toxiques (Hadi, 2004).

➤ NO synthase

Dans le phénomène inflammatoire, cette enzyme est principalement retrouvée dans le macrophage. La formation de dérivés oxydés de l'azote aboutit à la production de monoxyde d'azote (NO) toxique pour les microorganismes. Cette enzymes est présente dans d'autres types cellulaires autres que les macrophages (Haton, 2005).

La figure 9 récapitule les principales sources cellulaires des radicaux libres.

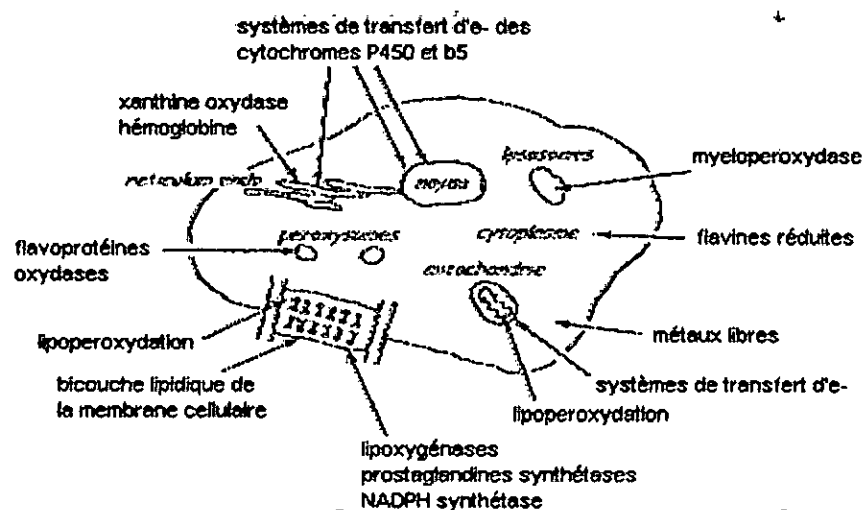


Figure 9 : Sources cellulaires de radicaux libres (Haton, 2005).

b) Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents environnementaux physiques ou chimiques capables de donner naissance à des radicaux libres. Exposition prolongée au soleil, à l'ozone, aux rayonnements ionisants, aux rayons UV, la chaleur et les ultrasons, tabagisme, consommation excessive d'alcool, contact avec des agents cancérigènes, consommation des médicaments notamment les anticancéreux, les pollutions... sont autant des situations qui génèrent des radicaux libres (Hadi, 2004).

Au sens large de stress, certains auteurs considèrent que les facteurs exogènes de stress se répartissent en deux groupes, des facteurs de nature abiotiques et d'autres de nature biotiques (Lacost, 2001). De nombreuses études ont été menées afin de préciser ces facteurs. Chez les plantes, par exemple, de nombreuses conditions environnementales ont été définies : la sécheresse (stress hydrique), les hautes et les basses températures (stress thermique), l'exposition aux métaux lourds, aux Ultra- Violet, aux polluants aériens tels que l'ozone et le SO₂, les stress mécaniques, les carences en nutriments, les attaques de pathogènes et les fortes expositions à la lumière. La production des ROS est donc considérée comme une réponse générale de la plante à un stress (Silvestre, 2005).

D'autres études réalisées sur les poissons, distinguent trois catégories d'agents induisant la production des ROS et donc le déclenchement de stress. Des agents environnementaux tels que la présence de substances polluantes comme les métaux lourds et les pesticides mais aussi des changements de pH, de température, d'oxygène dissous, ... ; des agents physiques tels que les manipulations de l'animal, le confinement, le transport ou la poursuite et la pêche ; et enfin, des agents biologiques comme les attaques d'agents pathogènes, possible hiérarchisation sociale au sein de la population, ... (Silvestre, 2005).

La figure 10 montre le rôle des interactions des facteurs biotiques et abiotiques dans la production des ROS d'après (Monserrat et al, 2006) chez un organisme estuarien.

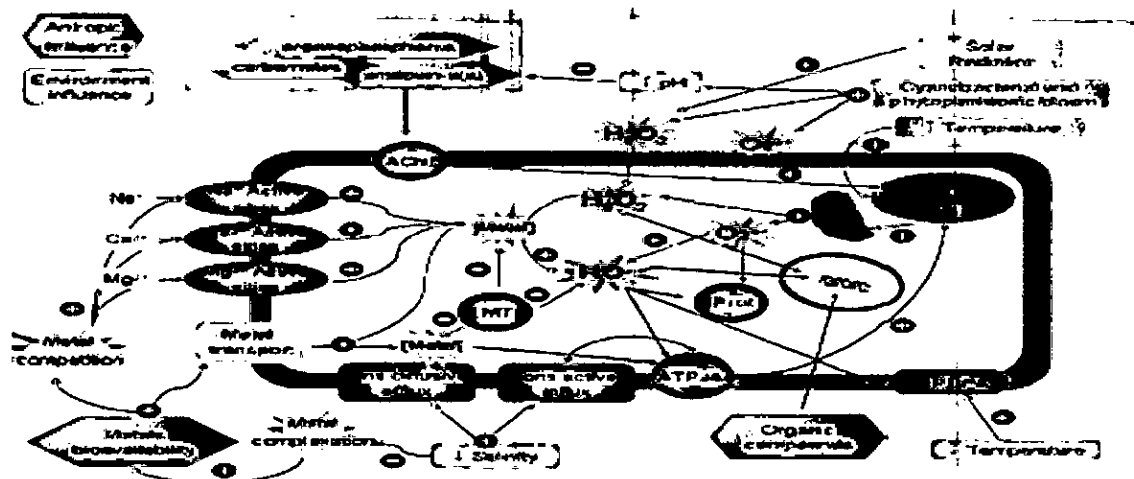


Figure 10 : L'influence des facteurs abiotiques et biotiques sur les réponses physiologiques et biochimiques d'un organisme estuarien (Monserrat et al, 2006).

II-1-3-5 Le rôle physiologiques des radicaux libres

La production de radicaux libres fait partie du métabolisme aérobie (Berger et al, 2001), et est permanente et physiologique. En effet, les ROS de part leur réactivité participent à de nombreuses fonctions physiologiques ; phagocytose, bactéricide, signalisation cellulaire (Ramonatoxo, 2006). Par exemple, au niveau musculaire, plusieurs travaux récents, montrent que l'exposition de fibres musculaires au H_2O_2 augmente toutes les caractéristiques de la contraction musculaire : pic de force, constante de temps et temps de demi- relaxation . Les ROS participent également à l'amélioration de captage musculaire du glucose, et la reconstitution des stocks en glycogène musculaire (Reid et al, 1993). En fin, les ROS régulent de nombreux facteurs de transcription tels que l'activator -protein-1 (AP-1) et l'heat shock factor-1 (HSF-1) qui activent des gènes dits «protecteurs» pour la cellule. En effet, ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les antioxydants où les heat shock protein (HSP) contribuant aux processus de réparation et de régénération cellulaire (Macnee et al, 1999).

II -1-3-6 Le rôle pathologique des radicaux libres

a) La toxicité cellulaire des radicaux libres

En excès, provenant d'un défaut de capacité antioxydante ou d'une production massive par emballement des mécanismes physiologiques (inflammation) ou d'exposition à des sources exogènes liées à l'environnement, et du fait de leur grande réactivité, les ROS provoquent des lésions sur tous les constituants biologiques essentiels :

- **L'ADN** : Les ROS peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN (Le pape, 2003). Ils agissent en provoquant des altérations de bases nucléiques principalement la thymine et la cytosine, des pontages ADN- protéines, des modifications des sites abasiques ou des cassures de chaînes (simple et double brin) (Haton, 2005).
- **Les lipides** : ils sont une cible privilégiée des ROS. Ces derniers provoquent l'oxydation des molécules de cholestérol et des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides des membranes (Hadi, 2004), causant ainsi, une peroxydation de la membrane lipidique. Ce phénomène entraîne une désorganisation de la membrane et par voie de conséquence une altération irréversible de sa fluidité et sa capacité à assurer correctement ses fonctions (Cayuela, 1995). La peroxydation lipidique consiste en l'attaque par un radical libre,

d'origine exogène ou endogène, des dérivés lipidique et aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques : les hydroperoxydes et leurs dérivés. Ces derniers sont relativement stables ; en présence de fer, ils sont transformés en radicaux alkoxytes. Parmi leurs dérivés le MDA (malondialdéhyde) a une demi- vie plus longue que celles des ROS et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène (Hadi, 2004). Cependant, la peroxydation lipidique, et lorsqu'elle n'est pas induite par un élément exogène anormal, est un phénomène physiologique naturel qui intervient dans la dégradation de nombreux métabolites cellulaires (hormones, acides gras, etc.). Certains produits de la peroxydation contribuent à l'adaptation des organismes aux conditions de l'environnement ou encore à la différenciation cellulaire (Haton, 2005).

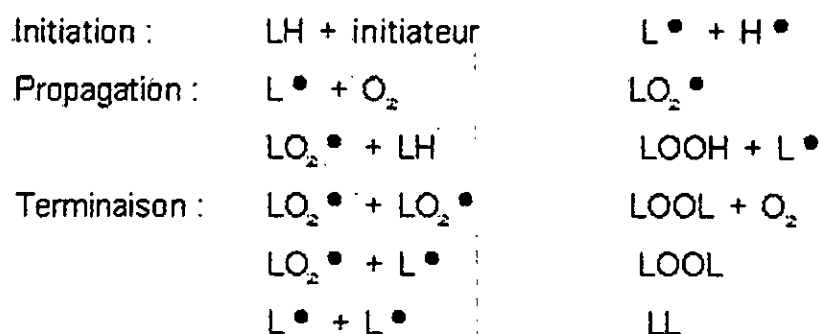


Figure 11 : Processus de peroxydation lipidique (Haton, 2005).

- **Les protéines** : presque toutes les protéines sont endommagées par les ROS, mais les plus sensibles sont celles qui ont un groupement sulfhydrique (-SH) (cystéine et méthionine) et les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane). Les deux principaux marqueurs de l'effet des ROS sont la formation de la fonction carbonyle et la formation de groupes nitrotyrosines (Le pape, 2003). Les ROS sont responsables de l'inactivation enzymatiques en particulier des serine- protéases, d'une fragmentation des macromolécules (collagène, protéoglycannes, acides hyaluronique), de formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques (Hadi, 2004).

b) Les différentes pathologies associées à un stress oxydant

Tous ces désordres biochimiques impliqueront le stress oxydant dans de nombreuses maladies, soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme une cause de complication de leur évolution (figure 12).

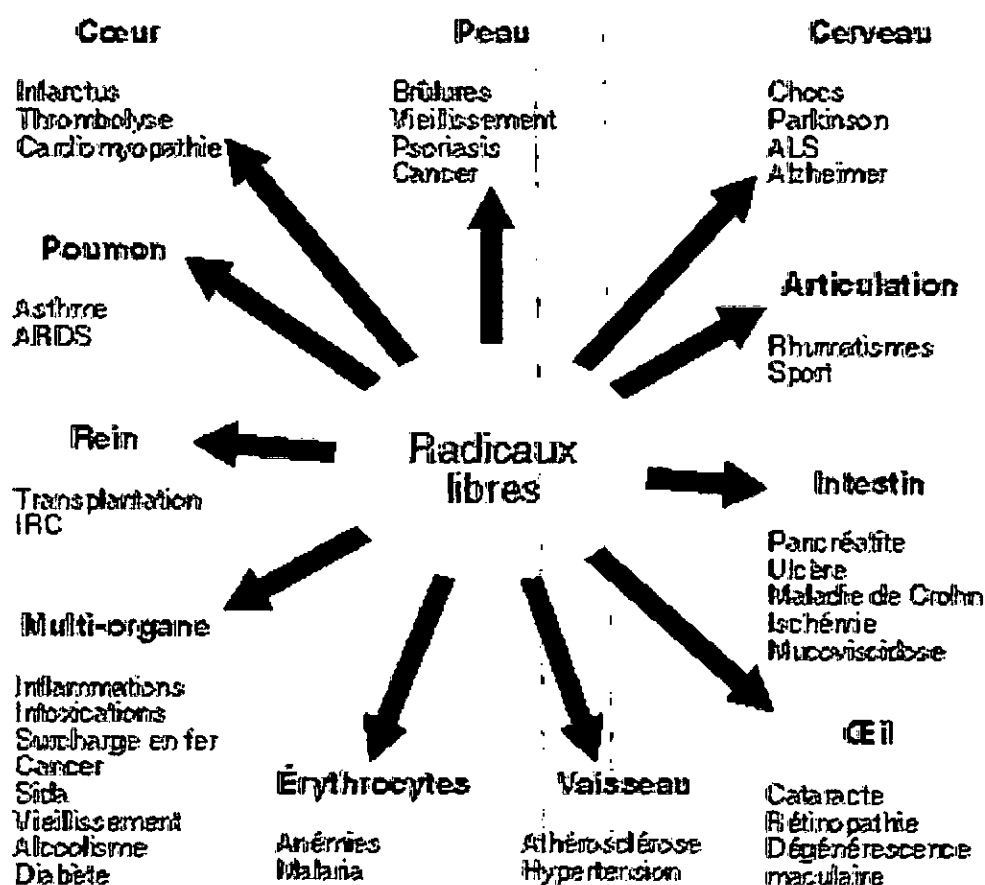


Figure 12 : Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant (Gutteridge, 1993).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de nombreuses maladies souvent liées au vieillissement : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire (Gutteridge, 1993). Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardio-vasculaires. En fin, dans certaines maladies la cause initiale ne fait pas intervenir de processus radicalaire, mais la survenue secondaire de ce stress vient aggraver le processus initial. Un exemple caractéristique de cette situation est le SIDA, où le processus initial est l'infection virale, mais où le virus induit un stress en réprimant le gène de superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase facilitant la mort des lymphocytes T par apoptose (Levesque, 2006).

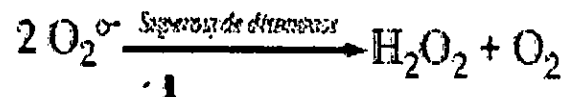
II -1-4 Les moyens de défense contre les radicaux libres : les antioxydants

Les antioxydants sont des substances qui retardent ou inhibent l'oxydation d'un substrat quand ils sont présents à faible concentration comparée à celle du substrat, ils ont donc pour rôle la détoxification des radicaux libres produits en excès dans l'organisme et le maintient d'un niveau non cytotoxique de ROS. L'organisme dispose d'une large gamme d'antioxydants sous formes de systèmes enzymatiques, ou non enzymatiques (Drôge, 2002).

II -1-4-1 Les antioxydants enzymatiques

➤ La superoxyde dismutase (SOD) :

Les superoxydes dismutases représentent une grande famille de métalloprotéines possédant des groupements prothétiques différents (Bourdon, 2000). Elles sont ubiquistes dans les organismes aérobies et réagissent en défense de l'organisme contre les produits toxiques du métabolisme cellulaire. Les SODs sont capables d'éliminer l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, par une réaction de dismutation. Elles assurent ainsi la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydant comme la montre la réaction 8 :



Chez les mammifères, la SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et tissulaire, leur structure multimérique et la nature des ions métalliques de leur site actif (Haton, 2005 ; Garait, 2006) : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn- SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (SOD Mn) et une forme extra- cellulaire (Ec- SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn- SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (Sturtz et al, 2001). La distribution de ces formes varie selon les tissus. Dans le muscle environ 65 à 85 % de l'activité de la SOD se trouve dans le cytosol tandis que les 15 à 35 % restants sont localisés dans les mitochondries (Garait, 2006). Cependant, la Mn- SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable, ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique, même si celle -ci joue un rôle important dans l'élimination des ROS (Li et al, 1995).

Si les formes mitochondriales et cytosoliques sont régulées par leurs substrats, la SOD- Ec serait régulée par des cytokines plutôt que par les ROS (Sturtz et al, 2001).

➤ **La catalase (CAT)**

Les catalases sont des haemoprotéines de 56 K Da, constituées de 4 sous unités identiques. Chaque sous unité renferme un ion ferIII logé dans un noyau hémique proche de celui de l'hémoglobine (Bourdon, 2000). Elles sont localisées dans le peroxysome des cellules de nombreux types tissulaires mais sont particulièrement abondantes dans le foie et les globules rouges (Soares, 2005).

Parmi les enzymes connues c'est une des plus efficaces. La catalase est responsable de la dégradation d'H₂O₂ en H₂O et O₂ (réaction 9), empêchant donc ce radical de participer à la réaction de Fenton (Hadi, 2004) :

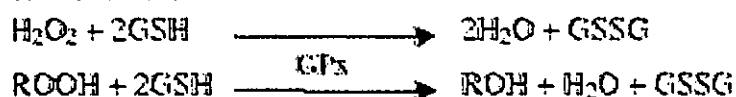


Le mécanisme d'action de ces oxydo- réductases correspond à un transfert d'électrons entre deux molécules d'H₂O₂, on parle de la dismutation (Deby et al, 2002). Contrairement à la Glutathion peroxydase (GPx), l'affinité de la catalase pour l'H₂O₂ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Garait, 2006).

➤ **Les glutathion peroxydases (GPx) et réductases (GR)**

Les glutathion- peroxydases sélénio- dépendantes sont des protéines qui contiennent 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium . Un déficit en sélénium entraîne une chute de cette activité et une réplétion la restaure (Hadi, 2004).

Les GPx à sélénium existent dans le cytosol (cGPx), dans le plasma (pGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HP-GPx), et une isoenzyme est spécifiquement exprimée dans l'épithélium du tube digestif (GI-GPx). Elles diffèrent entre elles au niveau de leur spécificité de substrat, de leur localisation cellulaire et tissulaire (Haton, 2005). Ces enzymes constituent le système majeur de défense car elles détruisent non seulement H₂O₂ mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol (Hadi, 2004). Lors de cette réaction deux molécules glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG) suivant la réactions 10 :



La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de générer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons suivant la réaction 11 (Garait, 2006) :



En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (Marfak, 2003).

➤ **La thiorédoxine (TRX)**

Cette enzyme a une structure proche de celle de la glutathion réductase. Elle consomme aussi du NADPH dans son fonctionnement. La TRX joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydatif grâce à ses propriétés de capture des ROS. Des études biochimiques montrent que les TRXs réduisent des protéines clefs pour le développement, la division cellulaire ou la réponse au stress oxydatif (Soares, 2005).

II-1-4-2 Les antioxydants non enzymatiques

➤ **-Glutathion (GSH)**

Ce tripeptide possédant un groupement thiol présente de nombreuses fonctions (Gault, 2002). Le glutathion peut en effet non seulement réduire H₂O₂ en eau et des peroxydes de types ROOH ou alcool, mais également interagir directement avec les ROS formés par l'oxydation des vitamines E et C baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (figure 13) (Bourdon, 2004).

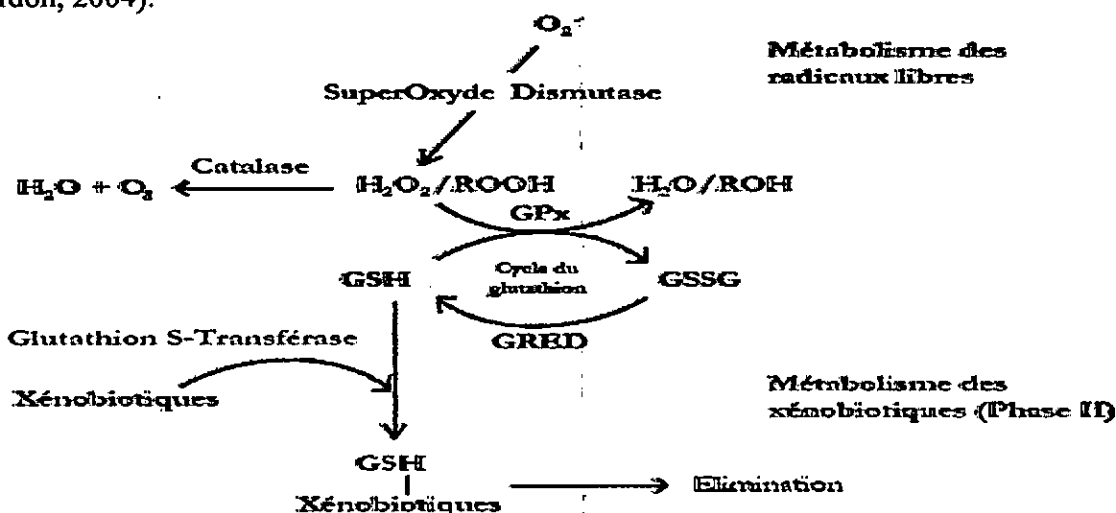


Figure 13 : Schéma illustrant l'implication du GSH dans le métabolisme des xénobiotiques et des radicaux libres (Bourdon, 2004).

Il existe de nombreuses enzymes responsables de la synthèse, de la dégradation ou du recyclage du glutathion. Certaines de ces enzymes ont un rôle crucial pour la stabilisation de ce composé et le maintien de l'équilibre redox (Haton, 2005). Le rapport glutathion réduit/ glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car le flux d' H_2O_2 est important, plus le GSH est consommé et le GSSG augmente (Garait, 2006).

➤ **Métallothionéines (MT) et autres protéines chélatrices des métaux**

Les MTs sont des petites protéines riches en cystéine. La première fonction décrite de ces protéines est la détoxification des métaux lourds. Leur rôle comme antioxydant est démontré dans différents cas de stress oxydant : rayons X, Paquarat, Cisplatine et Doxorubicine. Il a été montré que les MTs étaient capables d'éliminer le radical hydroxyle (Hardivilier, 2005). Les MTs exercent également leur rôle antioxydant en chélatant les ions fer, cuivre et ainsi limite secondairement la réaction de Fenton (Haton, 2005).

Les autres protéines principalement impliquées dans la séquestration des métaux de transition sont : la transferrine, la lactoferrine et la ferretine pour le fer ; l'albumine et la caeruloplasmine pour le cuivre. Ces protéines empêchent les métaux de transition d'intervenir dans la formation des ROS suivant la réaction de Fenton (Bourdon, 2000).

➤ **Vitamines A, C, E**

Les vitamines ne sont pas synthétisées par l'organisme. Leurs concentrations plasmatiques dépendent fortement de l'alimentation et des modifications du flux hépatique.

La vitamine E (ou la famille des tocophérols α , β , γ , δ) représente le principal antioxydant liposoluble présent dans toutes les membranes cellulaires (Bourdon, 2004), où elle se fixe et stoppe la chaîne de réactions de peroxydation lipidique en capturant un radical lipidique (LOO^\bullet) et devient à son tour un radical moins réactif (Soares, 2005). Si le flux des ROS formés est trop important, le radical tocophéryl peut toutefois devenir prooxydant et contribuer ainsi à augmenter la peroxydation lipidique. De nombreux travaux *in vitro* ont montré que l'effet prooxydant de la vitamine E n'existe plus si la vitamine C est présente dans le milieu. Il s'agit de fameux effet de synergie qui existe entre la plupart des vitamines antioxydantes et d'oligoéléments (Pincemail et al, 2002).

La vitamine C (ou acide ascorbique), hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et le fluide extracellulaire, elle peut capturer directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' OH^{\bullet} . Comme la vitamine E, cette vitamine pourrait aussi avoir des propriétés prooxydantes (Servais, 2004).

La vitamine A (caroténoïde), agit de manière synergique avec la vitamine E au niveau de la membrane pour piéger les ROS grâce à une longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons. Elle serait aussi capable de régénérer la vitamine E oxydée (Coulon, 2005).

➤ Les oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur métallique pour maintenir leur activité catalytique. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber- Weiss) (Garait, 2006).

➤ L'ubiquinone et cytochrome C

Contrairement au rôle prooxydant des ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, la forme «ubiquinol» agisse comme antioxydant et protège les membranes de la peroxydation lipidique. Elle est également impliquée dans la régénération de la vitamine E.

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\bullet-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de H_2O (Garait, 2006).

La figure 14 représente les principaux moyens de défenses antioxydantes.

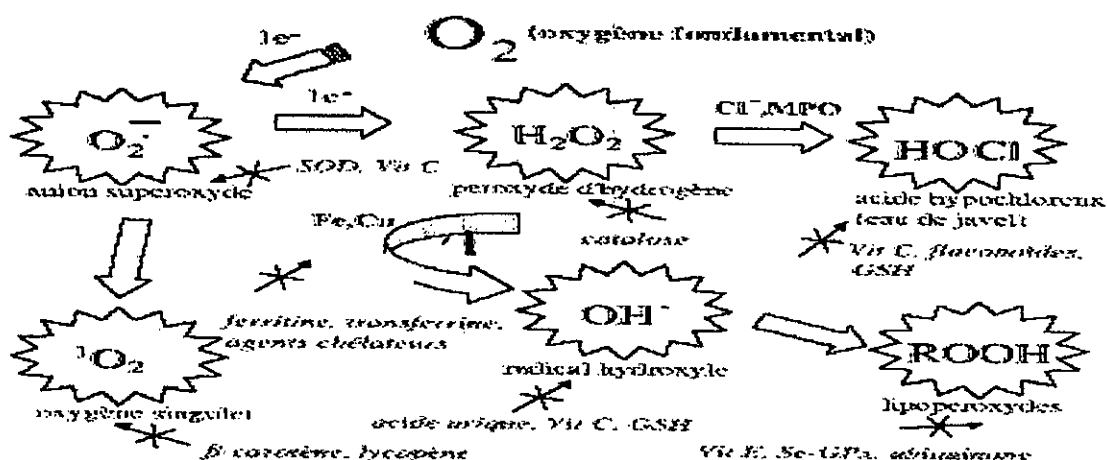


Figure 14 : Régulation de la production des ROS par les systèmes de défenses antioxydantes (Pincemail et al, 2002).

II-2. Implication des métaux dans la génération du stress oxydant

Une hypothèse de plus en plus grandissante indique que les métaux lourds (Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, Ag, Hg, Ni) jouent le rôle de catalyseur dans la détérioration oxydative des macromolécules biologiques et des tissus (Le pape, 2003). De nombreuses études récentes montrent leur capacité à catalyser des radicaux libres entraînant la peroxydation des lipides, la réduction des groupements sulfhydriques des protéines, l'altération de l'homéostasie de calcium et finalement les dommages de l'ADN (Valko et al, 2006).

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. Les plus connues de ces réactions sont la réaction de Fenton et celle d'Haber-Weiss. Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que Cd et Ni par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un «down régulation» des enzymes du système antioxydant ou un épuisement du stock de molécules antioxydantes comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes (Toppi et al, 1999).

II-2-1 Mécanismes d'action d'un stress oxydant induit par les métaux

II-2-1-1 Les métaux lourds non essentiels : exemple du cadmium

Le cadmium est un métal lourd fortement toxique en raison soit de sa toxicité directe sur les organismes soit de son accumulation à travers les différents niveaux trophiques (Vicente, 1983). Il est largement étudié comme un prooxydant puissant. Ainsi, il y a de plus en plus d'études montrant que le cadmium exerce sa toxicité au niveau cellulaire en partie en induisant la formation de ROS, pouvant provoquer la peroxydation lipidique, des dommages à l'ADN ou encore une oxydation des protéines (figure 15) (Martelli et al, 2006).

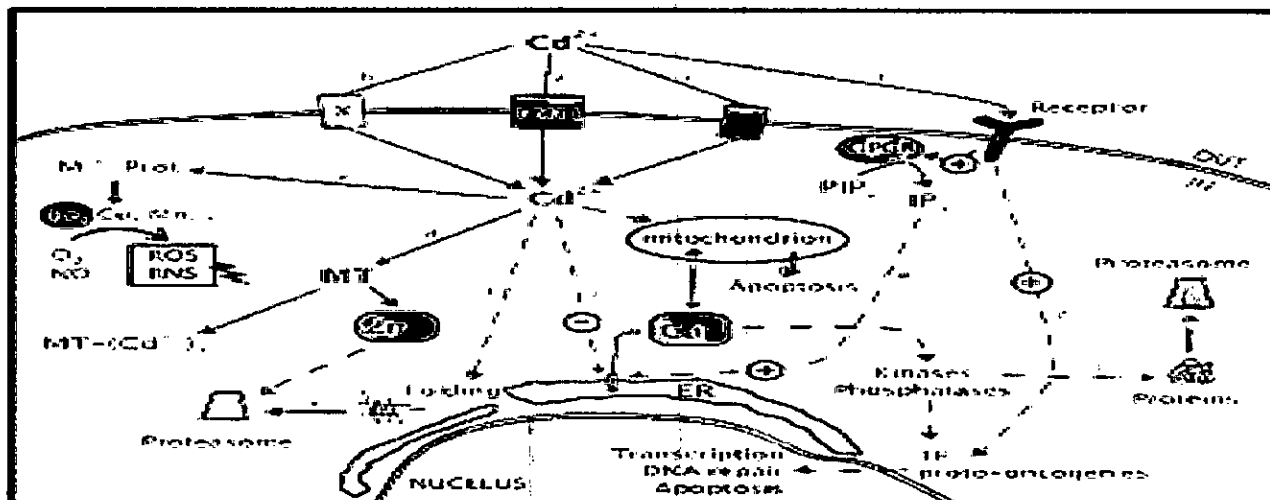


Figure 15 : schéma représentatif des effets toxiques de cadmium (Martelli et al, 2006).

Bien que les mécanismes responsables de l'induction de stress oxydant par le cadmium ne soient encore pas entièrement connus, de nombreuses hypothèses ont été proposées. Le cadmium n'étant pas un métal de Fenton, il induit de façon indirecte la production de ROS et la peroxydation lipidique par interférence avec les systèmes antioxydants (Joris, 2005).

De nombreuses études mettent en évidence que la présence de cadmium dans la cellule génère la production de ROS : l' $O_2^{\bullet-}$, le OH^\bullet et le NO (Valko et al, 2006). Autres expériences ont également confirmé la génération de H_2O_2 , qu'elle-même peut alternativement être une source significative de ROS par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (Watanabe et al, 2003). En effet, le cadmium peut entraîner une diminution de la quantité d'antioxydants (le glutathion) ou de l'activité d'enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant (SOD, GPx, CAT) (figure 16).

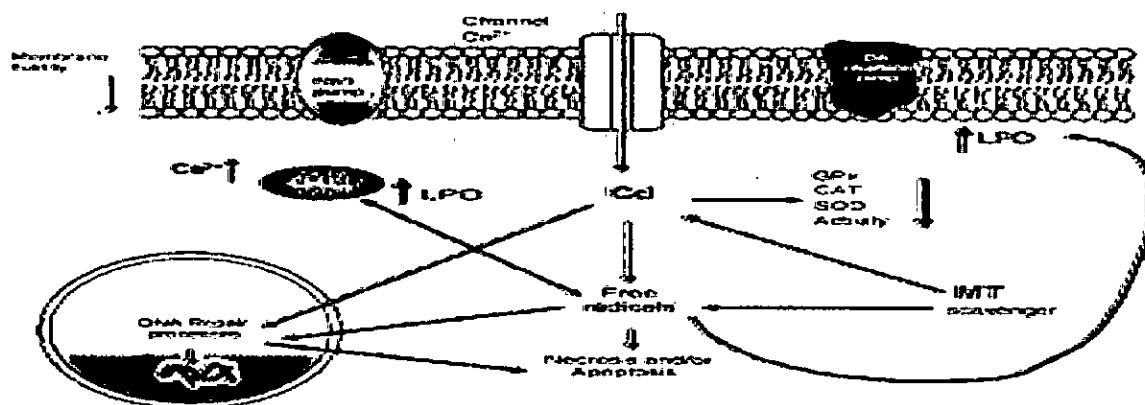


Figure 16 : Mécanisme de stress oxydant Cd induit dans une cellule nerveuse (Armenta et al, 2007).

Une étude récente de Lopez et al (2006) montre que le cadmium semble exercer ses effets délétères sur les cellules nerveuses en induisant un stress oxydant par l'induction de ROS suite à une interaction entre les ions Cd^{2+} et les mitochondries, menant à une perturbation de potentiel redox de la mitochondrie comme conséquence de la diminution de niveau de glutathion et une augmentation de l'activité de la SOD et la CAT.

Un autre mécanisme possible a été présenté il y a quelques années, est l'augmentation de la concentration en fer ou en cuivre à la suite de leur déplacement par le cadmium de métalloprotéines (MTs). Les MTs, protéines riches en groupements SH, sont synthétisées principalement par le foie et le rein. Elles jouent un rôle important dans l'homéostasie des métaux essentiels et dans la protection contre les effets toxiques des métaux lourds en séquestrant la fraction ionique libre (Messaoudi et al, 2002). Selon ce mécanisme, le cadmium peut déplacer le fer et le cuivre de diverses protéines cytoplasmiques et membranaires (ferretine, apo-ferretine). A l'inverse du cadmium, ces deux métaux peuvent causer un stress oxydant direct par réaction de Fenton (Feng et al, 2000 ; Joris, 2005). Les résultats rapportés par une étude réalisée par Watjen et al (2004) représentent une confirmation de cette hypothèse.

Plusieurs effets toxiques du cadmium résultent de ses interactions avec certains éléments essentiels dans l'organisme notamment le calcium et le zinc (figure 17). Un régime déficient en calcium augmente d'avantage la fixation du cadmium et accentue ses effets toxiques (Itokawa et al, 1974). Le cadmium provoque des altérations profondes du métabolisme du calcium, qui consistent, en une résorption osseuse (Ando et al, 1978), une calciurie (Kim et al, 1988) et une basse de la calcémie (Messaoudi et al, 2002). Une déficience en zinc augmente aussi la fixation du cadmium par le foie et le rein et intensifiée la toxicité de ce métal.

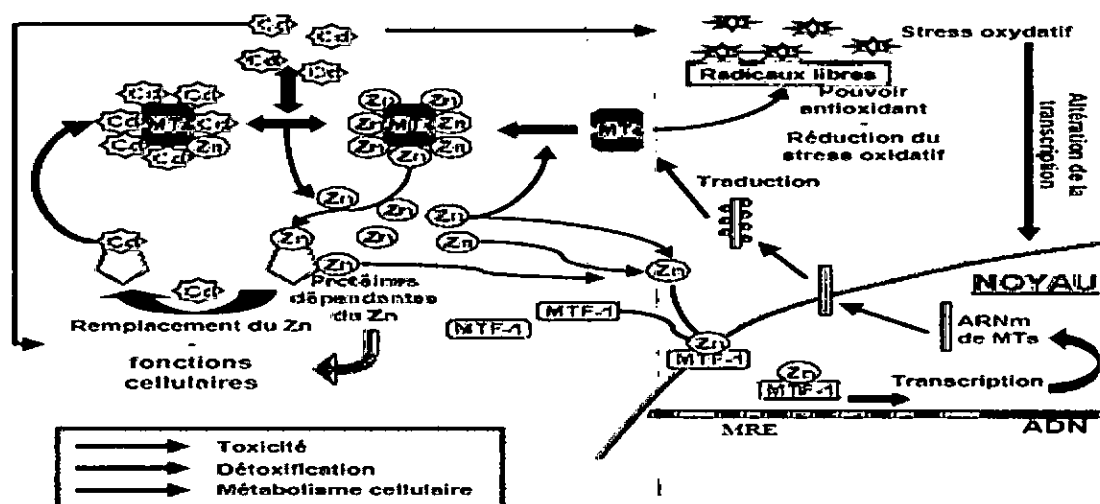


Figure 17 : Interactions entre le cadmium et le zinc liées aux métallothionéines (Pillet, 2001).

La complexité des effets du cadmium s'illustre ici par le fait que la génération de ROS peut d'une part avoir des effets néfastes directs sur le bon fonctionnement de la cellule et d'autre part être considérée comme un mécanisme de riposte où les ROS sont des messagers secondaires. En effet, l'augmentation de la quantité de ROS lors d'une contamination par du cadmium peut influencer l'expression de nombreux gènes, dont ceux de facteurs de transcription (Joris, 2005).

Comme conséquence néfaste du cadmium et du stress oxydant sur la cellule, on peut évoquer ici les atteintes à l'ADN. En effet, la génotoxicité observée en présence de cadmium est étroitement liée au stress oxydant. Le cadmium, faiblement mutagène en tant que tel, peut inhiber la réparation de lésions de l'ADN formées spontanément ou suite à des réactions oxydatives en interférant avec des enzymes antioxydantes par exemple en se substituant au zinc de certaines protéines à doigt de zinc impliquées dans la réparation de l'ADN (Bertin et al, 2006). Suivant la localisation et le nombre des lésions de l'ADN le cadmium peut induire la formation des cellules tumorales, l'apparition d'un cancer, et même la mort cellulaire programmée appelée apoptose (figure 18) (Joris, 2005).

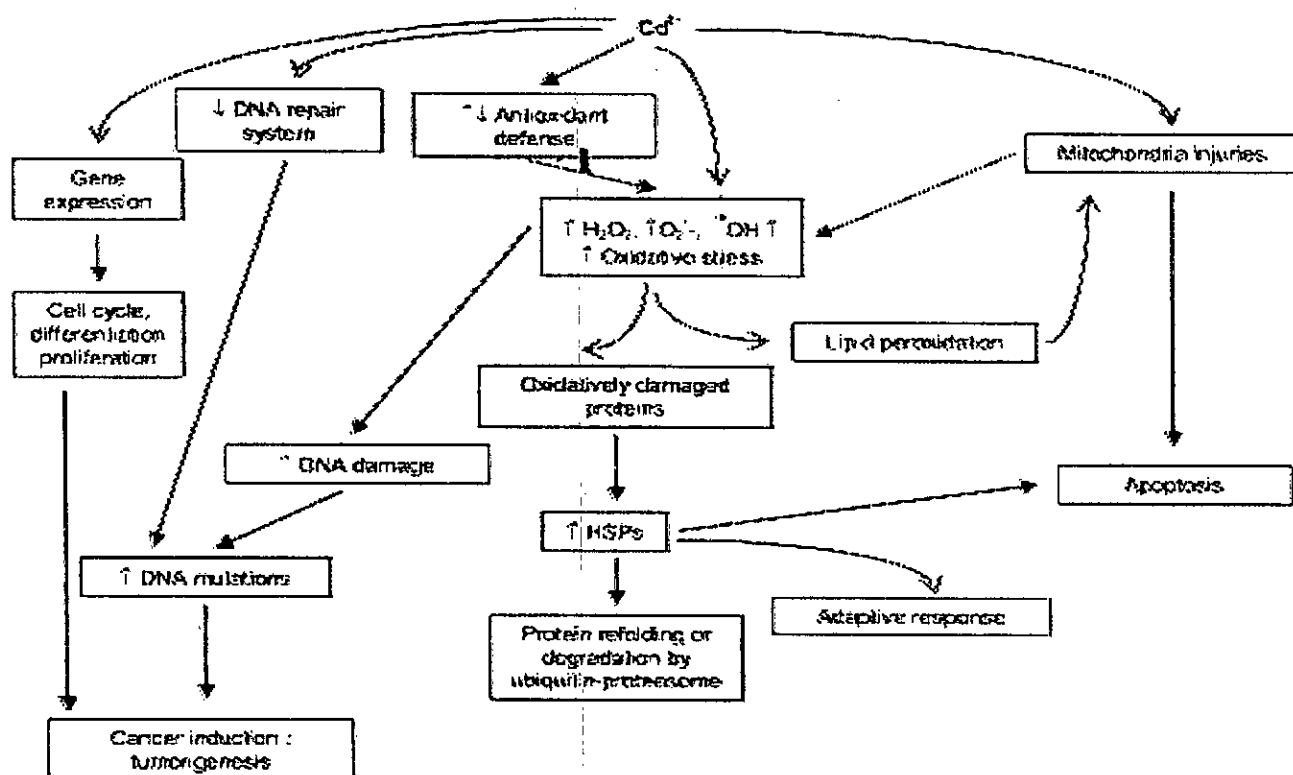


Figure 18 : Schéma général des conséquences biologiques du cadmium sur la cellule (Bertin et al, 2006).

II-2-1-2 Les métaux lourds essentiels : exemple du zinc

Par opposition au cadmium, le zinc est un oligoélément essentiel à toutes les espèces vivantes et est l'oligoélément le plus abondant pour l'homme (besoin de 5 mg.jour⁻¹). Il intervient au niveau de la croissance, du développement osseux et cérébral, de la reproduction, du développement fœtal, du goût et de l'odorat, des fonctions immunitaires et la cicatrisation des blessures (Ho, 2004).

Le zinc possède des propriétés structurales, catalytiques et antioxydantes très importantes. Il protège les groupements thiols des protéines et joue un rôle central dans l'intégrité des membranes cellulaires ; ses ions stabilisent le plasma et les membranes internes, soit par liaisons aux constituants structurelles soit en prévenant la peroxydation lipidique catalysée par les métaux de transition (fer, cuivre) (Shuilleablaen et al, 2006). Le zinc est également le composant essentiel de plus de 300 (métallo) enzymes dont la SOD (Cu-Zn) et autres protéines impliquées dans de multiples fonctions métaboliques. De nombreux facteurs de transcription dont la structure dite en doigts de zinc (plus de 3000) nécessitent la présence de ce métal essentiel à la liaison avec l'ADN (Pillet, 2001). L'homéostasie de zinc exerce donc un contrôle sur la transcription de nombreux gènes et joue un rôle crucial dans la réparation de l'ADN et la stabilisation génétique (Ho, 2004).

Compte tenu le rôle essentiel du zinc au sein de la cellule, on conçoit aisément l'impact de tout changement de l'homéostasie de ce métal sur le bon fonctionnement cellulaire.

Une carence en zinc est principalement liée à un régime alimentaire pauvre en zinc. Le zinc étant un élément trace essentiel, son déficit conduit à des troubles plus au moins graves. Un déficit en zinc peut augmenter les risques de certains cancers et accélérer les processus de vieillissement. La plupart des maladies infectieuses sont associées à des stress oxydants, engendrés par la réponse immunitaire innée. En cas de déficience en zinc ou de dysfonctionnement important d'une zincoprotéine impliquée dans l'élimination de radicaux libres, l'une des premières conséquences sera un dysfonctionnement de la réaction inflammatoire, et par cela même l'aggravation de l'infection (Shuilleablaen et al, 2006).

D'après Ho (2004), les augmentations de ROS induites lors d'une déficience du zinc sont accompagnées des altérations des protéines et des dommages de l'ADN(figure 19).

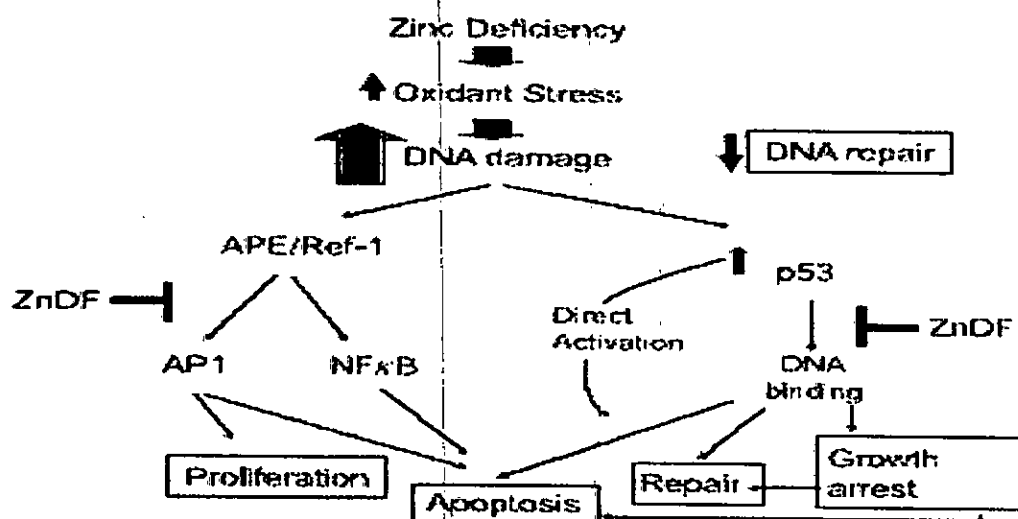


Figure 19 : Les effets d'une carence en zinc (Ho, 2004)

Une forte exposition humaine peut provenir de teneurs naturellement élevées en zinc, par exemple lors de culture sur des sols zincifères et passage du zinc dans la chaîne alimentaire, ou d'une exposition d'origine anthropique, par exemple chez les travailleurs des raffineries de minerais et des industries de transformation du zinc (Pillet, 2001).

Bien que le zinc soit considéré comme un élément relativement non toxique, mais comme tous les métaux lourds, l'exposition excessive (pollution environnementale, professionnelle) peut causer des effets toxiques (Formigari et al, 2007). Au niveau cellulaire, de nombreux composés du zinc génèrent des espèces réactives d'oxygène, notamment du peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde, en réagissant avec les groupements thiols du glutathion. Ces espèces réactives d'oxygène sont responsables de leur toxicité.

Les différentes études de toxicité du zinc effectuées chez l'animal donnent des résultats contradictoires selon les espèces et les formes chimiques de zinc étudiées. En conséquence aucune règle précise ne peut être donnée dans le cadre d'une extrapolation pour l'homme. Cependant, une variable très importante qui devrait être soigneusement considérée est les différentes concentrations utilisées dans les études publiées. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* (Matsushita et al, 1996 ; Aiuchi et al, 1998 ; Nodera et al, 2001 ; Santon et al, 2006) montrent le rôle d'un traitement du zinc dans le blocage de l'apoptose. En revanche, l'étude de Weissgarten et al (2002) indique que la supplémentation *in vitro* du zinc à des cultures cellulaires humaines (prostate et sang) isolées des sujets lentement hémodialysés accélère ce processus.

Formigari et al (2007) ont trouvé les mêmes résultats sur des sujets sains. Wieseman et al (2007), rapportent, sur un modèle *in vitro* des cellules endothéliales d'artère pulmonaire que la concentration intercellulaire élevée du zinc peut perturber le fonctionnement mitochondrial et déclenchée la voie apoptotique par un stress oxydant d' H_2O_2 . Une étude *in vivo* de Yanagisawa et al (2004) montre que la prise diététique excessive du zinc peut induire des conditions pathologiques liées directement au stress oxydant.

La concentration cellulaire du zinc est estimée de 180 à 250 μM et est strictement contrôlée par les métallothionéines, protéines apparaissent comme d'importants régulateurs du zinc disponible dans la cellule. De ce fait, les composés oxydants tels que les cytokines, les métaux lourds toxiques, les UV,...entraînent la libération de zinc (Joris, 2005). La fraction libre de zinc dans le cytosol est à l'origine de la toxicité de zinc (figure 20) (Klaus, 2007).

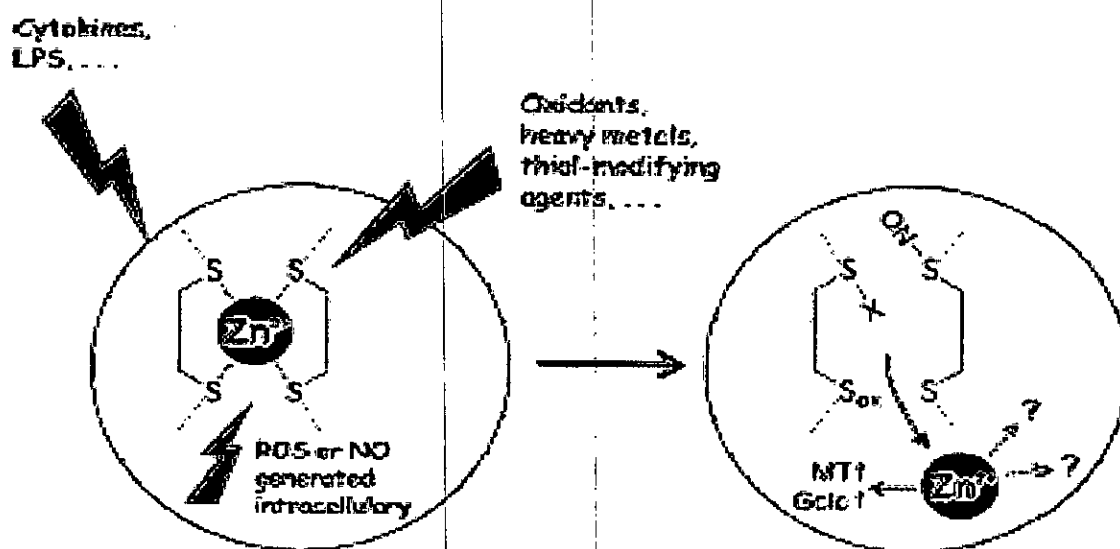


Figure 20 : Libération du zinc par différents composés oxydants (Klaus, 2007)

Dans un cadre général, le stress oxydant du zinc peut résulter d'un excès ou d'une déficience de ce métal (Formigari et al, 2007).

CHAPITRE III :
MATERIEL ET METHODES

Ce chapitre décrit l'étude expérimentale séparée en deux parties ; la première résume la zone d'étude du point de vue géographie, hydrographie, climatologie et enfin sa géologie. La seconde partie comportera l'analyse chimique et la recherche toxicologique des métaux lourds présents dans les eaux de la ville de Jijel.

III-1. Choix des sites d'étude

Afin de déterminer les concentrations en cadmium et en plomb dans l'eau de boisson consommée par la population de la ville de Jijel, des analyses ont été effectuées sur des échantillons recueillis dans différentes sources approvisionnant cette ville en eau potable :

- Les puits et forages.
- Les citernes de camions utilisées dans l'acheminement des eaux.
- Les robinets d'eaux de maisons.

Ce choix devrait nous permettre de suivre la qualité de l'eau depuis le forage jusqu'au consommateur et de situer le moment de la contamination ainsi que les causes et les niveaux de la contamination en cadmium et en plomb.

Ont ainsi été effectués :

- Pour l'eau de robinet : trois échantillons prélevés d'un robinet d'un quartier de la ville de Jijel (à Ouled Aïssa)
- Pour l'eau de citernes :
 - camion citerne en plastique : 03 prélèvements
 - camion citerne en métal : 03 prélèvements
- Pour les sources utilisées pour l'approvisionnement en eau de boisson, nous avons choisi 03 sites principaux ;
 - les forages de l'oued Nil
 - la source de Bachelot (bassin versant de l'oued Nil)
 - et les puits collectifs de la région Redjla (dans le même bassin de l'oued Nil).
- Parler de la contamination, c'est nécessairement établir une comparaison par rapport à un état de référence jugé plus satisfaisant, selon une certaine échelle de valeur. Dans notre étude; deux échantillons ont été retenus comme eau de référence : l'eau minérale de Texanna et l'eau de Zemzem (Meka, Arabie Saoudite) .

III-2. Identification de la zone d'étude

Le choix de la démarche de travail dépend des objectifs de l'étude. Ainsi, il est important pour évaluer les facteurs susceptibles de contaminer une source d'approvisionnement en eau de boisson d'inventorier les sources pouvant influencer le site d'étude, d'avoir des renseignements sur sa géologie, la climatologie et la connaissance du contexte géographique.

III-2-1 Cadre géographique

Les sites, où les échantillonnages de l'eau ont eu lieu, se situent dans différentes régions de la wilaya de Jijel (Ouled aissa, Texanna, Taher).

Jijel est une wilaya côtière, située au nord est de l'Algérie et fait partie de ses grands bassins versants (figure 21). Elle occupe une superficie de 2 398 Km² avec 11 Daïra et 28 communes. Elle est limitée au nord par la mer Méditerranée, au sud par la wilaya de Mila et la wilaya de Constantine, à l'est par la wilaya de Skikda, à l'ouest par la wilaya de Bejaia et la wilaya de Sétif.

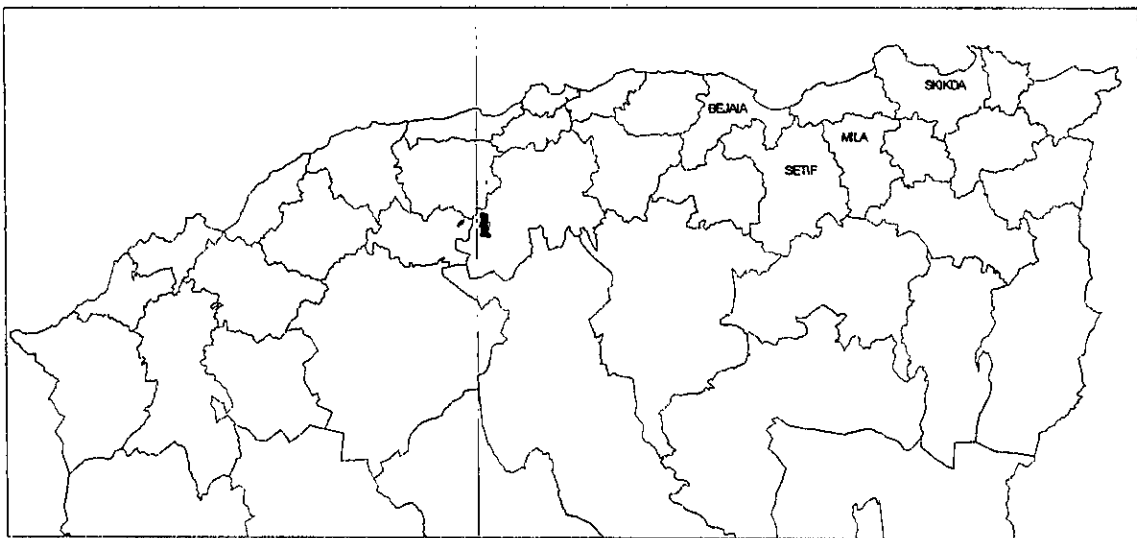


Figure 21 : Localisation géographique de la wilaya de Jijel (BNEDR, 2004).

La wilaya de Jijel est caractérisée par un relief montagneux très accidenté. Les montagnes occupent 82 % de la superficie totale. On distingue principalement deux régions physiques :

- Les zones de plaines, situées au nord, le long de la bande littorale.
- Les zones de montagnes, moyennes à la wilaya et difficiles à la limite sud de la wilaya, caractérisées par une couverture végétale très abondante et réseau hydrographique important.

III-2-2 Le contexte socio- économique

La wilaya de Jijel comptait selon le dernier recensement (31/12/2000) une population de 602 407 habitants pour une densité moyenne de 247 habitants au Km². Aux diverses activités, la majeure partie de la population de cette région est liée à l'agriculture (secteur primaire).

➤ **Le secteur primaire (l'agriculture) :**

L'activité agricole est d'une importance économique majeure dans la région. Elle occupe une superficie de 99 024 ha soit un pourcentage de 41% de la superficie totale de la wilaya. La superficie utile est estimée de 43 649 ha dont 6 210 ha est irriguée à partir des cours d'eaux, des forages, des puits, des bassins versants...etc. 14 500 ha de cette superficie se situe en zone plaine y compris la zone de notre étude (soit 33 % de la superficie utile) et 29 149 ha en zone de montagnes (67 % de la superficie utile) (Direction des services agricoles, 2007).

➤ **Les secteurs secondaires :**

Les régions côtières de la wilaya sont principalement liées à la pêche ainsi que la récolte de liège. La quasi-totalité des activités de caractères industriels existent sous forme de quelques unités de petites tailles (telle que la briqueterie) et entreprises publiques locales en plus de la centrale thermique et la tannerie.

III-2-3 Description des sites retenus

Les sites retenus comme sources d'approvisionnement en eau de boisson de la ville de Jijel se situent dans La daïra de Taher qui s'étend à dix huit kilomètres de l'est de la ville de Jijel.

Taher est une ville de 68 000 habitants, caractérisée par une activité commerciale accrue. Elle est aussi le pôle industriel de la wilaya de Jijel avec la zone industrielle de (Oueled Salah), la briqueterie, la centrale thermique, l'aéroport et le port. La Daïra de Taher est également caractérisée par les anciennes mines d'argent et d'or ainsi que de marbre localisées au niveau de la source de l'oued Nil « Ain Tizi » aux montagnes de Chahna au sud de Taher.

Plusieurs sites de cette région ont été retenus : les forages de l'oued Nil, la source de Bachelot, les puits collectifs de « Redjla » et la source de Boucherchour. Ces sites font partie des plaines côtières de la wilaya (figure 22).

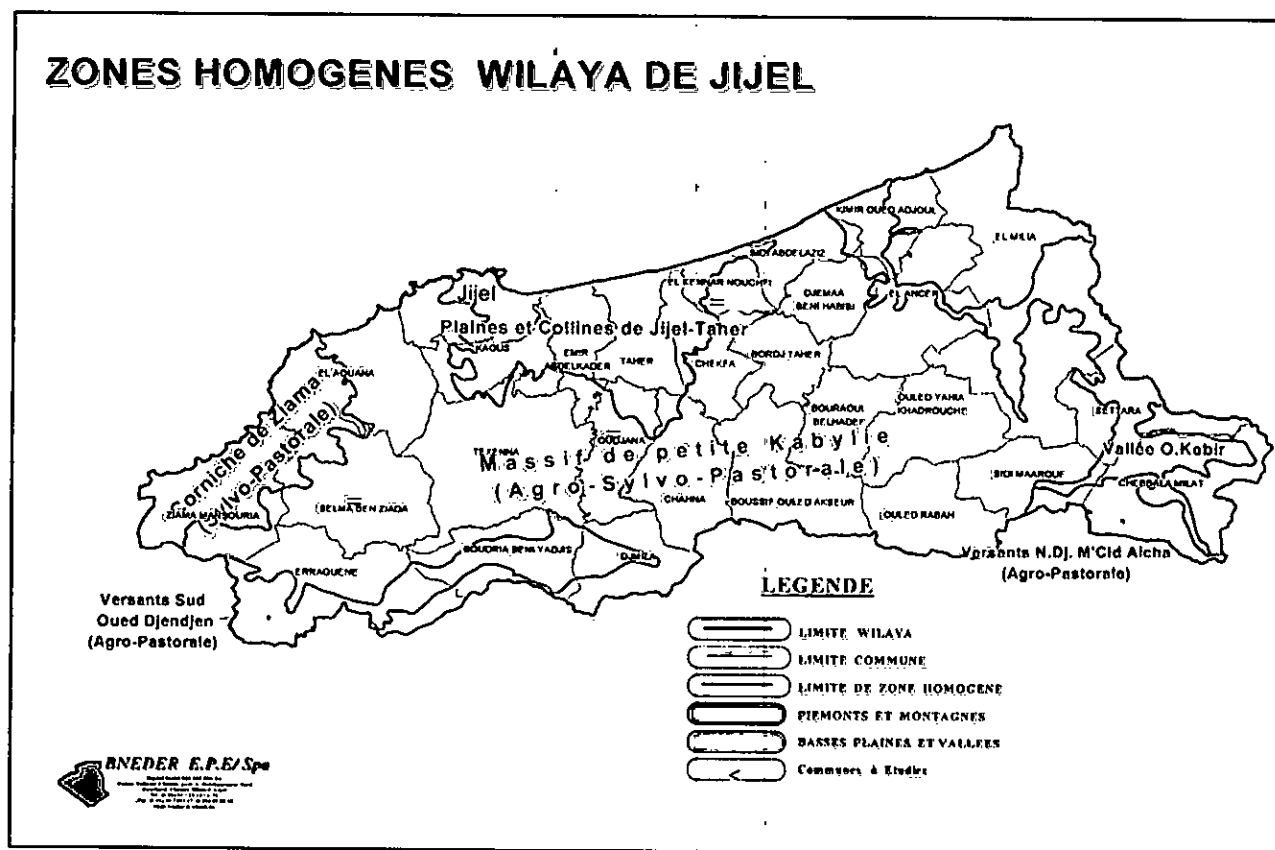


Figure 22 : Zones homogènes de la wilaya de Jijel (BNEDEP, 2004).

L'ensemble de ces sites se situe dans le bassin versant de l'oued Nil qui s'étend à une vingtaine de kilomètres au sud est de la ville de Jijel et occupe une superficie de 268 Km², subdivisé en deux sous bassins versants respectivement de 148 Km² et de 120 Km². Il est bordé à l'ouest par le bassin versant de l'oued Djendjen et à l'est par celui de l'oued El Kebir. Au sud, ce bassin versant est limité par les reliefs de la petite Kabylie qui dépassent très facilement 500 m d'altitude, et constituent avec la mer méditerranée au nord, ses limites naturelles (figure 23). Ce bassin est drainé par l'oued Nil et ses deux affluents, les oueds Boukhara et Sa'ayyoud. Ces trois oueds coulent du sud vers le nord.

Avec un débit annuel de 230 millions de mètres cubes à l'embouchure, l'oued Nil est un des oueds les plus importants de la région de Jijel.

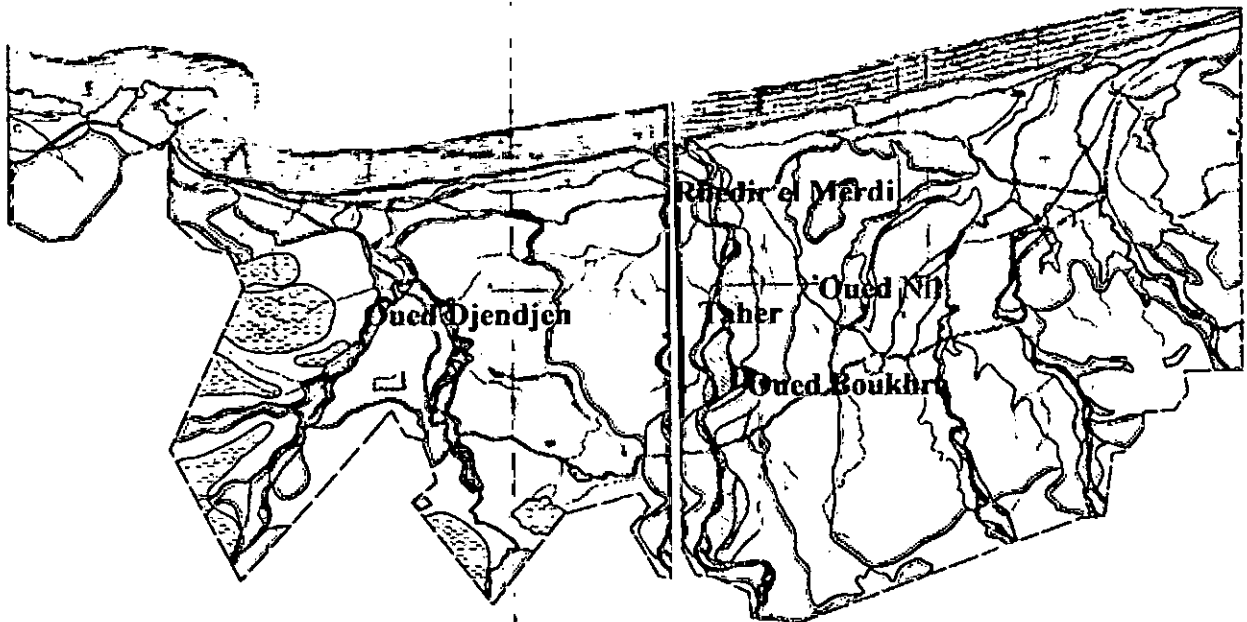


Figure 23 : Situation de bassin versant de l'oued Nil (Lehtihet, 1983).

La région de « Redjla » se situe dans la partie avale du bassin versant de l'oued Nil. Elle est caractérisée par son marécage localement appelé « Rhedir el mardj » qui résulte de l'écoulement de l'affluent de « Tacift » et plus d'une dizaine de puits collectifs qui alimentent la ville de Jijel en eau de boisson distribuée en camions citernes (en métal et en plastique). « Redjla » est une région agricole, entièrement maraîchère. Elle s'étend à environ quatre kilomètres du centre ville de Taher.

Les forages de l'oued Nil et la source de Bachelot se situent en amont de « Redjla », et sont, comme cette dernière, le siège d'une exploitation agricole utilisant massivement des engrais chimiques (Azote, phosphate,..) ; ainsi que des pesticides divers.

La plus grande partie des sols de la plaine alluviale de l'oued Nil, est soumises à des excès d'eau d'origines diverses. Les fortes précipitations arrosant cette plaine sont à l'origine de l'engorgement des sols peu perméables. Dans la zone avale de la plaine alluviale, les fortes précipitations contribuent par ruissellement à engorger les zones basses, vallées des oueds et Rhedirs (dépressions fermées ou marécages). Au fond de ces Rhedirs, l'eau persiste pendant la plus grande partie de l'année, c'est le cas par exemple de marécage de la région de Redjla .

(Rhedir el mardj). En amont, la morphologie de cette plaine est caractérisée par une succession de crêtes arrondies, dépassant souvent 100m d'altitude (Lehtihet, 1983).

III-2-4 Le réseau hydrographique

Le réseau hydrographique de la wilaya de Jijel est très dense (figure 24). L'oued Mencha, Djendjen et l'oued de Nil possèdent plusieurs affluents dont le chevelu hydrologique couvre entièrement ces trois bassins versants et coule vers la méditerranée dans le sens général sud nord à travers la plaine de Jijel, ceci est du à des importantes ressources superficielles qui ne sont pas bien exploités.

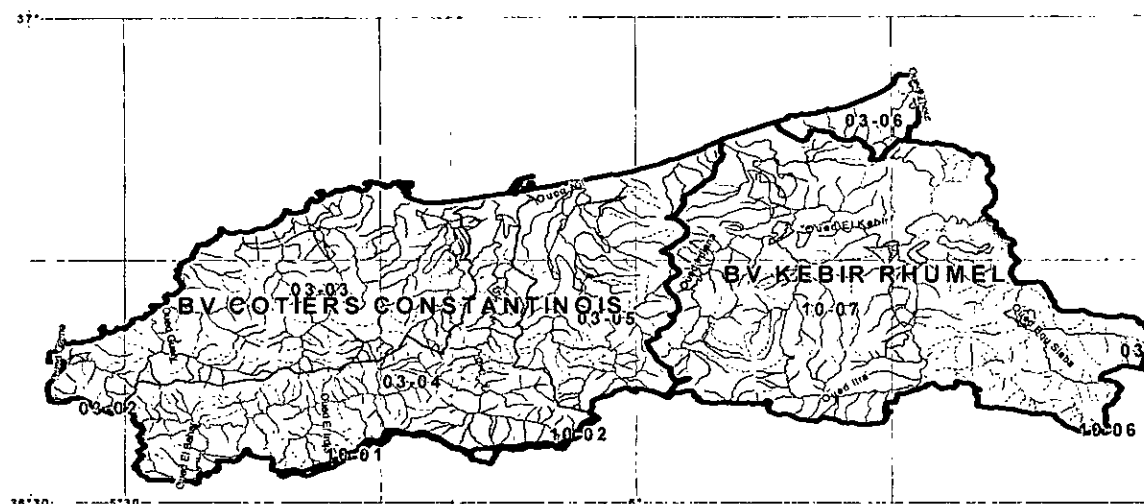


Figure 24 : Carte hydrographique de la Wilaya de Jijel (BNEDR, 2004).

III-3. Caractéristiques climatologiques de la zone d'étude

La bonne connaissance des conditions climatiques joue un rôle majeur dans la compréhension de l'évolution des éléments chimiques, la protection et la résolution des problèmes de pollutions au niveau des nappes d'eaux (Debieche, 2002).

La plaine Jijel- Taher fait partie de la zone littorale, cette région bénéficie d'un climat tempéré avec un hiver doux caractéristique des zones méditerranéennes, son régime climatique dépend de deux paramètres principaux : les précipitations météorologiques et la température.

III-3-1 Précipitations météorologiques

Cette région reçoit annuellement une moyenne de 1200 mm de pluie par an. Elle est considérée parmi les régions les plus arrosées d'Algérie (figure 25).

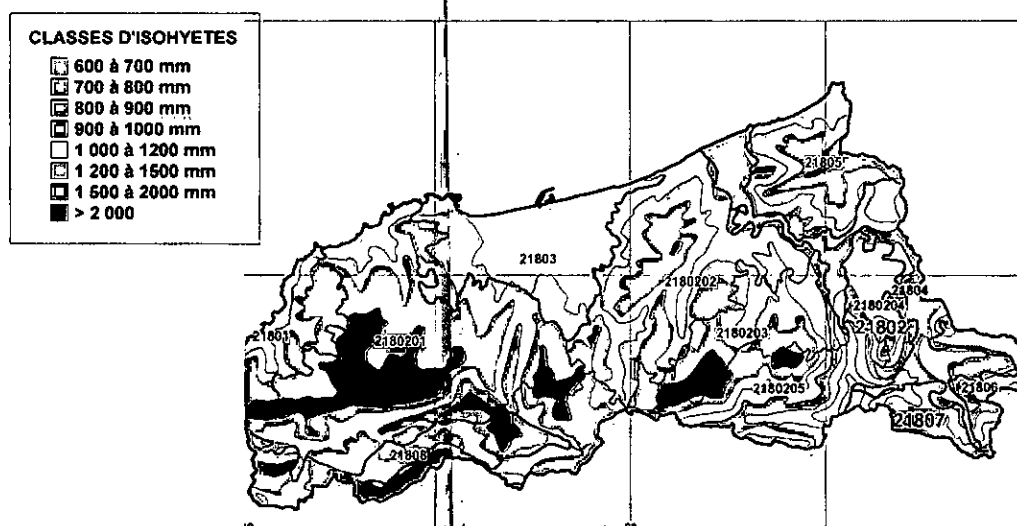


Figure 25 : Carte Pluviométrique de la Wilaya de Jijel (BNE DR, 2004).

Le tableau 6 représente une étude statistique des données des précipitations de la wilaya de Jijel.

Tableau 6 : Répartition mensuelle des précipitations (en mm) :1998-2007. (Office National de Météorologie(ONM), station Jijel aéroport)

Mois	Sept	Oct.	Nov	Déc	Janv	Fevr	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout
Moyenne	85,5	58,3	182,9	200,2	155,6	113,5	71,5	72,7	48	12,3	3,1	18
Max	270	143	338	407	333	231	269	130	130	56	16	86
Min	26	1	40	85	12	42	14	33	5	0	0	0
Ecart type	67,59	41,16	93,76	82,85	17,42	52,65	69,74	36,37	51,18	16,22	7,79	8,47
Saisons	Automne			Hiver			Printemps			Été		
Moyenne	108,9			156,43			64,06			11,13		

La wilaya de Jijel reçoit une forte pluviométrie qui se caractérise par son irrégularité suivant les mois de l'année. Sur les dix dernières années, elle a été en moyenne de 156,43 mm pour la saison hivernale et de 11,43 mm seulement pour la saison estivale.

La neige dans cette région ne fait que de rares apparitions sur les reliefs élevés. Le même constat est observé pour les brouillards et les gelées blanches. Le débit des rivières augmente considérablement durant la saison des pluies et avec une moindre mesure durant la fonte de neiges. Toutefois, ces rivières ruissellent avec un débit minimal durant la saison sèche.

III-3-2 La température

Les valeurs moyennes des températures mensuelles de la wilaya de Jijel sont présentées dans le tableau 7. Ces données nous ont été fournies par l'ONM de Jijel.

Tableau 7 : Répartition mensuelle moyenne des températures en C°(1998-2007).
(Office National de Météorologie(ONM), station Jijel aéroport)

Mois	Sep	Oct	Nov	Déc	Janv	Fevr	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout	Moy
Temp En C°	23,52	20,84	15,0	12,24	11,23	11,42	13,73	15,16	18,66	21,71	25,13	25,6	17,85

Les moyennes les plus élevées sont observées essentiellement pendant la période d'été avec des températures variant de 20 à 25 C°. Par contre, les températures les plus basses, de 10 à 15 C°, sont observées pendant la période d'hiver.

Ces écarts de température, nous indiquent que pendant la période d'été l'évapotranspiration de l'eau est maximale. Les concentrations en éléments chimiques dans la nappe se trouvent par conséquent affectées. Tekkouk (2005) enregistre sur 1288 mm de pluie tombée sur la région de Taher, un taux d'évapotranspiration de 442 mm, soit 34,31 % de la lame précipitée.

III-4. Le cadre géologique

La géologie est un outil précieux au service de l'étude hydrogéologique et hydrologique. En effet, elle permet de définir les formations et les structures susceptibles de constituer des réservoirs, et d'estimer leurs importances et capacités.

III-4-1 Localisation géologique de la zone d'étude

La région étudiée fait partie de la petite Kabylie qui s'intègre dans la partie orientale des Maghrébides, branche méridionale de la chaîne alpine de la Méditerranée orientale.

De grands domaines géologiques structurés en nappes de charriage caractérisent cette partie nord – orientale de la chaîne alpine d'Algérie (Djellit, 1987).

- ❖ **Le socle kabyle :** La lecture du schéma structural de cette partie orientale des Maghrébides met en évidence de grands affleurements de roches anciennes anté-mésozoïques : Les massifs de la petite Kabylie. On y distingue deux grands ensembles :
 - ✓ Un ensemble inférieur gneissique.
 - ✓ Un ensemble supérieur phylladique.
- ❖ **Le domaine des flyschs :** Notre région d'étude est particulièrement caractérisée par un empilement de nappes à faciès flysch. Les travaux antérieurs (Djellit, 1987) ont distingué trois types bien distincts :
 - ✓ Le flysch massylien.
 - ✓ Le flysch maurétanien.
 - ✓ Le flysch numidien.

La géologie locale du bassin versant de l'oued Nil présente une lithologie très variée. Elle montre diverses formations représentées dans la figure 26-A (Tekkouk, 2005).

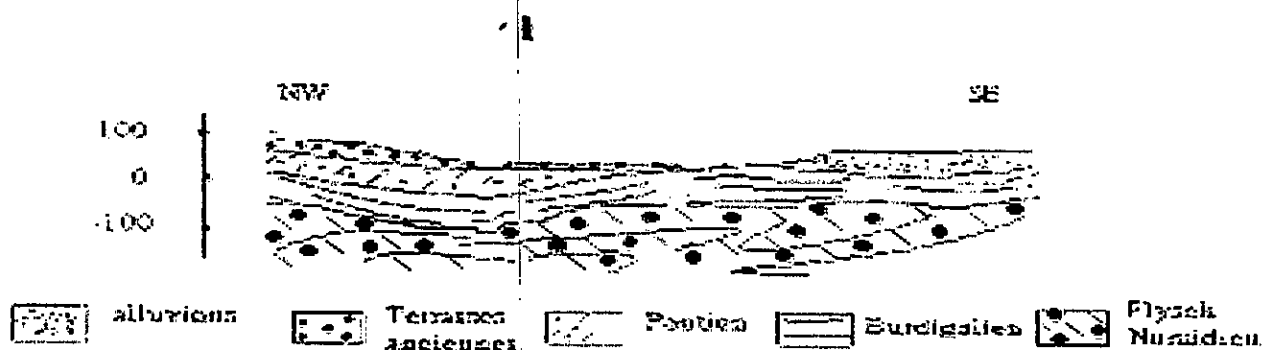


Figure 26-A : Coupe géologique au niveau de la plaine alluviale de l'oued Nil (Tekkouk, 2005).

III-4-2 Stratigraphie

La colonne stratigraphique des terrains géologiques rencontrés dans la région de Jijel s'établit comme suit (figure 26-B) :

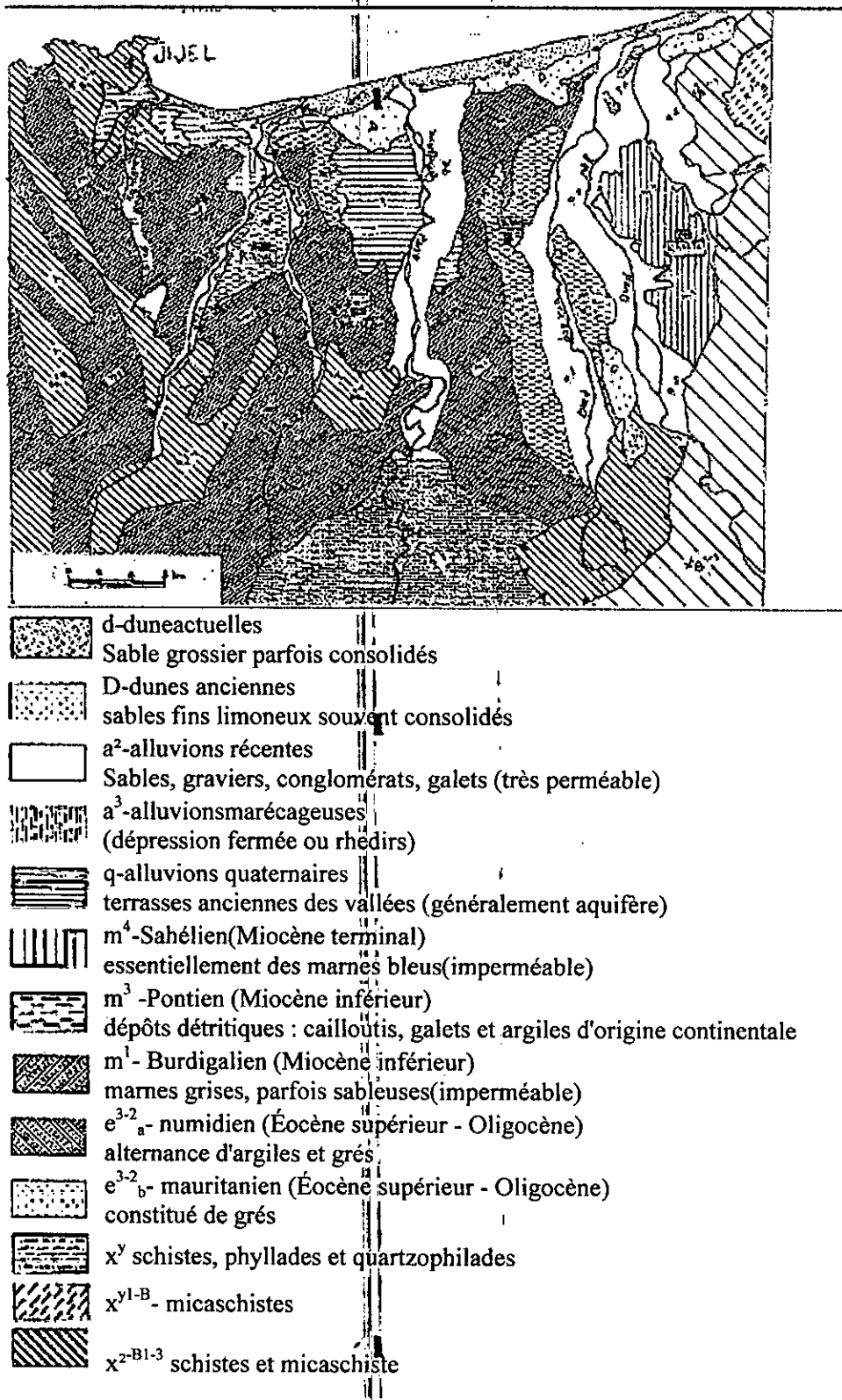


Figure 26-B : Esquisse géologique de la carte géologique de la Jijel (ANRH, 1981).

III-4-3 Formations susceptibles de libérer les métaux lourds

Dans la partie occidentale du socle cristallophyllien de la petite Kabylie, massif interne des Maghrébides, apparaît dans la région de Taher (zone de notre étude), un champ représenté par un ensemble gneissique de base et un complexe de micaschiste au sommet. Entre ces deux ensembles, superposés, s'individualise une formation des alternances au sein de laquelle se logent les indices minéralisés. Au sommet de cette formation, une bande carbonatée à interlits de roches vert sombre sert de support principal à la minéralisation.

L'étude comparative paragenétique et géochimique des différents indices minéralisés montre une homogénéité quasi-parfaite du champ minier de Taher. Ces derniers, clairement métamorphisés, constituent des affleurements isolés d'un même horizon minéralisé, ultérieurement désarticulé. En effet, tous les indices présentent un « faciès » de minerai identique se traduit par :

- 1- Un environnement de schiste feldspathique, d'amphibolites, de calcschistes, de carbonates et de dépôts stratoïdes de quartzite/barytine.
- 2- Une paragenèse de minerai déformé et métamorphisé, essentiellement à pyrrhotite- pyrite, magnétite, galène, blende chalcopryrite, cuivre gris et freibergite.
- 3- Une zonalité métallique et des corrélations géochimiques particulières.

La comparaison des minéralisations de Taher avec celles de certains gisements de Pb-Zn dans le monde qui leur sont semblables, permet de proposer une origine hydrothermale syngénétique pour ces concentrations minérales.

L'existence de ce type de minéralisation permettra de définir un événement métallogénique ancien typique des socles nord algérien qu'il faudrait prospecter sur l'ensemble des zones internes des maghrébides (Aalfiz et al, 1998).

III- 5. Démarche analytique et techniques employées

La seconde partie de ce chapitre expose les techniques analytiques de chimie utilisées dont l'objectif est d'estimer les concentrations des métaux lourds dans l'eau de boisson de la ville de Jijel.

Les métaux toxiques retenus dans le cadre de notre étude se sont limités au plomb et au cadmium, principalement pour deux raisons :

- L'importante toxicité, aiguë et chronique, sur la santé et l'environnement et la forte bioaccumulation de ces deux métaux dans les chaînes alimentaires.
- Une grande partie de dépassement des normes de comestibilité observées lors des analyses effectuées antérieurement portaient sur ces deux éléments dans les eaux de boisson de la région de Jijel.

Des procédures standardisées ont été utilisées pour estimer sur chaque échantillon de l'eau, les concentrations en ces deux éléments. Ce travail a été réalisé au laboratoire de Pharmacologie et phytochimie de l'université de Jijel.

III-5-1 Prélèvement et conditionnement des échantillons

La qualité des résultats obtenus lors d'analyses de micropolluants métalliques dépend de la fiabilité, de la répétabilité des méthodes de dosage, mais également des précautions prises lors de l'échantillonnage, du stockage et de la préparation des prélèvements.

III-5-1-1 Le prélèvement

Le prélèvement et la préparation des échantillons de l'eau pour le dosage des métaux lourds sont des étapes clés du processus analytique et posent des exigences particulières. A cet égard, les guides d'échantillonnages présentant les techniques de prélèvement appropriées ont été strictement suivis, et le plus grand soin a été donné au maintien des conditions de propreté, pendant la collecte, le transport et lors de l'analyse des échantillons.

➤ Conditionnement du matériel

Pendant toutes les étapes du travail, les consignes pour éviter une éventuelle contamination ont été respectées. Les échantillons ont été collectés dans des flacons en verre de 250 ml, subissent au préalable un nettoyage minutieux suivant la méthode ultra- propre de Quémerais et al (1997): lavage des flacons avec du détergent, suivi d'un rinçage abondant à l'eau de robinet. Décontamination par l'acide nitrique, cette étape consiste en un trempage des flacons dans une solution d'acide nitrique (10 %), associé d'un rinçage successif avec de l'eau distillée. En fin, une stérilisation dans l'étuve pendant 12 heures à 120 C°.

Tout le flaconnage utilisé au cours des préparations de réactifs et de dosage (fioles, béchers, set de filtration,...) a été décontaminé selon le protocole strict précédemment décrit pour le flaconnage sur terrain.

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytiques. Les pesés ont

été effectués à l'aide d'une balance analytique possédant une précision de 0,001g.

➤ **Protocole de prélèvement**

Des précautions particulières ont également été prises lors du prélèvement. Pour chaque site, on prélève trois flacons. Avant la prise de l'échantillon, chaque flacon est rincé à trois reprises avec de l'eau à analyser et rempli à ras bord jusqu'à ce que le volume d'eau soit renouvelé trois fois. Une fois la prise de l'échantillon est effectuée, le flacon est fermé directement de façon à limiter le plus possible les bulles d'air. Après chaque prélèvement, un étiquetage rigoureux a été effectué pour éviter tout risque de confusion des échantillons (lieu, date,...). Les flacons ont été conservés, depuis le prélèvement jusqu'au laboratoire, dans une glacière portable et réfrigérée (à 4 C°).

Concernant le prélèvement au robinet, c'était de type «premier jet», pris le matin avant toute utilisation de l'eau (après huit heures environ de stagnation).

III-5-1-2 Conditionnement des échantillons

Pour assurer le meilleur conditionnement des échantillons et s'affranchir de problèmes de modifications de matrice et de contamination, tous nos échantillons sont acidifiés par 2 ml de l'acide nitrique (HNO₃ 65 %) pour 100 ml d'eau à analyser, afin de ramener le pH de l'échantillon inférieur à 2, car l'acide nitrique concentré est un oxydant puissant qui dissout tous les métaux usuels. Il est largement utilisé pour décomposer les échantillons organiques avant la détermination de la teneur en trace métallique, pour limiter l'adsorption des métaux sur les parois et enfin pour tuer ou empêcher le développement de microorganismes qui pourraient capter les métaux. Après acidification, tous les échantillons sont filtrés au travers des membranes filtrantes de porosité 0,45 um avec un appareillage de filtration en verre (filtration sous vide). Nous avons récupéré le filtrat dans des flacons propres pour déterminer la teneur totale en cadmium et en plomb dans nos échantillons.

III-5-1-3 Conservation des échantillons

Avant l'analyse, pour la conservation des échantillons conditionnés, ceux-ci sont stockés à une température inférieure à 4 C° et à l'abri de la lumière.

III-5-2 Prétraitement

Les progrès réalisés dans le domaine de l'industrie analytique permettent aujourd'hui

d'accéder à des concentrations de plus en plus faibles, or, la plupart des instruments de mesure requièrent un traitement préalable de l'échantillon. Cette étape fait partie intégrante du protocole analytique.

III-5-2-1 Prétraitement pour les dosages colorimétriques du cadmium

Cette étape a pour but d'augmenter le seuil de détection de cette technique analytique, elle s'agit d'une évaporation contrôlée dont le volume initial de l'échantillon est de 200 ml d'eau, sur lequel est additionné 0,5 ml d'acide chlorhydrique. L'évaporation de la solution se fait sur la plaque chauffante, en évitant de la porter à ébullition pour éviter les pertes. L'évaporation est suivie jusqu'à un volume de 20 ml. Le pH de la solution est amené à 2,8 en présence de bleu de thymol par une solution d'hydroxyde de sodium. Le volume final est ajusté à 25 ml avec de l'eau distillée. La concentration finale est 8 fois supérieure à la concentration initiale (Rodier et al, 1996).

III-5-2-2 Prétraitement pour les dosages par l'absorption atomique

Les échantillons d'eau destinés aux dosages des métaux lourds par l'absorption atomique sont prétraités suivant la méthode ISO 82 88 – 1986 CE qui consiste à concentrer les métaux lourds en solution aqueuse. Pour chaque 100 ml d'eau à analyser, nous avons ajouté 5 ml d'acide chlorhydrique. Le mélange est évaporé avec un évaporateur rotatif (Evaporator E100, Heidolph) à une température inférieure à 100 C⁰ jusqu'à un volume de 15 à 20 ml. Après refroidissement, la solution est filtrée et le volume final est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

III-5-3 Analyse instrumentale

La réalisation des objectifs de ce travail nécessite le dosage précis de la fraction totale de cadmium et de plomb contenus dans nos échantillons. Cela passait par l'application de deux méthodes analytiques pour chaque métal : l'absorption atomique avec flamme (FAAS) et la méthode colorimétrique.

III-5-3-1 L'absorption atomique (SAA)

Ces mesures ont été réalisées sur un spectromètre atomique SAA6200 (figure 27).

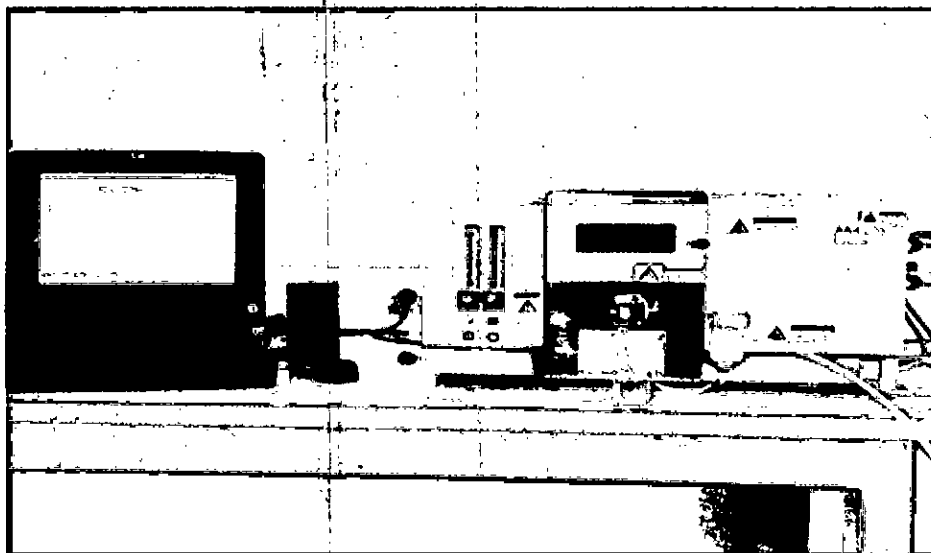


Figure 27 : Spectromètre d'absorption atomique SAA6200.

➤ **Principe :**

La méthode classique de quantification des métaux lourds reste toujours la même : La spectrométrie d'absorption atomique (SAA). L'intérêt majeur de cette méthode est les faibles valeurs des limites de détection. Ces valeurs de détection représentent les valeurs de concentration à partir desquelles une méthode d'analyse permet de certifier la présence d'élément dans un échantillon (Le floch, 2004). La SAA permet de doser des éléments chimiques à l'état de traces (quelque $\mu\text{g.L}^{-1}$). L'absorption de chaque élément est spécifique, aucun autre élément n'absorbe la même longueur d'ondes.

L'échantillon est nébulisé dans une flamme air/ acétylène, qui atomise alors les éléments métalliques. Le rayonnement lumineux spécifique des particules est émis vers la flamme permettant aux atomes d'absorber l'énergie nécessaire pour se trouver à un état excité et émettre une longueur d'onde (λ) d'absorption spécifique. C'est la différence du signal électrique transmis entre les deux faisceaux lumineux qui donneront l'absorbance de l'élément mesuré. Cette absorbance, est selon la loi de Beer- Lambert, fonction de la concentration de l'élément dans la solution. Pour l'analyse de cadmium et de plomb nous avons utilisé une lampe à cathode creuse spécifique pour chaque métal (Audry, 2003).

➤ **Etalonnage**

La spectrométrie d'absorption atomique est une méthode analytique comparative, elle implique un étalonnage externe dont le résultat dépend de la représentativité des étalons par rapport aux échantillons (Rouessac et al, 2000).

Pour chaque métal, des solutions standards à 1000 mg. L⁻¹ de cadmium et de plomb ont été diluées pour établir les droites de calibrations. Les gammes de concentrations choisies correspondent aux concentrations les plus couramment rencontrées dans les échantillons d'eau de boisson (annexe 3 et 4). Ces standards sont préparés de façon identique aux échantillons et des blancs analytiques sont systématiquement passés au début de chaque mesure. IL s'agit de l'eau bi distillée.

➤ **Protocole d'analyse**

L'échantillon est traversé par un faisceau lumineux de longueur d'onde et d'intensité définie, afin de mesurer l'absorbance des minéralisats. Cette absorbance est ensuite reportée sur la courbe d'étalonnage afin de déterminer la concentration. L'appareil affiche la moyenne de trois lectures pour chaque échantillon.

III-5-3-2 Spectrophotomètre d'absorption UV-visible

Ces mesures ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV/VIS (UV/Visible spectrophotomètre, SHIMADZU 1240).

➤ **Principe**

L'origine de l'absorption lumineuse est due à l'interaction des photons avec les espèces de l'échantillon (figure 28). Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie d'un ou de plusieurs électrons de valence se trouve accrue.

L'énergie (E) d'un photon absorbé lors d'une transition entre deux niveaux d'énergie est donnée par la relation $E=h\nu$ ou h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon.

Les calculs de concentration dans le domaine de l'UV/Visible repose sur la loi de Beer-Lambert et constituent la base de la méthode connue sous le terme général de colorimétrie (Rouessac et al, 2000).

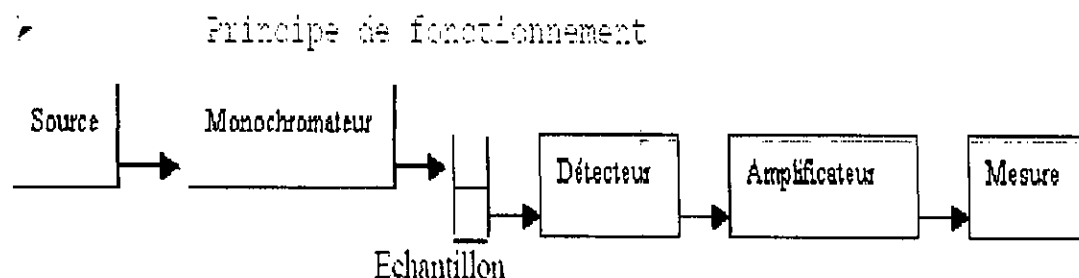


Figure 28 : principe de fonctionnement de l'UV/VIS.

III-5-3-3 Protocole de dosage colorimétrique du cadmium

En solution alcoolique le cadmium donne avec la dithizone(diphénylthiocarbazone) un complexe rouge de dithizonate de cadmium pouvant être extrait avec certains liquides organiques, tels que le chloroforme, dans lesquelles la dithizone en excès peut être enlevée par un lavage à l'aide d'une solution faiblement alcaline. La teinte rouge du dithizonate de cadmium peut être utilisée pour le dosage colorimétrique de ce métal (Lange, 1947; Rodier, 1996).

➤ **Présentation de la méthode**

Toute la verrerie utilisée au cours de ce dosage a été nettoyée à l'acide chlorhydrique dilué au demi et rincée à l'eau distillée.

○ **Etablissement de la courbe d'étalonnage**

Dans une série d'ampoules à décanter de 100 ml, nous avons introduis les quantités de réactifs suivants avec agitation après chaque addition (tableau 8).

Tableau 8 : Quantités des réactifs utilisées (en ml) pour l'établissement de la courbe d'étalonnage du cadmium.

Numéro des ampoules	T	I	II	III	IV	V
Solution étalon du cadmium (1mg/l)	0	2	4	6	8	10
Eau distillée	25	23	21	19	17	15
Correspondance en ug / l du cadmium	0	2	4	6	8	10
Solution de tartrate double de sodium et de potassium (250g/l)	1	1	1	1	1	1
Solution 1d'hydroxyde sodium cyanure de potassium (400g/l)	5	5	5	5	5	5
Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (20%)	1	1	1	1	1	1
Solution de dithizone (10mg/l)	15	15	15	15	15	15

Après agitation une minute, la phase chloroformique a été rapidement décantée dans des ampoules à décanter contenant 25 ml de solution froide d'acide tartrique (20 g/l). Une deuxième extraction a été réalisée par l'addition de 10 ml de chloroforme dans chaque ampoule de la première série avec agitation et décantation de la phase chloroformique dans la deuxième série d'ampoules. La phase chloroformique des ampoules de la deuxième série est ensuite rejetée

après une agitation de deux minutes. Après un lavage de la phase aqueuse avec 5 ml de chloroforme, nous avons ajoutés successivement dans chaque ampoule 0,25 ml de solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (20 %), 15 ml de solution de dithizone à 10 mg / l et 5 ml de solution 2 d'hydroxyde de sodium cyanure de potassium (400 g/l). Les ampoules ont été agitées pendant une minute et la phase chloroformique a été filtrée à travers un coton hydrophile. La lecture spectrophotométrique a été effectuée à 518 nm.

Une droite de régression a ainsi pu être réalisée par le logiciel Excel (Microsoft) à partir des valeurs de DO de la gamme d'étalonnage (annexe 5).

o **Mode opératoire**

Avec un volume de 25 ml de l'eau à analyser nous avons opéré comme pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Les absorbances ont été reportées sur la courbe d'étalonnage, ce qui a permis de déterminer la concentration en cadmium de chaque échantillon.

III-5-3-4 Protocole de dosage colorimétrique de plomb

➤ **Principe**

La dithizone donne avec le plomb en solution faiblement alcaline (pH 8-10) un dithizonate rouge pouvant être extrait à l'aide de solvant organique. Il est possible d'éviter l'action des autres métaux lourds à l'aide de KCN par la formation de cyanures complexes très stables (Lange, 1947).

Le dosage colorimétrique très sensible du plomb par la dithizone fut effectué en première fois par Fischer et al (1933), la méthode a été fortement modifiée par de nombreux auteurs qui en ont confirmé l'utilité.

➤ **Mode opératoire**

Avant d'entamer les dosages, tous les échantillons ont été minéralisés. Pour 2 ml de l'échantillon nous avons ajouté 2 ml de mélange minéralisant (un mélange de 5 volumes d'acide nitrique 65 % et 1 volume d'acide sulfurique).

Dans la fiole du dosage nous avons introduit 1 ml de l'échantillon minéralisé (liquide de minéralisation), 1 ml de citrate d'ammonium et 2 ml de KCN. Le pH est ajusté à 9 à l'aide des gouttes de NH_4OH au 1/3. Parallèlement, une fiole témoin a été préparée de la même façon que la fiole du dosage à l'exception de liquide de minéralisation qui a été remplacé par 1 ml de mélange minéralisant. A l'aide d'une burette, une solution fille de dithizone (diluée à 1 / 40 dans le chloroforme) a été introduite dans la fiole de dosage par fraction de 0,5 ml avec agitation

décantation, jusqu'à l'apparition d'une coloration lilas-violet de la couche chloroformique. Le volume introduit a été enregistré, afin d'ajouter le même volume dans la fiole témoin. Dans la finalité de quantifier la concentration en plomb dans la fiole du dosage, nous avons ajouté un volume suffisant de la solution étalon de plomb (à 2 ug/ ml) dans la fiole témoin à l'aide d'une burette, jusqu'à l'apparition, après agitation et décantation, d'une coloration lilas violet de la phase chloroformique identique à celle du dosage.

La concentration a été calculée en fonction du volume chuté, chaque 1 ml correspond à 2 ug de plomb.

III-6. Evaluation de l'effet des métaux lourds sur le stress oxydant

La troisième partie de ce chapitre présente les techniques de toxicologie appliquées dans notre étude pour évaluer l'effet des métaux lourds sur le stress oxydant des mitochondries et de cytosols hépatiques.

Le foie occupe une place de toute première importance dans la physiologie normale. D'une part le foie synthétise plusieurs types de protéines et enzymes que l'on trouve en circulation et participe activement à pourvoir aux besoins énergétiques de l'organisme, et d'autre part, celui-ci assiste à la détoxification et l'élimination d'agents toxiques. Le foie joue un rôle barrière dans l'organisme car il a un accès immédiat aux substances provenant du tube digestif et véhiculées par la veine porte. Il intervient donc dans le métabolisme de nombreuses molécules et dans l'homéostasie (Brunet, 1999).

Cette position augmente le risque de lésions hépatiques oxydatives dès le premier passage de substances nuisibles, ou après transformation métabolique par le foie de substances non toxiques en métabolites toxiques (Berthoin, 2000).

Les métaux lourds sont des agents toxiques, ils exercent leurs actions délétères par une forte production d'espèces réactives de l'oxygène qui à leur tour induisent un stress oxydant (Brunet, 1999).

Le foie et le rein représentent les principaux organes de fixation des métaux lourds dont le cadmium (Itokawa et al, 1974), la teneur en cadmium dans le foie augmente considérablement et d'une façon concentration dépendante avec la durée de contamination par le chlorure de cadmium (Messaoudi et al, 2002).

L'objectif de cette partie de notre travail, était d'investiguer les effets potentiellement délétères des contaminants métalliques contenus dans l'eau de boisson de la région de Jijel sur les différents marqueurs du stress oxydant d'un modèle biologique de mitochondries et cytosols hépatiques isolées des rats.

La première partie a été réalisée *in vitro*, cette étude nous a permis d'apprécier l'effet d'une large gamme de concentration (de 1 Molaire jusqu'à 10^{-10} Molaire) de chaque métal directement sur des mitochondries et des cytosols hépatiques isolées par la mesure des marqueurs de stress oxydant.

Après avoir caractérisé les effets toxiques des métaux lourds *in vitro*, une étude a été réalisée sur des rats Albinos Wistar pour mieux comprendre les mécanismes d'atteintes mitochondriales et cytosoliques *in vivo*.

III-6-1 Le modèle animal

Le principal avantage de l'expérimentation animale est de reproduire les interactions complexes qui ont lieu dans un organisme vivant. En particulier, dans le domaine de la santé humaine, l'observation des réactions, suite à l'application d'un protocole ou à l'inhalation d'un produit, n'est possible qu'avec un être vivant complet.

Le terme « animal de laboratoire » recouvre les espèces élevées et sélectionnées par des professionnels d'élevage, dans le but d'être soumis à l'expérimentation dans le domaine de la biologie. L'animal dans l'expérimentation, est une variable dont la valeur dépend non seulement de facteurs héréditaires, mais aussi de facteurs du milieu. La majorité des animaux de laboratoire, comme les rongeurs, sont sains, exempts de toute pathologie susceptible d'interférer avec l'expérimentation (Monleau, 2005).

Dans notre cas, le modèle animale choisi est le rat blanc de laboratoire de genre Albinos Wistar provenant de l'institut Pasteur d'Alger (Algérie). Les expériences sont toutes réalisées sur des rats sains, mâles et adultes afin de limiter les facteurs de l'âge, du sexe, des variations hormonales et du stade physiologique (grossesse, maladie,...). Les animaux commandés sont mis en cages traditionnelles huit par huit, avec nourriture (croquette : UAR) et eau à volonté, pesant environ 150 g au début de l'étude. Ils sont pesés en moyenne une fois par semaine et le volume d'eau consommé est mesuré chaque jour. L'ensemble des animaux est acclimaté pendant au minimum deux semaines aux conditions d'hébergement, avec un entretien deux fois par

semaine. L'animalerie est maintenue à des conditions optimales de température et d'hygrométrie.

III-6-1-1 Traitement des animaux

Notre travail a été consacré pour l'étude de l'effet *in vitro* et *in vivo* des métaux lourds choisis comme toxiques de références (le cadmium et le plomb) sur les fonctions mitochondriales et cytosoliques liées aux stress oxydant. Pour la comparaison de cet effet avec celui des oligo-éléments essentiels, nous avons utilisé le zinc pour l'étude *in vitro*.

Les animaux sont repartis en deux groupes : Le premier groupe est consacré pour l'étude *in vitro*, et le deuxième pour l'étude *in vivo*.

➤ L'étude *in vitro*

Dans le but de focaliser notre étude au niveau sub-cellulaire, il nous a paru intéressant de travailler sur un modèle *in vitro* (mitochondrie et cytosol hépatiques) parallèlement à notre étude *in vivo*.

L'utilisation d'un modèle *in vitro* présente plusieurs avantages :

- ❖ Possibilité d'étudier plusieurs conditions expérimentales sur les cellules et/ou les organites sub-cellulaires d'un seul et même individu.
- ❖ Les cellules et/ou organites sub-cellulaires sont généralement plus sensibles aux effets toxiques en absence de mécanismes complexes du métabolisme et de détoxification.

Les animaux utilisés pour ce type d'étude sont des animaux sains et ne reçoivent aucun traitement. Les différentes concentrations du cadmium, du plomb et du zinc (1M, 10^{-2} M, 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M et 10^{-10} M) sont donc mis en contact direct avec la mitochondrie ou le cytosol dans le but d'évaluer leurs effets directs, en absence de toutes transformations gastro-intestinales ou hépatiques lors de l'administration.

➤ L'étude *in vivo*

Dans la mesure où notre étude s'intéresse aux conséquences possibles d'une exposition de la population de la région de Jijel à des doses de métaux lourds qui dépassent largement les normes admises, il nous a paru nécessaire de compléter l'étude *in vitro* par une autre étude *in vivo* réalisées sur un modèle animal vivant.

L'objectif de cette étude est de tester l'effet d'une double contamination de l'eau de boisson consommée par les rats pendant une période de 30 jours par un mélange du plomb et du

cadmium sur la balance anti-pro oxydante. La modalité de contamination est réalisée par ingestion libre d'une eau de boisson naturelle supplémentée des concentrations détectées du cadmium et du plomb dans les échantillons d'eau analysés. Cette voie d'exposition a été choisie afin de respecter la voie de contamination réelle de la population de notre région d'étude ce qui nous donne une meilleure estimation de risques aux quelles cette population est confrontée.

Les animaux utilisés sont repartis en quatre lots de huit rats chacun :

- ❖ **Lot I** : Animaux témoins recevant une eau distillée par voie orale, renouvelée chaque jour pendant la période d'investigation de l'étude.
- ❖ **Lot II** : Animaux recevant par voie orale une dose de 35 ug / l du cadmium et 115 ug / l du plomb dans l'eau de boisson quotidiennement pendant 30 jours.
- ❖ **Lot III** : Animaux recevant par voie orale une dose de 100 ug / l du cadmium et 1 mg / l du plomb dans l'eau de boisson quotidiennement pendant 30 jours.
- ❖ **Lot IV** : Animaux recevant par voie orale une dose de 1 mg / l du cadmium et 5 mg / l du plomb dans l'eau de boisson quotidiennement pendant 30 jours

III-6-1-2 Sacrifice des animaux et prélèvement de foie

Pour l'étude *in vitro* les animaux sont sacrifiés le jour de dosage, concernant les animaux de l'étude *in vivo* les animaux sont sacrifiés après la quatrième semaine d'administration.

Pour éviter que l'anesthésie modifie les mitochondries, les rats sont sacrifiés par assommement. On pratique une laparotomie pour le prélèvement du foie, ce dernier est immédiatement plongé dans un tampon TSE (pH 7,2 à 4C°).

III-6-2 Evaluation de l'activité pro oxydante des métaux lourds sur mitochondries et les cytosols hépatiques

III-6-2-1 Isolement des mitochondries

L'isolement des mitochondries repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle selon la méthode décrite par Rustin et al (1994).

Après le sacrifice, le foie est excisé et refroidi par immersion dans un tampon d'isolement : le TSE (250 mM sucrose, 50 mM tris, 5 mM EGTA, pH 7,2 à 4C°), 10 g sont découpés en petits morceaux toujours dans le tampon TSE, puis, rincées abondamment avec le même tampon pour éliminer le maximum d'hématies. Les particules lavées sont ensuite potérisées dans un potter de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered firm.

New jersey USA) avec 30 ml de TSE, ce qui permet la destruction des cellules et la libération des mitochondries.

L'homogénat récupéré est débarrassé des noyaux et gros débris cellulaires par une première centrifugation à vitesse basse (à 1770 rpm) Pendant 10 mn à 4 C° par une centrifugeuse Sigma model 6 k 15. Le surnageant issu de cette centrifugation est soumis à une deuxième centrifugation à 9600 rpm à 4 C° pendant 10 mn. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans 30 ml du TSE puis centrifugé à 9600 rpm à 4C° pendant 10 mn. Le deuxième culot est suspendu dans 15 ml du tampon TS (250 mM sucrose, 50 mM tris, pH 7,2 à 4 C°) et centrifugé à 4 C° pendant 10 mn à 9600 rpm. Le culot final est constitué des mitochondries, et est subdivisé en deux fractions égales : La première est récupérée dans 200 µl du TS pour obtenir la suspension mitochondriale et la seconde dans 200 µl de la solution hypotonique (25 mM KH₂PO₄; 5 mM MgCl₂, pH 7,2) pour préparer la matrice mitochondriale qui sert à l'étude enzymatique.

III-6-2-2 Dosage des protéines

La détermination de la quantité des protéines dans un homogénat tissulaire peut être réalisée par différentes techniques qui reposent le plus souvent sur le virage colorimétrique du réactif de dosage (le folin-ciocalteu) en fonction de taux de protéines en présence (Lowry et al, 1951).

Pour connaître la concentration des protéines mitochondriales, un dosage a été réalisé selon la méthode décrite par Lowry et al (1951) sur une aliquote des mitochondries. Les intensités de coloration développées sont proportionnelles à la concentration protéique de nos échantillons dont l'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à la longueur d'onde 700 nm. Pour permettre la quantification des protéines mitochondriales une gamme d'étalon est réalisée à l'aide d'une solution d'Albumine Sérique Bovine (SAB) de concentrations connues.

III-6-2-3 Préparation de la matrice mitochondriale

La fraction mitochondriale reprise dans la solution hypotonique est soumise à une série de 6 à 8 congélation- décongélation répétée avec une potérisation accrue et répétée après chaque décongélation, afin d'éclater les mitochondries et libérer les enzymes mitochondriaux. Après une centrifugation de 10 mn de ce mélange à 9600 rpm à 4C°, le surnageant obtenu est utilisé comme source d'enzymes mitochondriaux pour l'évaluation de l'activité enzymatique mitochondriale

(SOD mito, CAT mito,...). La concentration des protéines a été déterminée à partir du surnageant en adoptant la méthode de Lowry et al (1951).

III-6-2-4) Préparation de la fraction cytosolique

Dans la finalité de tester l'effet des métaux lourds sur l'activité des enzymes cytosoliques (SOD cyto, CAT cyto,...), nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal et al (2003).

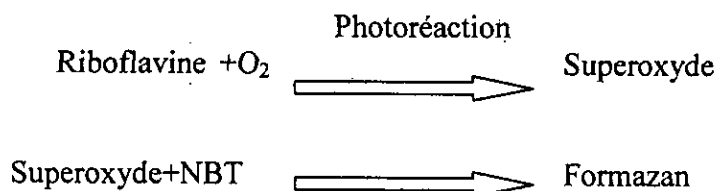
Après le sacrifice d'un rat, un gramme du foie est prélevé et directement plongé dans trois volumes du tampon phosphate (0,1 M à pH 7,2) contenant du KCL à 1,17 %. Après découpage en morceaux fins et homogénéisation à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est ensuite centrifugé à 800 rpm pendant 15 mn à 4 C° pour éliminer les débris nucléaires, le surnageant issu est ensuite centrifugé à 9600 rpm pendant 45 mn à 4 C°. Le surnageant finale est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques.

III-6-2-5 Evaluation de l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes

➤ Détermination de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H₂O₂ ($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O$).

L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de Beauchamp et al (1971). Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitrobleu -tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine selon la réaction 12 :



La réduction du NBT par l'anion superoxyde en Formazan a été suivie à 560 nm avec un spectrophotomètre UV-VIS, selon le protocole suivant :

5µl de la source enzymatique (cytosol ou matrice mitochondriale) sont ajoutés à 2 ml du mélange réactionnel (cyanide de sodium 2×10^{-5} M, solution du NBT $1,76 \times 10^{-4}$ M, EDTA $6,6 \times 10^{-3}$ M, riboflavine 2×10^{-6} M, méthionine 10^{-2} M), puis traités avec 5 µl des différentes

concentrations des substances à tester. Le mélange a été irradié avec une lampe de 15 Watt pendant 10 min.

Le contrôle est préparé en parallèle dans les mêmes conditions mais sans sources enzymatiques. L'absorbance a été mesurée à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI/g de protéines.

Une unité d'activité de la SOD est définie entant que la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50%.

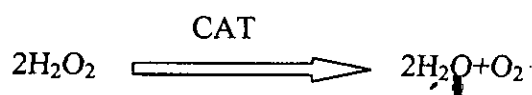
$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{abs du contrôle} - \text{abs de l'essai}) / \text{abs du contrôle}] \cdot 100$$

$$\text{SODUI/ml} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35$$

➤ **Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)**

La CAT réagit efficacement avec H₂O₂ pour donner de l'eau et de l'O₂. Elle existe en forte concentration dans le foie et dans les globules rouges et agit en synergie avec la SOD (Girardi, 2006).

L'activité de la catalase est déminée par la méthode décrite par Clairborne (1985). Cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène du fait de l'activité de la catalase selon la réaction 9 :



On prépare dans une cuve de mesure en quartz de 1 cm d'épaisseur, une solution substrat composée de 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄, 0,1M, pH 7,4), 0,950 ml de H₂O₂ (0,019 M), 0,025 ml de la source enzymatique (matrice mitochondriale ou fraction cytosolique) et uniquement pour l'étude *in vitro* 0,025 ml de différentes concentrations des substances à tester (Pb, Cd ; Zn).

La réaction est suivie par l'enregistrement de l'absorbance à 560 nm chaque minute pendant 2 minutes.

Calcul de l'activité enzymatique :

L'unité enzymatique est exprimée par unité / mg de protéine. Une unité de CAT est calculée selon la formule suivante :

$$\text{U/ mg de protéines} = \frac{2,303}{T} \log \frac{A_1}{A_2} \quad (\text{Clairborne, 1985})$$

Sachant que :

A_1 : Absorbance au temps 0 min.

A_2 : Absorbance après 1 min.

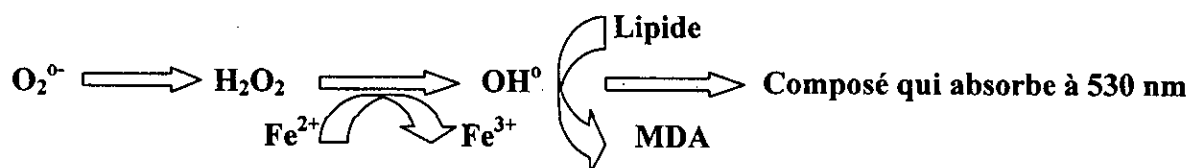
T : Intervalle de temps en min.

III-6-2-6 Mesure de la peroxydation lipidique

a) Mesure du MDA mitochondriale

Les structures lipidiques sont la première cible des ROS, en particulier membranaires, soumises à une peroxydation lipidique. Les lipoperoxydes qui échappent à la détoxification (par voie de conjugaison enzymatique des glutathions Stransférases GST) conduisent à des aldéhydes toxiques, dont le plus connu est le dialdéhyde malonique (MDA), qui résulte de la coupure, médiée par les radicaux libres, des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. La toxicité des aldéhydes est liée à leur forte réactivité vis-à-vis des protéines et des acides nucléiques. La mesure du MDA se révèle donc un excellent marqueur pour étudier l'effet des substances toxiques et permet d'évaluer leur éventuelle toxicité.

Cette mesure est basée sur la formation d'un chromogène rosé à 530 nm, obtenu par complexation d'une molécule du MDA produite par la peroxydation lipidique avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), selon la méthode de Ligeret et al (2004), comme la montre la réaction 13 :



800 μ l de la suspension mitochondriale préparée avec le Na Cl 0,9 % contenant 0,2 mg de protéines / ml (quantité minimale pour obtenir une coloration rose basale dans les conditions contrôlées) déterminée par la méthode de Lowry et al (1951), sont traités pour l'étude *in vitro*, après addition de 100 μ l de Na Cl 0,9 % , par 100 μ l de différentes concentrations des substances à tester (cadmium, plomb et zinc). En parallèle, nous avons préparé un tube témoin et un tube blanc, contenant respectivement 800 μ l de la suspension mitochondriale avec 100 μ l de Na Cl 0,9 % pour le premier et 800 μ l de la suspension mitochondriale avec 200 μ l de Na Cl 0,9 % pour le deuxième. Pour l'étude *in vivo*, nous avons remplacé les substances à tester par 100 μ l de Na Cl 0,9 % dans les tubes de mesure.

Après une incubation de 10 min à 37 C° au bain-marie, nous avons traité le tube témoin par 100 µl de la solution de fer (FeCl₂/ FeCl₃: 500/1500 µM) pour induire la peroxydation lipidique maximale (100 % peroxydation), dont le principe de l'induction est la réaction de Fenton et la formation du radical hydroxyle qui attaque les acides gras polyinsaturés. Un deuxième tube témoin (peroxydation physiologique) a été préparé en parallèle sans addition du fer ni des substances à tester. Tous les tubes sont ensuite remis pour la deuxième fois au bain marie à 37 C° pendant 30 min. Après l'addition de 1 ml de l'acide trichloracétique (TCA), afin de précipiter les protéines susceptibles de fausser le dosage, nous avons réalisé une centrifugation pendant 15 min à 3000 rpm à 20 C°. 1 ml de surnageant issu est incubé 30 min à 95 C° en présence de 1ml de (TBA1%) de mélange TBA- NaOH 2N). Après refroidissement, la mesure se fait à 530 nm et la concentration en MDA est donnée par la formule :

$$[\text{MDA}] \text{ en } \mu\text{M} = \text{D. O}_{530} / 0,0184$$

b) Mesure du MDA cytosolique

La mesure de la peroxydation lipidique au niveau cytosolique a été réalisée selon la méthode d'Okhawa et al (1979) dont le principe est basé sur la réaction qui s'établit, en milieu acide (pH de 2 à 3) et à chaud (à 100 C°), entre une molécule du MDA et deux molécules de TBA qui donne un pigment coloré en rose extractible par le n- butanol et absorbé à 530 nm.

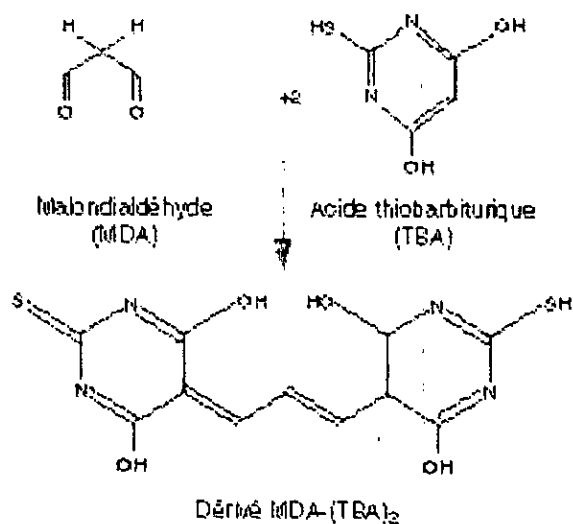


Figure 29 : Réaction du MDA avec les molécules de TBA.

Pour ce dosage, 0,5 ml d'un homogénat préparé à partir de 1 g de foie avec 3 ml de KCl (1,15 %) et broyé par un homogénéisateur de DOUNCE est additionné à 0,5 ml d'acide trichloracétique à 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique à 0,67 %.

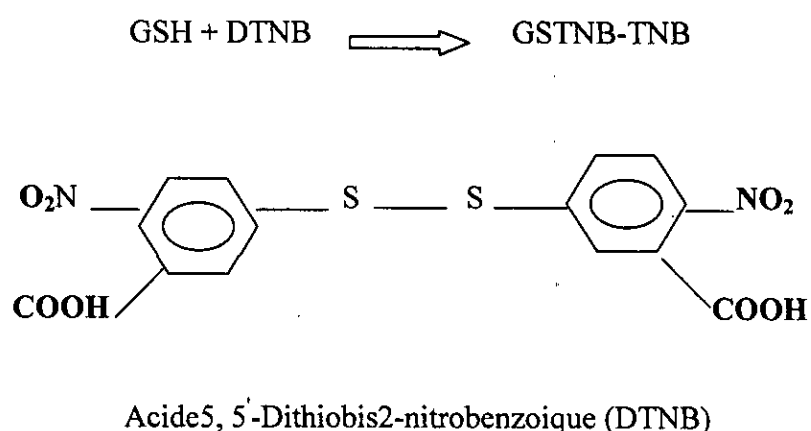
Le mélange est chauffé à 100 C° pendant 15 min, puis additionné, après refroidissement, de 4 ml de n- butanol. Ce mélange est soumis ensuite à une centrifugation de 15 min à 3000 rpm, et la densité optique du surnageant est mesurée à 530nm.

Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions et les résultats sont exprimés en nmol / mg de protéines hépatiques. Le dosage du MDA cytosolique est réalisé chez les lots de rats de l'étude *in vivo*.

III-6-2-7 Dosage du glutathion hépatique : Le biomarqueur hépatique de stress oxydant

Le glutathion ou γ -L-glutamyl-L-cystéinglycine est un tripeptide dont la concentration cellulaire peut atteindre dans certaines cellules animales 5 mM. Grâce à son groupement SH libre, le glutathion constitue le principal antioxydant propre à la cellule.

Pour le dosage du glutathion (GSH) hépatique, nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) par le réactif acide 5, 5'-Dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB). Le principe de la réaction consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction 14 :



Pour cela, 1 g de foie est coupé et homogénéisé avec 3 volumes de l'acide trichloracétique (TCA) (5 %) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. Homogénéisé et centrifugé à 2000 rpm, 50 μ l du surnageant sont ensuite dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH=8). 20 μ l DTNB (0,1 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 min

d'incubation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5 %).

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimés en milimoles de glutathion par gramme de foie.

III-7. Analyse statistique des résultats

Il est difficile, voire impossible d'avoir une bonne vision de la qualité des résultats et de leur interprétation, sans les faire traiter statistiquement.

Dans notre cas, les résultats seront présentés sous forme de moyennes associées aux écarts-types et réunis sous forme de tableaux. Pour les comparaisons des moyennes des concentrations en plomb et en cadmium dans chaque échantillon, des ANOVA ont été réalisées. Le seuil adopté pour ce test est ($p < 0,05$). Pour l'étude toxicologique le test t de Student est utilisé pour évaluer les différences entre le groupe témoin et les groupes traités. Le niveau de signification adopté est supérieur à 0,05 ($p < 0,05$).

- ($p > 0,05$), désigne une différence non significative.
- ($p < 0,05$), désigne une différence significative.
- ($p < 0,01$), désigne une différence très significative.
- ($p < 0,001$), désigne une différence hautement significative.

Chapitre IV :
RESULTATS ET INTERPRETATION

Ce chapitre englobe deux parties : la première présente les résultats des dosages des métaux lourds dans l'eau de boisson consommée par la population de la ville de Jijel. Les résultats de l'étude toxicologique de l'évaluation de l'effet des métaux lourds sur le stress oxydant des mitochondries et cytosols hépatiques sont présentés, puis interprétés dans la deuxième partie.

VI-1. Résultats d'analyses métalliques

La seule forme métallique étudiée dans ce travail, est la fraction totale du cadmium et du plomb contenue dans les échantillons d'eaux obtenus par l'utilisation des deux méthodes d'analyses d'éléments en traces ; la SAA et la méthode colorimétrique. Ces mesures proviennent d'échantillons acidifiés puis filtrés.

VI-1-1 Plomb

Le tableau 9 met en lumière les moyennes et les écarts types des teneurs totales en plomb ($\mu\text{g.l}^{-1}$) obtenues par la méthode colorimétrique à la dithizone ainsi que par l'absorption atomique avec flamme (la SAA). Les prélèvements ont été effectués le 11 avril 2007 (annexe 1) et des mesures tripliquées ont été effectuées pour chaque site.

Tableau 9 : Concentrations moyennes du plomb (en $\mu\text{g/l}$) \pm écarts types mesurées dans les sites retenus.

Site	Normes Alg	Méthode à la dithizone	Absorption atomique
Site 1 : Source de Boucherhour	50 $\mu\text{g/l}$	74,66 \pm 26,72	79,62 \pm 10,38
Site 2 : Puits collectif de Redjla	50 $\mu\text{g/l}$	53,72 \pm 14,29	68,33 \pm 2,28
Site 3 : Forage de l'oued Nil	50 $\mu\text{g/l}$	78,14 \pm 13,43	82,57 \pm 2,08
Site 4 : Source de Bachelot	50 $\mu\text{g/l}$	68,79 \pm 12,84	72,84 \pm 2,33
Eau de citerne en plastique	50 $\mu\text{g/l}$	52,99 \pm 8,78	68,31 \pm 1,19
Eau de citerne en métal	50 $\mu\text{g/l}$	54,06 \pm 13,01	69,79 \pm 1,05
Eau de robinet	50 $\mu\text{g/l}$	38,72 \pm 10,40	38,09 \pm 1,74
Eau de référence I : Eau minéral de Texanna	50 $\mu\text{g/l}$	-	-
Eau de référence II : Eau de Zemzem	50 $\mu\text{g/l}$	-	-

L'analyse de la variance montre l'absence d'une différence significative concernant les teneurs totales en plomb entre les différents sites retenus pour les dosages par la méthode colorimétrique à la dithizone ($F= 1,80, P < 0,169$) (annexe 6). En revanche, les résultats de dosage du plomb par la spectrométrie d'absorption atomique avec la flamme (la SAA) révèlent des différences significatives ($F= 23,016, P < 1,70$) entre les différents échantillons. Ces résultats témoignent la grande sensibilité de la SAA (annexe 6).

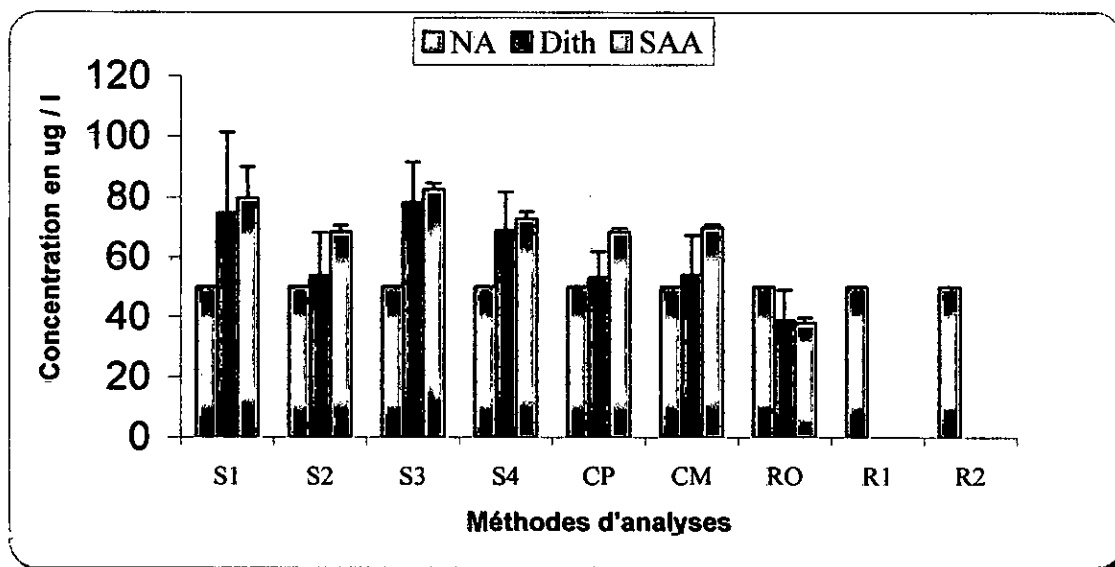


Figure 30 : Concentration moyenne (en ug/l) \pm écart type du plomb contenue dans les eaux des sites retenus. S1 : Source de Boucherchour. S2 : puits de Redjla. S3 : Forage de l'Oued Nil. S4 : source de Bachelot. CP : citerne en plastique. CM : citerne en métal. RO : eau de robinet. R1 : eau de référence de Texanna. R2 : eau de référence de Zemzem. NA : normes algériennes. SM : la spectrométrie moléculaire ; SAA : absorption atomique avec flamme.

Selon les deux méthodes analytiques utilisées, les concentrations en plomb total varient d'un minimum sous le seuil de détection (<10 ug/l pour la SAA) pour les eaux de références (eau minérale de Texanna et eau de Zemzem) et un maximum de $82,57 \mu\text{g.l}^{-1}$ (forage de l'oued Nil). En effet, si on exclut les deux valeurs des eaux de références, la moyenne générale de la teneur en plomb dans tous les échantillons retenus selon la SAA est de $68,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ avec un écart type de 13,45 et selon la méthode colorimétrique est de $60,15 \mu\text{g.l}^{-1}$ avec un écart type de 13,08.

La figure 30 met en exergue une certaine variabilité dans les concentrations en ce métal mesurées par les deux méthodes pour le même site du prélèvement et même entre chaque mesure pour la même méthode analytique (mesures tripliquées pour chaque site) avec une grande ampleur pour la méthode colorimétrique, témoigne de cette différence la grande précision de la

deuxième méthode par rapport à la méthode colorimétrique. Ce constat est particulièrement prononcé pour le cas de puits de Redjla et les eaux de citernes. Les résultats obtenus soulignent aussi que tous les sites retenus sont fortement chargés en cet élément toxique et dépassent de loin les valeurs admissibles préconisées par l'O.M.S et les normes algériennes (tableau 10). Ces taux de non-conformité bien illustrés dans la figure 38 donnent une idée de l'ampleur des niveaux de contamination.

Tableau 10 : Normes pour les maxima admissibles ou recommandés des concentrations du plomb dans l'eau potable (ug/l) (Olive, 2005).

Elément	CEE	O.M.S		Normes algér	U.S.P.H.S.-A.W.W.A ¹	
		Europ	Inter		Limites Recommandées ²	Limites obligatoires ³
Cadmium	50	50	100	50	-	50

1 : Réglementation nationale américaine en matière d'eau potable, dressée par l'Environmental Protection Agency (EPA). (U.S.P.H.S= US Public Health Service). 2 : Limite recommandée par l'A.W.W.A (American Waterworks Association): Si la concentration excède la valeur recommandée, une autre eau ou un autre traitement doivent être envisagé. 3 : Limite imposée par l'A.W.W.A : Si la concentration excède la valeur imposée, une utilisation non alimentaire doit être choisie pour cette eau par les autorités compétentes, car elle représente un danger pour la santé du consommateur. Normes algériennes : NA 6360-1992. CEE : Communauté Economique Européenne.

VI-1-2 Cadmium

Le tableau 11 synthétise les niveaux de contamination en cadmium total mesurés dans les eaux de la source de Boucherchour, le puits de Redjla, le forage de l'oued Nil, la source de Bachelot, les eaux de citernes (en métal et en plastique) et les eaux de robinet respectivement, mesurés par les deux méthodes analytiques ; la méthode spectrométrique et l'absorption atomique avec flamme (la SAA). Les prélèvements ont été effectués le 11 avril 2007 et des mesures tripliquées ont été effectuées pour chaque site.

Les eaux de référence montrent des teneurs en cadmium inférieurs à la limite de détection. Pour la SAA la valeur de cette limite concernant le cadmium correspond à 2 ug / l.

Tableau 11 : Concentrations moyennes du cadmium (en ug/l) ± écarts types mesurées dans les sites retenus.

Site	Normes Alg	Méthode à la dithizone	Absorption atomique
Site 1 : Source de Boucherchour	5 ug /l	21,54±2,38	24,59±0,45
Site 2 : Puits collectif de Redjla	5 ug /l	12,96±2,12	13,69±0,65
Site 3 : Forage de l'oued Nil	5 ug /l	14,05±2,18	14,4±1,13
Site 4 : Source de Bachelot	5 ug /l	17,56±2,78	19,13±0,73
Eau de citerne en plastique	5 ug /l	13,52±1,56	13,93±0,77
Eau de citerne en métal	5 ug /l	12,2±1,35	13,52±0,54
Eau de robinet	5 ug /l	15,2±1,59	20,07±2,67
Eau de référence I : Eau minéral de Texanna	5 ug /l	-	-
Eau de référence II : Eau de Zemzem	5 ug /l	-	-

La comparaison des moyennes obtenues par l'ANOVA concernant les dosages par la spectrométrie moléculaire montre des différences significatives entre les sites concernant la teneur en cadmium total ($F= 5,012$; $P < 0,0061$) (annexe 6). La même constatation est enregistrée pour les dosages par la l'absorption atomique, l'analyse des variances montre des différences significatives entre les différents sites échantillonnés ($F=26,07$; $P < 7, 8128$) (annexe 6).

L'ensemble de résultats obtenus soulignent des teneurs fortement élevées en cadmium total dans tous les sites de prélèvements, géographiquement proche (Boucherchour, Redjla, forage de l'oued Nil et source de Bachelot) qui dépassent de loin la concentration maximale admissible (CMA) recommandée par l'OMS pour l'élément cadmium dans les eaux d'alimentation (tableau 12).

Tableau 12 : Normes pour les maxima admissibles ou recommandés des concentrations du cadmium dans l'eau potable (ug/l) (Olive, 2005).

Elément	CEE	O.M.S		Normes algér,	U.S.P.H.S.-A.W.W.A ¹	
		Europ	Inter		Limites Recommandées ²	Limites obligatoires ³
Cadmium	5	10	10	10	-	10

1 : Réglementation nationale américaine en matière d'eau potable, dressée par l'Environmental Protection Agency (EPA). (U.S.P.H.S= US Public Health Service). 2 : Limite recommandée par l'A.W.W.A (American Waterworks Association): Si la concentration excède la valeur recommandée, une autre eau ou un autre traitement doivent être envisagé. 3 : Limite imposée par l'A.W.W.A : Si la concentration excède la valeur imposée, une utilisation non alimentaire doit être choisie pour cette eau par les autorités compétentes, car elle représente un danger pour la santé du consommateur. Normes algériennes : NA 6360-1992. CEE : Communauté Economique Européenne.

En effet, la valeur maximale du cadmium est enregistrée au niveau de la source de Boucherchour avec une moyenne de 24,59 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et un écart type de 0,45. A l'exception des eaux de références, la moyenne générale des concentrations en cadmium est de 19,05 $\mu\text{g.l}^{-1}$ avec un écart type de 3,55 pour les mesures par la SAA et de 15,25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ avec un écart type de 3,04 pour les mesures par la méthode spectrométrique.

La charge maximale pour les mesures par la spectrométrie moléculaire est de l'ordre de 21,54 $\pm 2,38 \mu\text{g.l}^{-1}$ enregistré au niveau de la source de Boucherchour et la charge minimale est de l'ordre de 12,96 $\pm 2,12 \mu\text{g.l}^{-1}$ enregistrée au niveau de puits de Redjla.

Comme pour les résultats obtenus par la spectrométrie moléculaire, et au-delà de simples variations de concentrations observées entre les deux méthodes analytiques qui confirme la grande sensibilité de la spectrométrie d'absorption atomique, tous les sites montrent des teneurs très importantes, voire dangereuses en ce métal toxique qui dépassent de 3 à 5 fois la valeur admissible préconisée par l'OMS pour les eaux de boisson. L'histogramme de la figure 31 illustre bien l'ampleur de cette contamination.

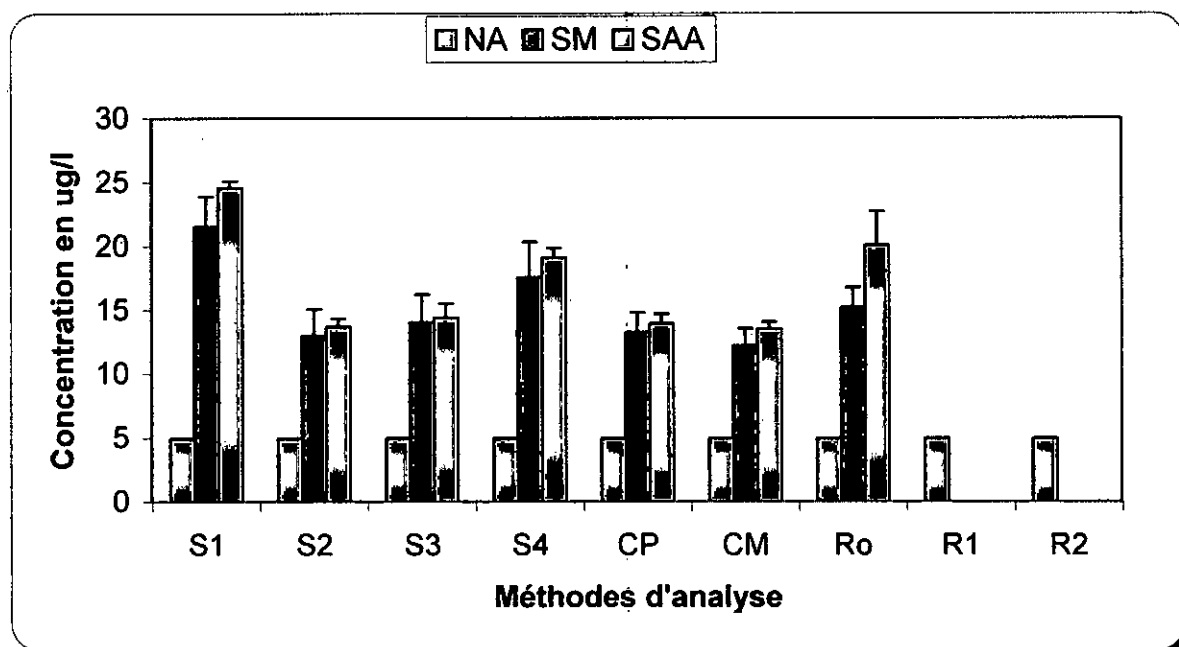


Figure 31 : Concentration moyenne (en ug/l) \pm écart type du cadmium contenu dans les eaux des sites retenus. S1 : source de Boucherchour. S2 : puits de Redjla. S3 : forage de l'oued Nil. S4 : source de Bachelot. CP : citerne en plastique. CM : citerne en métal. RO : eau de robinet. R1 : eau de référence de Texanna. R2 : eau de référence de Zemzem. NA : normes algériennes. SM : la spectrométrie moléculaire ; SAA : absorption atomique avec flamme.

VI-2. Synthèse des résultats de l'étude toxicologique

Aux vues des résultats concernant les dosages du cadmium et du plomb dans les échantillons d'eaux analysés, il est envisagé d'étudier l'effet de ces métaux toxique sur les organismes modèles exposés en mitochondries et cytosols hépatiques. Dans le cadre de cette problématique, nous avons réalisé le suivi des différents paramètres de stress oxydatif.

Les résultats de cette analyse toxicologique sont synthétisés dans des tableaux et des histogrammes et commentés sous formes de paragraphes suivants.

VI-2-1 Variations *in vitro* de l'activité antioxydante enzymatique

Les profils de réponses des antioxydants enzymatiques étudiés (SOD et CAT) ont été caractérisés suite à l'exposition aux différentes concentrations du plomb, du cadmium et du zinc, et sont représentés sous formes de tableaux.

VI-2-1-1 Variations *in vitro* de l'activité enzymatique de la SOD

Il existe principalement deux isoformes de SOD, une isoforme mitochondriale (Mn SOD) dont l'activité nécessite la présence de manganèse et une isoforme cytosolique (Cu/Zn SOD) dont l'activité nécessite la présence de cuivre et de zinc. Les variations de l'activité enzymatique de ces deux isoformes en fonction de différentes concentrations molaires de trois métaux étudiés dans nos échantillons hépatiques sont récapitulées sous forme de moyennes et écart types dans le tableau 13.

Tableau 13 : Variation de l'activité enzymatique de la SOD (UI/mg de protéines) mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations des métaux lourds *in vitro*.

		Concentration molaire des métaux					
		Métaux	1M	10 ⁻² M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M
SOD cytosolique (UI/mg de protéines)	Plomb	667,15 ± 95,17 ***	475,08 ± 63,70 ***	451,71 ± 61,08 **	352,83 ± 59,97 *	273,50 ± 45,90 ns	197,71 ± 80,09 ns
	Cadmium	634,91 ± 148,16 ***	420,07 ± 83,57 ***	365,49 ± 61,38 ***	345,08 ± 68,34 **	310,64 ± 101,95 ns	166,35 ± 37,63 ns
	Zinc	1310,91 ± 191,49 ***	401,44 ± 146,45 **	66,46 ± 53,51 ns	94,01 ± 41,88 ns	349,09 ± 93,64 *	624,23 ± 96,35 ***
SOD mitochondriale (UI/mg de protéines)	Plomb	353,20 ± 95,20 ***	244,04 ± 112,25 **	220,56 ± 119,95 **	160,66 ± 64,13 *	89,08 ± 47,21 ns	89,08 ± 51,79 ns
	Cadmium	395,52 ± 87,31 ***	315,45 ± 106,11 ***	279,91 ± 93,20 **	165,25 ± 97,28 **	109,12 ± 45,01 ns	59,30 ± 23,19 ns
	Zinc	642,90 ± 354,32 ***	255,40 ± 95,10 ***	33,25 ± 22,24 ns	216,38 ± 144,65 *	271,94 ± 151,74 **	320,89 ± 144,45 **

Témoin SOD cytosolique : 148,64 ± 56,41 UI/mg de protéines.

Témoin SOD mitochondriale : 107,5 ± 82,04 UI/mg de protéines.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, n=5 dans chaque groupe. Test Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0,05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,001$).

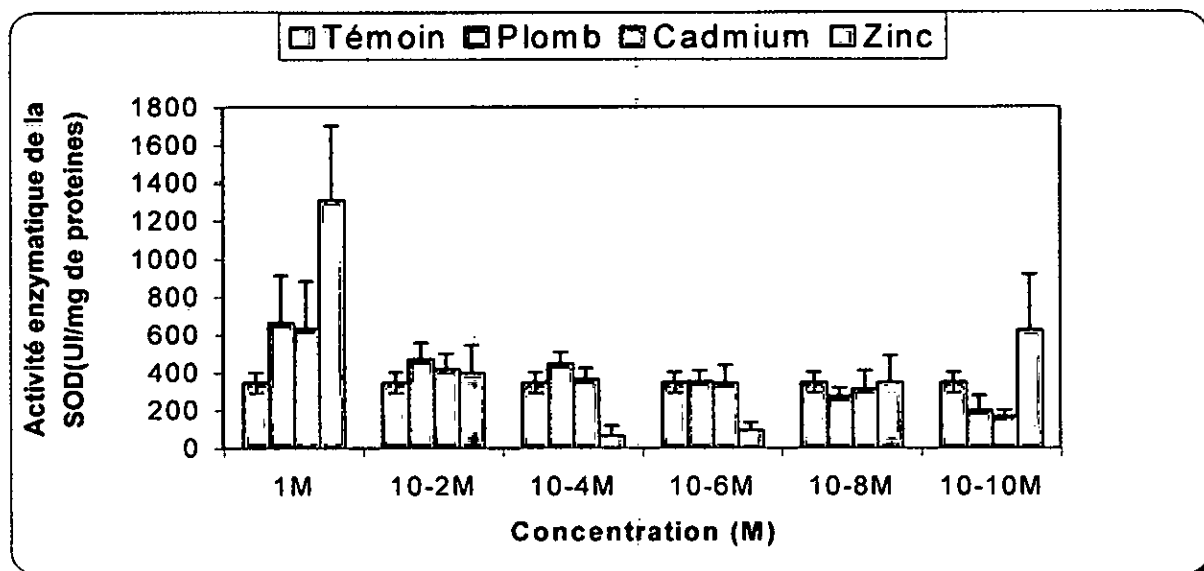


Figure 32 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc *in vitro*.

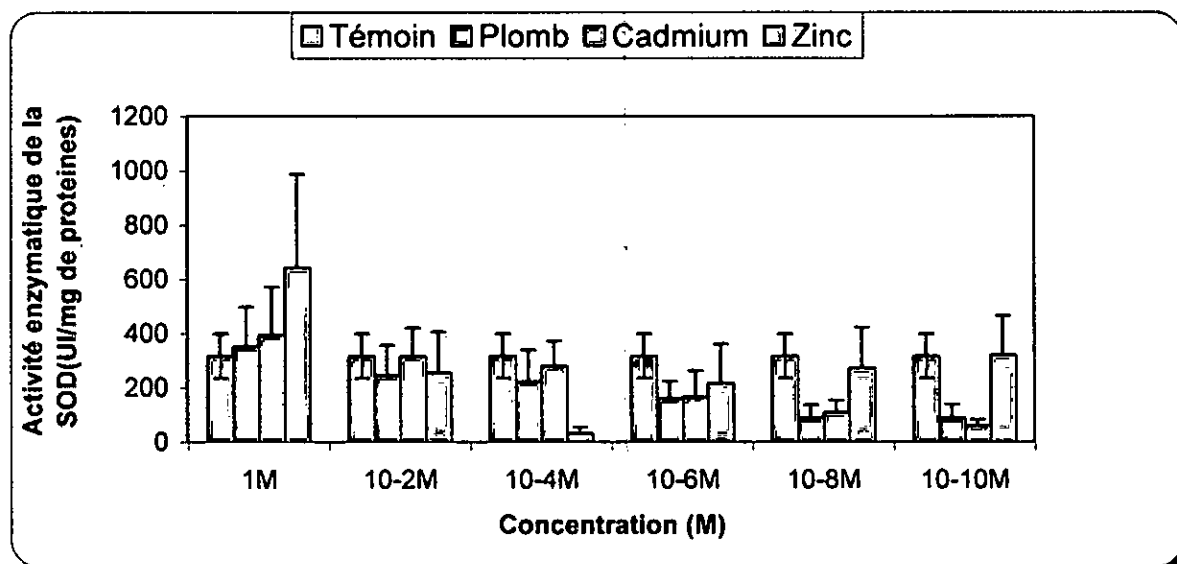


Figure 33: Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc *in vitro*.

On constate que le plomb entraîne une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique de la Cu/Zn SOD aux concentrations 1M et 10^{-2} M, cette augmentation atteint des seuils très significatifs avec la concentration de 10^{-4} M et significatifs avec la concentration 10^{-6} M. Les très faibles concentrations (10^{-8} M, 10^{-10} M) ne montrent aucune augmentation significative. De même pour la Mn-SOD, on constate une augmentation hautement significative ($P < 0,001$) à la concentration 1M, très significative aux concentrations 10^{-2} M et 10^{-4} M, significative à la concentration 10^{-6} M et enfin non significative avec les concentrations 10^{-8} M et 10^{-10} M. L'ajout du cadmium à nos extraits de mitochondries et de cytosols hépatiques entraîne une augmentation hautement significative ($P < 0,001$) de l'activité enzymatique des deux isoformes de la SOD, la Cu/Zn-SOD et la Mn-SOD par rapport au témoin, cette activité est corrélée positivement avec les concentrations ajoutées, elle augmente hautement significativement ($P < 0,001$) avec les concentrations 1M, 10^{-2} M et 10^{-4} M, très significativement avec la concentration 10^{-6} M et non significativement avec les concentrations 10^{-8} M et 10^{-10} M.

L'ajout du zinc à nos extraits montre une réponse relativement différente. L'ajout de 1M et 10^{-2} M du zinc entraîne une augmentation hautement significative ($P < 0,001$) de l'activité enzymatique des deux isoformes de la SOD, alors que les concentrations de 10^{-4} M et 10^{-6} M ne montrant aucun effet significatif sur cette activité, l'ajout des plus faibles concentrations (10^{-8} M, 10^{-10} M) montre cependant une augmentation très significative pour la Mn-SOD et hautement significative pour la Cu/Zn-SOD.

VI-2-1-2 Variations *in vitro* de l'activité enzymatique de la CAT

Les variations de l'activité enzymatiques de la CAT cytosolique et mitochondriale hépatique en présence de différentes concentrations molaires du cadmium, du plomb et du zinc *in vitro* sont présentées dans le tableau 14.

Tableau 14: Variation de l'activité enzymatique de la CAT (UI/mg de protéines) mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations des métaux lourds *in vitro*.

		Concentration molaire des métaux					
		Métaux	1M	10 ⁻² M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M
CAT cytosolique (UI/mg de protéines)	Plomb	234,82 ± 110,96 ***	361,87 ± 118,98 ***	567,63 ± 98,88 ***	676,36 ± 95,17 ***	1040,61 ± 210,87 **	1353,22 ± 696,90 ns
	Cadmium	247,99 ± 83,46 ***	347,76 ± 99,61 ***	537,11 ± 101,08 ***	613,32 ± 221,97 **	744,19 ± 157,54 **	1249,88 ± 414,95 ns
	Zinc	181,99 ± 70,40 ***	301,60 ± 71,41 ***	894,99 ± 327,36 *	1078,42 ± 259,26 *	530,53 ± 44,30 ***	586,10 ± 160,36 **
CAT mitochondriale (UI/mg de protéines)	Plomb	135,97 ± 33,11 ***	302,47 ± 51,35 ***	449,11 ± 141,29 ***	628,48 ± 54,38 ***	932,27 ± 243,39 *	1269,17 ± 512,83 ns
	Cadmium	144,58 ± 82,58 ***	206 ± 180,79 ***	243,20 ± 89 ***	469,9 ± 154,25 **	844,12 ± 257,97 **	1575,47 ± 971,47 ns
	Zinc	168,37 ± 47,42 ***	289,38 ± 99,70 ***	693,65 ± 135,99 **	988,13 ± 257,77 ns	377,79 ± 171,12 **	317,72 ± 196,76 **

Témoin CAT cytosolique : 1894,98 ± 582,96 UI/mg de protéines.

Témoin CAT mitochondriale : 1511,3 ± 463,78 UI/mg de protéines.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, n=5 dans chaque groupe. Test Student : (ns) désigne un effet non significatif (p>0,05), (*) désigne un effet significatif (p<0,05). (**) désigne un effet très significatif (p <0,01), (***) désigne un effet hautement significatif (p< 0,001).

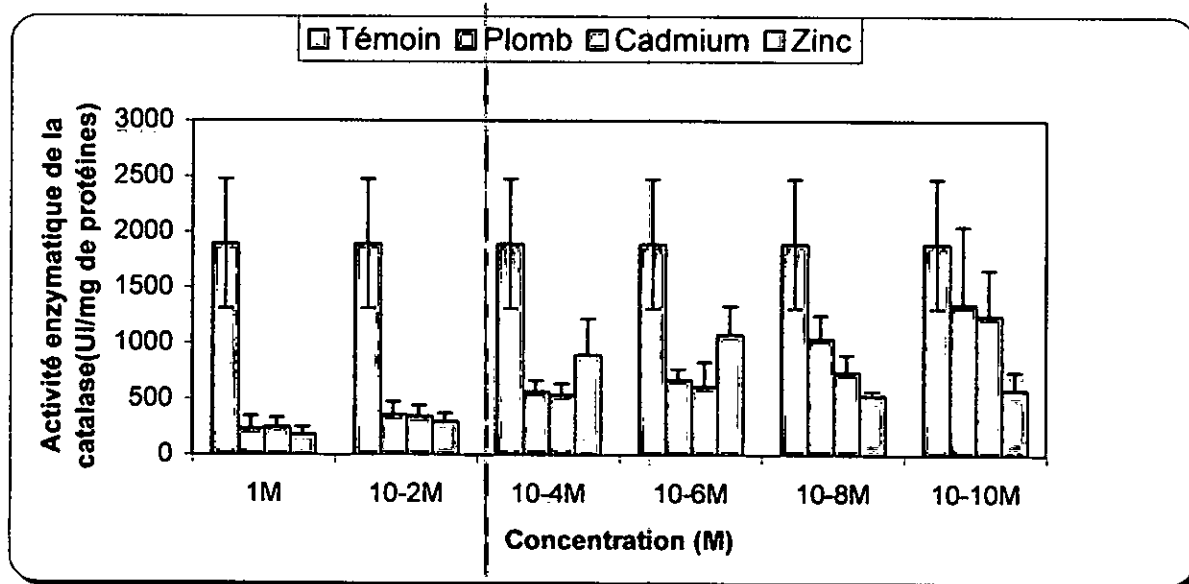


Figure 34 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc *in vitro*.

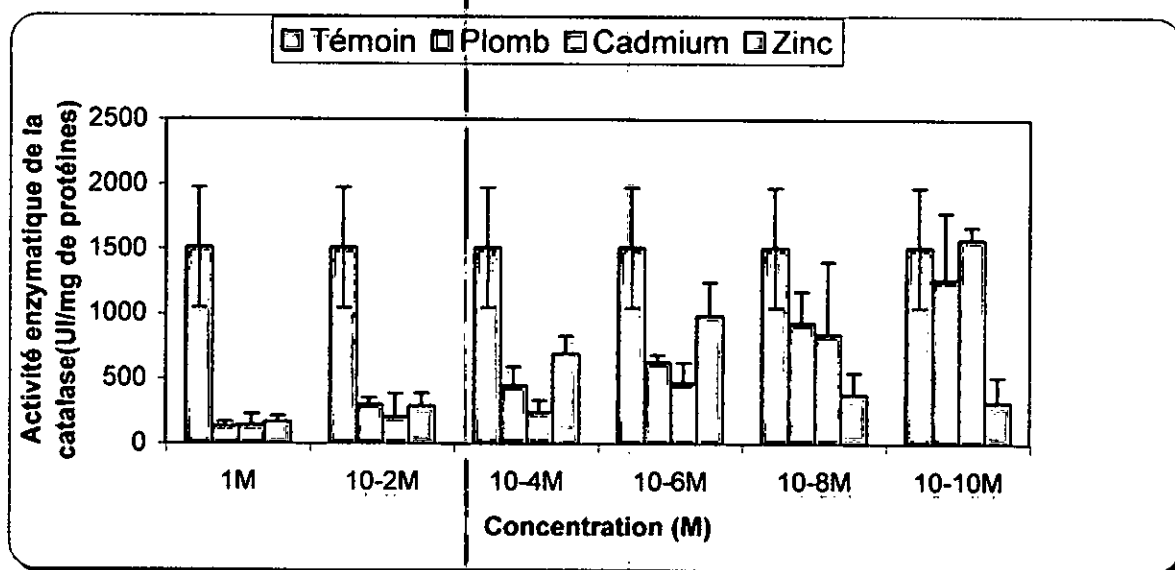


Figure 35 : Variation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique (UI/mg de protéines) en présence de différentes concentrations molaires de métaux étudiés : plomb, cadmium et zinc *in vitro*.

Les résultats ci-dessous montrent que l'activité enzymatique de la catalase a été réduite en présence de métaux. Les figures 33 et 34 illustrent que l'ajout de concentrations croissantes du plomb et du cadmium aux extraits de cytosols et de mitochondries hépatiques entraîne une diminution hautement significative de l'activité enzymatique de la catalase. L'activité enzymatique de la catalase cytosolique montre une diminution hautement significative en présence des concentrations 1M, 10^{-2} M, 10^{-4} M, 10^{-6} M, et très significative en présence de 10^{-8} M, la concentration 10^{-10} M ne montre cependant aucun effet significatif. L'activité enzymatique de la catalase mitochondriale répond de la même façon en présence de différentes concentrations du plomb. On constate que l'ajout du cadmium présente un effet comparable à celui du plomb, en effet l'activité enzymatique de la catalase est inversement corrélée avec la concentration ajoutée, les plus fortes concentrations en cadmium (1M, 10^{-2} M, 10^{-4} M) entraînent une réduction hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité de la CAT cytosolique et mitochondriale. Cette réduction atteint des seuils très significatifs avec les concentrations 10^{-6} M et 10^{-8} M mais non significatifs avec la plus faible concentration (10^{-10} M). Pour le zinc, l'ajout de 1M, 10^{-2} M respectivement à nos extraits de cytosols et de mitochondries hépatiques montre une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de l'activité enzymatique. Cette diminution n'est que significative avec les concentrations 10^{-4} M et 10^{-6} M pour les extraits de cytosols et non significative avec la concentration de 10^{-6} M pour les extraits de mitochondries.

VI-2- 2 Variations *in vitro* de la peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés sont particulièrement sensibles aux peroxydations. Les doubles liaisons sont des points réactifs dans la chaîne moléculaire et le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) est une excellente méthode permettant d'évaluer avec simplicité et rapidité le degré de peroxydation des lipides.

Les teneurs enregistrées (tableau 15) pour les molécules du MDA réagissant avec l'acide thiobarbiturique en présence du plomb et du cadmium, indiquent que celles-ci sont corrélées positivement avec l'ajout de doses croissantes de ces deux métaux. L'incubation des mitochondries hépatiques de rat avec 1M du plomb conduit à une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de la peroxydation lipidique des membranes mitochondriales par comparaison au mitochondries seules (peroxydation physiologique), en présence de 10^{-2} M cette augmentation est très significative et significative en présence de 10^{-4} M, 10^{-6} M et 10^{-8} M, alors

qu'en présence de 10^{-10} M la peroxydation lipidique ne montre pas une augmentation significative ($p > 0,05$). De même, il est à noter que le taux du MDA issu de la peroxydation lipidiques des membranes des mitochondries en présence de 1M du plomb est plus important de façon très significative à celui issu de la peroxydation lipidique des membranes mitochondriales induite par le Fe^{2+} / Fe^{3+} , les autres concentrations par contre montrent des taux du MDA moins important. Le tableau 15 met en lumière également une surproduction hautement significative du MAD issu de la peroxydation lipidique induite par 1M et 10^{-2} M du cadmium en comparaison aux mitochondries témoins, cette surproduction est aussi hautement significative par rapport au peroxydation lipidique induite par le fer. Une augmentation très significative du taux du MDA est enregistrée en présence de 10^{-4} M, et 10^{-6} M du cadmium, alors qu'une augmentation non significative est remarquée en présence de 10^{-10} M du cadmium. L'incubation des mitochondries avec les différentes concentrations du zinc présente une toxicité beaucoup moins importante par comparaison au plomb et au cadmium. En effet 1M du cadmium provoque une production de 63,79 nmoles/mg de protéines du MDA alors que 1M du zinc ne donne que 13,66 nmoles/mg de protéines. Si on exclut les plus fortes concentrations en zinc (1M et 10^{-2} M) qui donnent respectivement une augmentation très significative et significative du taux du MDA, les autres concentrations ne montrant aucune augmentation significative.

Tableau 15 : Variations des taux du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines) généré suite à une peroxydation lipidique induite *in vitro* par le plomb, le cadmium et le zinc.

		Concentration molaire des métaux					
		Métaux	1M	10^{-2} M	10^{-4} M	10^{-6} M	10^{-8} M
Concentration du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines)	Plomb	42,55	9,98	7,08	6,17	5,62	5,33
		±	±	±	±	±	±
		4,09	1,84	1,53	1,23	1,08	1,82
			***	**	*	*	ns
	Cadmium	63,79	15,4	8,04	7,65	6,21	5,89
		±	±	±	±	±	±
		7,19	1,70	1,31	1,25	1,36	2,28
			***	**	**	*	ns
	Zinc	13,66	6,87	5,61	5,10	5,03	4,59
±		±	±	±	±	±	
2,22		1,85	2,10	2,77	2,83	2,67	
		**	*	ns	ns	ns	

Témoin 1 : peroxydation induite par le fer = $21,52 \pm 5,22$ nmoles/mg de protéines. Témoin 2 : peroxydation physiologique = 1,94 nmoles/mg de protéines.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type, n=5 dans chaque groupe. Test Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0,05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,001$).

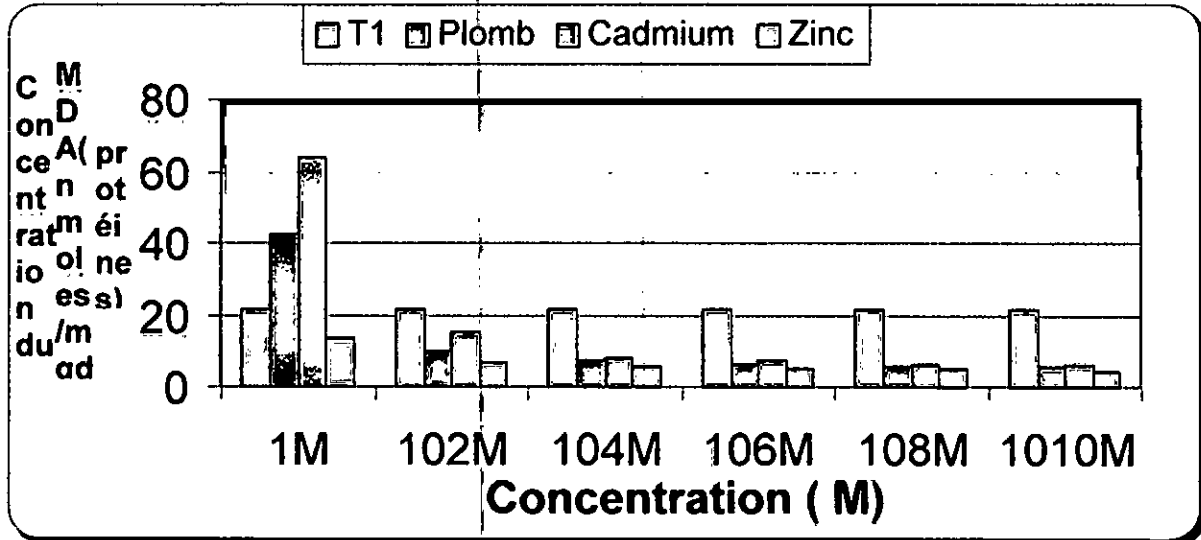


Figure 36: Variations des taux du MDA mitochondrial (nmol/mg de protéines) généré suite à la peroxydation lipidique induite *in vitro* par le fer pour le témoin et par les différentes concentrations molaires des métaux étudiés pour les extraits traités.

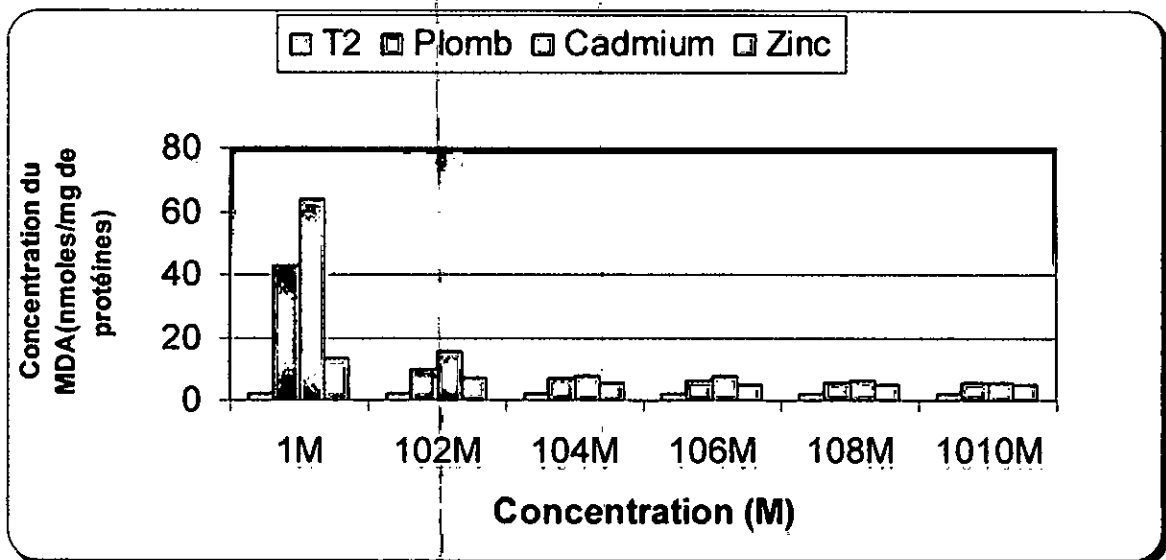


Figure 37 : Variations des taux du MDA mitochondrial (nmol/mg de protéines) généré suite à la peroxydation lipidique physiologique pour le témoin et par les différentes concentrations molaires des métaux étudiés pour les extraits traités.

VI-2-3 Variations *in vivo* de l'activité antioxydante enzymatique

VI-2-3-1 Variations *in vivo* de l'activité enzymatique de la SOD

Le tableau 16 représente les variations de l'activité enzymatiques de la Cu/Zn-SOD et Mn-SOD hépatique suite à une exposition de 30 jours des rats à une contamination polymétallique en plomb et en cadmium dans les eaux de boisson. Chaque rat consomme en moyen 30 ml de l'eau contaminée par jour.

Tableau 16 : Variations de l'activité enzymatique de Cu/Zn-SOD et Mn-SOD hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par les différentes concentrations du mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson.

	Lot témoin	Lot 1 : 35ug/l Cd + 150ug/l Pb	Lot2 : 100ug/l Cd + 1mg/l Pb	Lot3 : 1mg/l Cd + 5mg/l Pb
SOD cytosolique (UI/ mg de protéines)	323,24 ± 104,50	504,76 ± 60,24 *	796,59 ± 104,18 **	958,90 ± 68,48 ***
SOD mitochondriale (UI/ mg de protéines)	240,95 ± 98,42	395,74 ± 82,14 ns	639,26 ± 64,89 ***	850,72 ± 112,4 ***

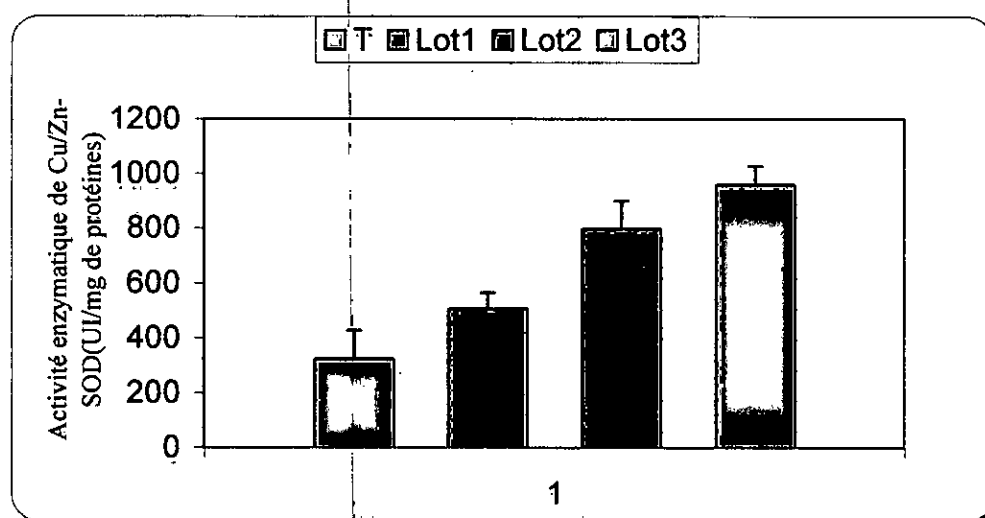


Figure 38 : Variations de l'activité enzymatique de Cu/Zn-SOD hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du

cadmium dans l'eau de boisson. T : lot témoin, Lot1 : 35ug/l Cd+100ug/l Pb. Lot2 : 100ug/l Cd+1mg/l Pb. Lot3: 1mg/l Cd+5mg/lPb.

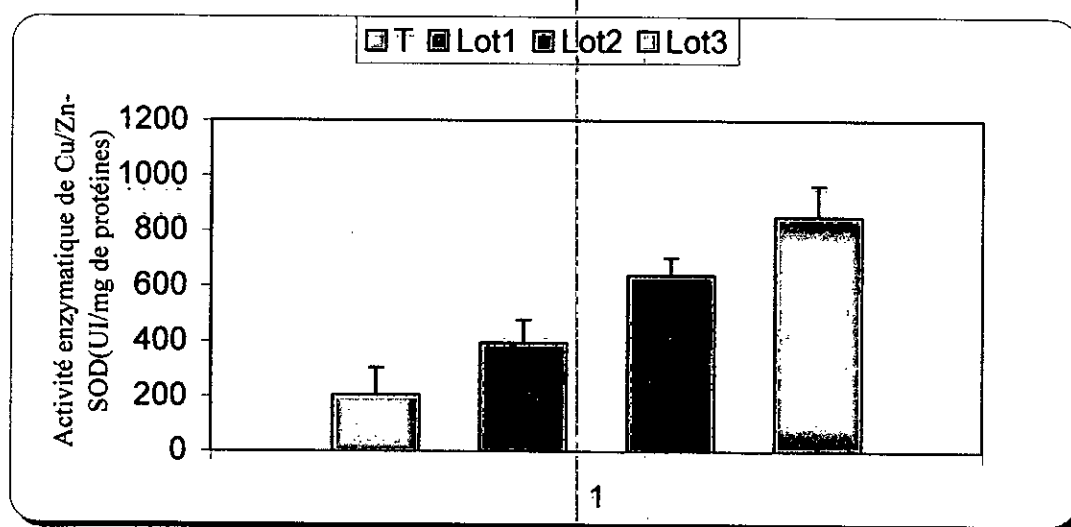


Figure 39 : Variations de l'activité enzymatique de Mn-SOD hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson. T : lot témoin , Lot1 : 35ug/l Cd+100ug/l Pb. Lot2 : 100ug/l Cd+1mg/l Pb. Lot3: 1mg/l Cd+5mg/lPb.

Les différentes analyses menées à ce sens ont permis de montrer que, sur la période d'exposition investiguée, la concentration cytosolique en SOD augmente d'une manière hautement significative ($p < 0,001$) chez les rats consommant une eau contaminée par 1mg/l du cadmium+5 mg/l du plomb. Une augmentation très significative est enregistrée chez les rats recevant une eau contaminée par 100 ug/l du cadmium+ 1mg/l du plomb, alors que l'augmentation de cette activité est non significative chez les rats de troisième lot recevant une eau contaminée par 35 ug/l du cadmium +100 ug/l du plomb en comparaison avec les rats témoins recevant pour la même période d'exposition une eau distillée. On constate également, une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) des concentrations mitochondriales en cette enzyme chez les rats recevant une eau contaminée par le mélange de 1mg/l Cd+ 5 mg/l Pb et l'eau contaminée par le mélange 100 ug/l Cd + 1 mg/l Pb respectivement. L'activité enzymatique de la Mn-SOD ne montre cependant aucun effet significatif chez les rats recevant une eau contaminée par 35 ug/l Cd + 100 ug/l Pb.

VI-2-3-2 Variations *in vivo* de l'activité enzymatique antioxydante de la CAT

Les variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatique après une exposition subchronique des rats à une contamination polymétallique en plomb et en cadmium dans les eaux de boisson sont présentées dans le tableau 29.

Tableau 17 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par les différentes concentrations du mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson.

	Lot témoin	Lot 1 : 35ug/l Cd + 150ug/l Pb	Lot2 : 100ug/l Cd + 1mg/l Pb	Lot3 : 1mg/l Cd + 5mg/l Pb
CAT cytosolique (UI/mg de protéines)	1651,24 ± 524,15	928,68 ± 198,72 **	405,56 ± 108,51 ***	166,25 ± 55,85 ***
CAT mitochondriale (UI/ mg de protéines)	1082,01 ± 235,59	704,20 ± 82,14 **	430,13 ± 125,23 **	161,73 ± 85,27 ***

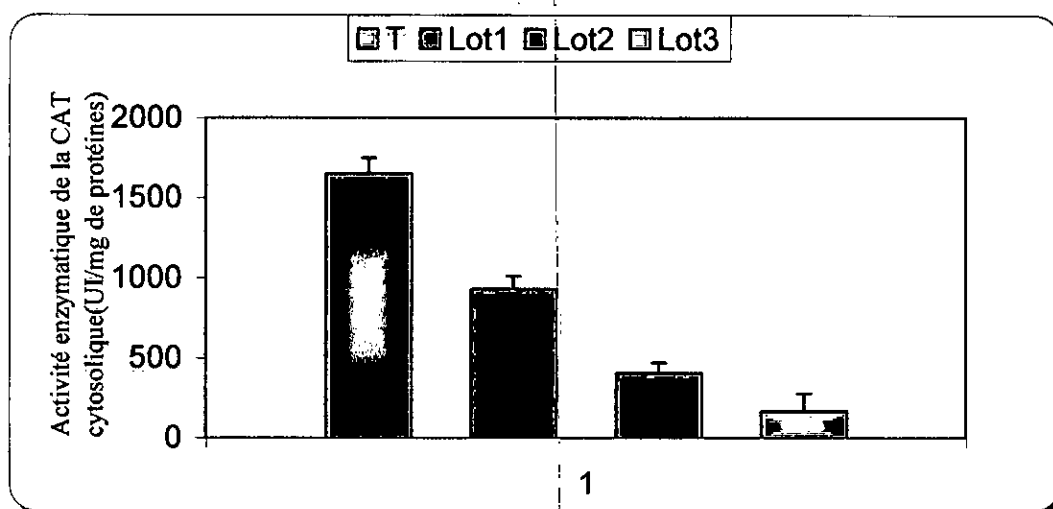


Figure 40 : Variations de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson. T : lot témoin , Lot1 : 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb. Lot2 : 100 ug/l Cd+1 mg/l Pb. Lot3: 1 mg/l Cd+5 mg/lPb.

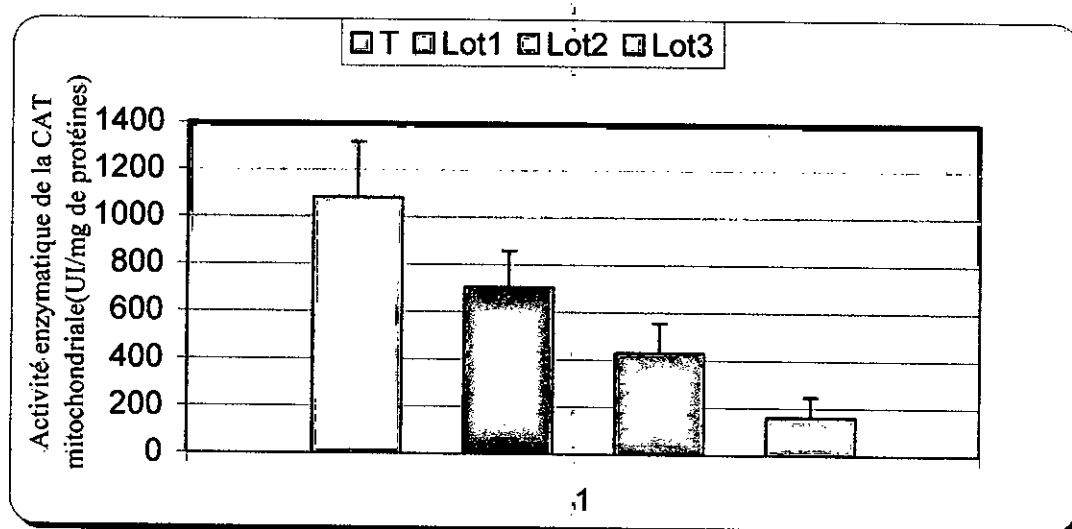


Figure 41 : Variations de l'activité enzymatique de la CAT mitochondriale hépatique (UI/ mg de protéines) des rats après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson. T : lot témoin , Lot1 : 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb. Lot2 : 100 ug/l Cd+1mg/l Pb. Lot3: 1 mg/l Cd+5mg/lPb.

A partir des résultats présentés dans le tableau 17 on constate que l'activité enzymatique de la catalase cytosolique diminue très significativement chez les rats de premier lot recevant une eau contaminée par 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb pendant 30 jours en comparaison avec les rats de lot témoin recevant pour la même période de l'eau distillée. Cette diminution est estimée hautement significative avec les rats recevant respectivement des eaux contaminées par 100 ug/l Cd+1 mg/l Pb et par 1 mg/l Cd et 5 mg/l Pb. La même constatation est observée concernant l'activité enzymatique de la CAT mitochondriale qui enregistre une diminution très significative chez les rats recevant des eaux contaminées par 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb et 100ug/l Cd+1 mg/l Pb respectivement et hautement significative chez les rats recevant une eau contaminée par 1mg/l Cd et 5mg/l Pb.

VI-2-4 Variations *in vivo* de la peroxydation lipidique

Les variations de taux du MDA cytosolique et mitochondriale suite à une exposition des rats à une contamination polymétallique en plomb et en cadmium dans les eaux de boisson pendant 30 jours sont présentées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Variations des taux du MDA cytosolique (nmoles/g de foie) et mitochondrial (nmoles/mg de protéines) après administration de différentes concentrations des associations du plomb et du cadmium pendant 30 jours dans l'eau de boisson.

	Lot témoin	Lot 1 : 35ug/l Cd + 150ug/l Pb	Lot2 : 100ug/l Cd + 1mg/l Pb	Lot3 : 1mg/l Cd + 5mg/l Pb
Concentration du MDA cytosolique (nmoles/g de foie)	3,96 ± 3,62	12,82 ± 2,39 *	21,35 ± 4,18 **	23,18 ± 6,14 ***
Concentration du MDA mitochondriale (nmoles/mg de protéines)	1,94 ± 1,48	5,39 ± 1,77 ns	7,24 ± 2,03 *	14,39 ± 4,35 ***

Témoin : peroxydation induite par le fer = 17,56 ± 0,73 nmoles/mg de protéines. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, n=8 dans chaque groupe. Test Student : (ns) désigne un effet non significatif (p>0,05), (*) désigne un effet significatif (p<0,05). (**) désigne un effet très significatif (p<0,01), (***) désigne un effet hautement significatif (p<0,001).



Figure 42 : Variations des taux de MDA cytosolique (nmoles/g de foie) après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson. T : lot témoin, Lot1 : 35ug/l Cd+100ug/l Pb. Lot2 : 100ug/l Cd+1mg/l Pb. Lot3 : 1mg/l Cd+5mg/l Pb.

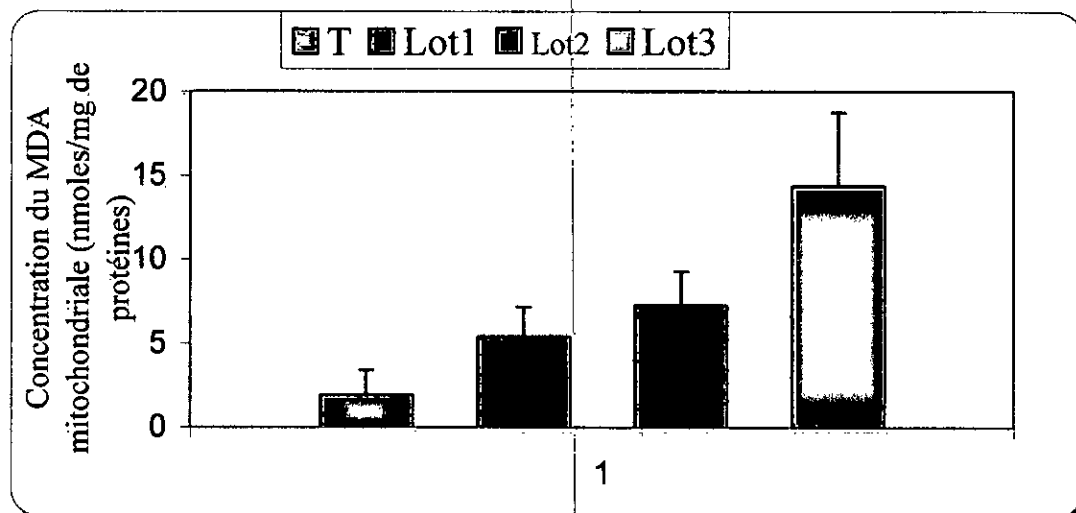


Figure 43 : Variations des taux de MDA mitochondriale (nmoles/mg de protéines) après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson. T : lot témoin , Lot1 : 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb. Lot2 : 100 ug/l Cd+1 mg/l Pb. Lot3: 1 mg/l Cd+5 mg/lPb.

La contamination de l'eau de boisson par différentes concentrations en plomb et en cadmium conduit à une augmentation importante de taux du MDA comme illustrent bien les figures 41 et 42. Cette augmentation est dose dépendante, pour les rats recevant un mélange de 1mg/l Cd et 5mg/l Pb dans l'eau l'augmentation de taux du MDA cytosolique atteint des seuils hautement significatifs, pour les rats recevant un mélange de 100 ug/l Cd+1mg/l Pb cette augmentation est estimée très significative alors que les rats recevant le mélange le moins concentré montrent une augmentation significative dans leur taux du MAD cytosolique. De même, le taux du MDA dans les mitochondries des rats exposés à cette contamination polymétallique montre une augmentation hautement significative pour le mélange le plus concentré et significative pour le mélange de 100 ug/l Cd+1mg/l Pb. Les rats recevant 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb ne montrent cependant aucun effet significatif.

VI-2-5 Variations des taux de glutathion hépatique

Les variations des taux du GSH après 30 jours d'administration du plomb et du cadmium dans les eaux de boisson consommées par les rats sont représentés dans le tableau 18.

Tableau 19 : Variations des taux de GSH cytosolique hépatique (mM/g de foie) après administration de différentes concentrations des associations du plomb et du cadmium pendant 30 jours dans l'eau de boisson des rats.

	Lot témoin	Lot 1 : 35ug/l Cd + 150ug/l Pb	Lot2 : 100ug/l Cd + 1mg/l Pb	Lot3 : 1mg/l Cd + 5mg/l Pb
Concentration du GSH hépatique (mM/g de foie)	3,92 ± 1,16	2,08 ± 1,29 ns	1,57 ± 0,13 ***	0,98 ± 0,36 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, n=5 dans chaque groupe. Test Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0,05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,001$).

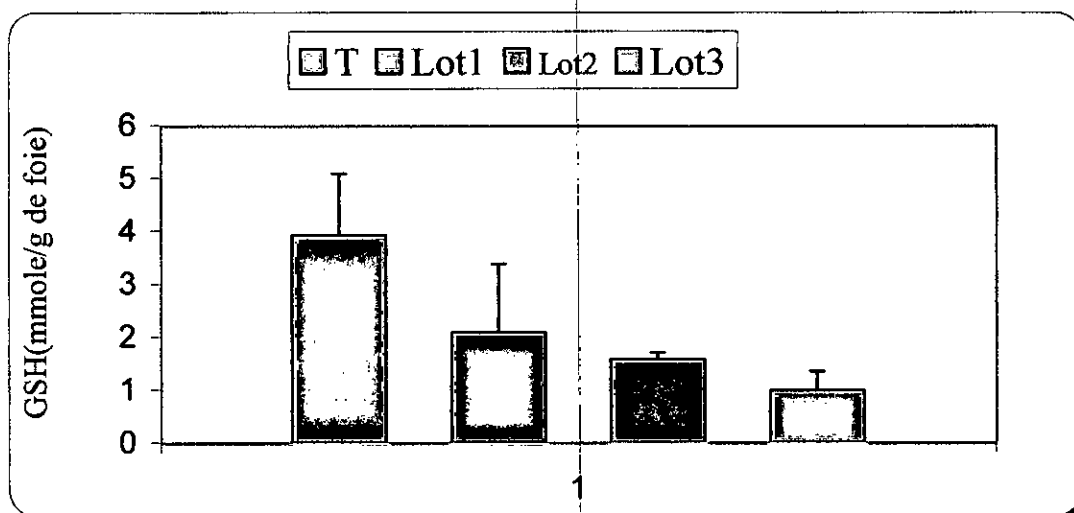


Figure 44 : Variations des concentrations en glutathion hépatique (mM/g de foie) après contamination subchronique de 30 jours par le mélange du plomb et du cadmium dans l'eau de boisson. T : lot témoin , Lot1 : 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb. Lot2 : 100 ug/l Cd+1 mg/l Pb. Lot3: 1mg/l Cd+5 mg/lPb.

Le dosage du glutathion intracellulaire hépatique chez les rats recevant pendant 30 jours une eau contaminée par 35 ug/l Cd+100 ug/l Pb montre une baisse non significative de la concentration en GSH par comparaison aux rats témoins recevant de l'eau distillée pour la même période d'investigation. Cette baisse est de 2,08 m moles/g de foie contre une concentration

de 3,92 m moles/g de foie mesurées chez les rats témoins. Cependant, une baisse hautement significative de la concentration cellulaire en GSH est enregistrée chez les rats recevant une eau contaminée par 100ug/l Cd+1mg/l Pb ainsi que chez les rats recevant 1mg/l Cd et 5mg/l Pb. Cette baisse est évaluée de $1,57 \pm 0,13$ m moles/g de foie et de $0,98 \pm 0,36$ respectivement.

CHAPITRE V: DISCUSSION

La qualité d'eau de boisson est appréciée par ses constituants microbiologiques et chimiques, dont les effets sur les organismes vivants sont bien connus (Nicolau, 2005). Beaucoup d'eaux considérées aujourd'hui comme potables contiennent un certain nombre de polluants chimiques : traces de pesticides, de métaux lourds, des nitrates, des nitrites, des résidus d'hydrocarbures, des dérivés organochlorés...à cause des rejets industriels non contrôlés, l'utilisation intensive des engrais chimiques dans l'agriculture ainsi que l'exploitation désordonnée des ressources en eau (Debieche, 2002).

La contamination des milieux aquatiques par les métaux lourds est une préoccupation environnementale majeure qui suscite un grand intérêt au cours de ces dernières années et préoccupe toutes les régions soucieuses de maintenir leur patrimoine hydrique à un haut degré de qualité (Cuita, 2003). Les métaux lourds, associés aux rejets divers, représentent les polluants les plus redoutés pour ces milieux en raison de leur concentration par certains organismes vivants (Sobhi, 1997) et leur implication dans les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification dans les chaînes alimentaires. Ils soulignent un des aspects les plus inquiétants pour la santé environnementale (Abou-Arab, 2001). Cette situation a conduit les gouvernements à réglementer les émissions en fixant des teneurs limites (Joris, 2005). Cependant, les sources de pollution par les métaux lourds sont bien sûr pour une part d'origine anthropique mais aussi d'origine naturelle et donc pas toujours contrôlables (Cuita, 2003).

L'évaluation de la présence de métaux lourds dans l'eau est d'une grande importance et la plupart des méthodes consistent à faire une analyse de l'eau avec des techniques qui relèvent de la chimie analytique. Ces techniques sont déjà d'une grande précision mais les études toxicologiques et écotoxicologiques sont aujourd'hui tellement exigeantes que l'analyse chimique doit être complétée par la mesure de variables biologiques pour l'évaluation de la qualité de l'eau et des milieux aquatiques (Noury et al, 2002). Par ailleurs, la présence et la mesure du métal en elle-même est devenue insuffisante, les variables déterminantes sont la solubilité du métal et sa faculté à être assimilé qui dépendent toutes deux de la forme chimique du métal et des conditions trouvées dans l'eau (Miquel, 2001).

La mesure des variables biologiques représente actuellement un nouvel outil complémentaire des analyses physico-chimiques et joue le rôle de systèmes d'alarme précoces d'une contamination dont les effets sont encore réversibles (Duquesne, 1994). L'utilisation de ces variables ou indicateurs a été découverte avec la mise en évidence chez les êtres vivants de systèmes -enzymatiques pour la plupart- spécialisés des fonctions de détoxification

de l'organisme. Il s'agit de dispositif de défense dont l'activité est rapidement induite par la présence d'un substrat particulier ou ses composés possédant une conformation voisine. L'utilisation de ces variables donne une information relativement précise sur la nature du toxique qui les a induit, directement lié à l'état de stress observé chez l'individu (Abou-Arab, 2001).

La formation de radicaux libres dus à l'oxygène est un processus naturel dans les cellules vivantes (Deby et al, 2002). Ce processus est renforcé par la présence de hauts niveaux de pollution par les métaux lourds, et ce dans des conditions nocives pour les organismes vivants (Hadi, 2004). Une intensification ou une inhibition de l'activité d'une série d'enzymes, tels que la superoxyde-dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion-peroxydase (GPX) qui, combinées, indiquent un stress dû à une oxydation, peut constituer un indice de pollution par des métaux lourds (Duquesne, 1994). La peroxydation des lipides est un phénomène provoqué par des formes d'oxygène relativement réactives, telle que le peroxyde d'hydrogène et les radicaux OH^\bullet , engendrés par le stress dû à l'oxydation. Le statut de ces indices biochimiques du dommage dû à l'oxydation a été étudié récemment (Stegeman et al, 1992).

C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés, dans la première partie de notre travail, à l'évaluation du degré de contamination métallique de sources d'eau de la ville de Jijel par des mesures chimiques, et d'investiguer, dans la deuxième partie du travail, les effets potentiellement délétères de cette contamination sur les différents marqueurs du stress oxydant, en choisissant comme modèle biologique les mitochondries et les cytosols hépatiques des rats exposés *in vitro* et *in vivo* (via l'eau de boisson) à ces contaminants.

V-1. Evaluation des degrés de contamination métallique et leurs origines éventuelles

L'évaluation globale des présents résultats met en évidence un profil de concentration très élevé des deux métaux cibles de l'étude ; le plomb et le cadmium ; dans tous les sites retenus. Ceci traduit une contamination certaine et dangereuse des sources d'eau de la ville de de cerner les origines éventuelles de cette contamination alarmante. Par ailleurs, la lutte contre la pollution des eaux souterraines ou de surface serait subordonnée à la définition des origines

et des foyers à partir desquels celle-ci prend naissance et se propage comme le suggère Bentir, (1997).

Les métaux lourds sont des éléments présents naturellement dans les eaux souterraines et dépendent de la géochimie structurale des aquifères (Debieche, 2002). Dans les écosystèmes aquatiques non contaminés par les activités industrielles, comme le cas des sites retenus, la part des métaux endogènes, issus du fond pédogéochimique local, contribue de manière significative au stock global en métaux lourds. D'après (Baize, 1997), le fond pédogéochimique naturel résulte de phénomènes naturels géologiques et pédologiques. Evaluer ce fond pédogéochimique pour chaque type de roche et du sol est donc indispensable, car il permet d'apprécier d'éventuelles augmentations manifestes des teneurs en métaux (Biger, 1996).

Par ailleurs, il n'y a pas de sources industrielles du plomb et du cadmium (usine de voiture ou toiture, industrie métallurgique, peinture plombée, galvanisation,...) dans le bassin versant de l'oued Nil. L'hypothèse de la contribution du fond géochimique de la région reste l'explication principale de profils élevés de concentrations en métaux lourds dans les eaux du bassin.

Nous ne disposons pas d'informations concernant les valeurs du fond géochimique naturel de la région, mais le contexte géochimique global de la région rapporté notamment par l'étude de Afalfiz et al (1998) sur les indices minéralisés des terrains de Taher, laisse penser que ces métaux sont pour l'essentiel d'origine naturelle. Selon cette étude la zone de Taher est un véritable gisement naturel, de roches métamorphiques, riche en plusieurs éléments minéralisés dont essentiellement le plomb et le zinc. Les teneurs naturelles en plomb dans les eaux souterraines sont généralement très basses en dehors des zones minières (Décloître, 1998). Les eaux fortement chargées en plomb dans tous les sites retenus confirment donc les résultats de Afalfiz et al (1998). En effet, le plomb constitue des gisements primaires dans les roches éruptives et métamorphiques où il est présent essentiellement sous forme de sulfure (galène). Il est redistribué via l'altération dans toutes les roches sous forme de carbonate, de sulfate et peut se substituer au potassium dans les roches silicatées et les phosphates (Burnol et al, 2006).

Dans le monde entier, la communauté scientifique a largement étudié la contribution du fond pédogéochimique dans l'enrichissement des eaux souterraines en métaux lourds. Les teneurs en plomb et en zinc des fonds pédogéochimiques peuvent être extrêmement variables d'un sol à l'autre.

Une étude de Prouvost et al (2003) estime que les teneurs en plomb dans les sols de Noyelles -Goddult (Pas de Calais) varient de 58 à 1707 ug / g. Les concentrations en cadmium sont estimées de 1,1 à 24,8 ug / g. A l'échelle de continent africain, la plupart des études publiées (Ajayi et al, 1981; Saad, 1990) ont axé sur les zones urbaines et industrielles. Il peut donc que les niveaux réels du fond ne soient pas exactement connus, ce qui peut fausser l'interprétation des données. Les concentrations en cadmium dans les lacs et les rivières africaines (Egypte, Nigeria) pour l'ensemble de ces études varient de 0,2 à 21 ug / l. Le plomb a donné des teneurs plus élevées avec des écarts considérables car il passe de 2,5 à 400 ug / l. Une étude marocaine portée sur 3000 prélèvements d'eau des nappes phréatiques de Casablanca, Tanger, Oujda, Nador, Taza et Agadir décèle des taux de concentrations largement variable d'une ville à l'autre, ils oscillent entre 6,5 et 123 ug / l pour le plomb et entre 0,5 et 2 ug/l pour le cadmium (Rapport national MEDPOL, 2005).

Néanmoins, la source de contamination des eaux par les métaux lourds n'est pas uniforme, ces concentrations élevées apparaissent fort probablement influencées par la présence d'autres sources suspectes d'accentuer la contamination. Des apports d'origines anthropiques, provenant d'une ancienne mine de la société algérienne des mines SONAREM abandonnée en 1993 des métaux précieux (or et argent) et de marbre située au niveau de la source de l'oued Nil à Ain Tizi (montagnes de « Chahna » au sud du Taher) peuvent expliquer de leur part ces teneurs élevées, notamment pour la source de Bachelot et le forage de l'oud Nil situés en aval de ce site. Ces terrils miniers abandonnés laissent de grandes masses des déchets, riches en sulfures métalliques, qui libèrent en s'oxydant des eaux acides fortement chargées en métaux lourds. Ainsi, l'apport via le cheminement des lessivages de ces eaux contribue à augmenter d'une manière très significative les profils de concentrations des métaux lourds. La nature très perméable des sols autour de l'oued Nil, illustrée dans la carte géologique de la wilaya (figure 26) facilite considérablement le processus d'infiltration de ces métaux vers les eaux souterraines de bassin. Par ailleurs, Toute exploitation minière, ancienne comme moderne, comporte outre les travaux d'extraction proprement dits, des installations d'enrichissement du minerai et souvent de métallurgie. À ces installations sont associés des stockages plus ou moins importants de stériles miniers ('haldes') et de résidus de traitement du minerai, et parfois de scories métallurgiques. Ces différentes entités, ainsi que les sols proches des installations, contiennent toujours, sous forme souvent instable, des quantités importantes de métaux lourds, et sont donc autant de 'termes-sources' potentiels

susceptibles de les relâcher dans l'environnement pendant de très longues périodes (Potvin, 2004).

En Europe, plusieurs bassins fluviaux sont contaminés par les activités minières, le Lot, le Gardon et l'Ardèche en France, Restronguet Creek, la Tamar et les Rio Tinto en Espagne. Cela a suscité un nombre important d'études visant à évaluer l'impact des drainages des mines (Potvin, 2004). Dans le sud ouest de la Sardaigne, le plus grand bassin minier du bassin méditerranéen apporte plomb, zinc, chrome, et cadmium dans les sols ainsi que dans l'eau des nappes, des lacs, des lagunes, et de la mer. La pollution de la Gironde par le cadmium et le zinc est un autre exemple qui illustre bien l'impact des anciennes mines sur la qualité des eaux, où l'ancienne mine de zinc (usine de vieille Montagne) a laissé près d'un petit ruisseau, le Riou Mort, des terrils d'extraction riches en cadmium et en zinc (Joris, 2005).

Les activités agricoles sensiblement augmentées au cours de ces dernières années au niveau de bassin versant de l'oued Nil constituent une autre source anthropique de cette contamination et contribue d'une part non négligeable dans l'enrichissement des eaux souterraines en métaux lourds. Par ailleurs, et tenant compte de l'usage exagérément intensifié des engrais chimiques et des pesticides, le transfert de ces produits toxiques vers les sources d'eaux soit par infiltration sur les surfaces cultivées soit par lessivages, reste une inquiétude justifiée. La localisation de la quasi-totalité des puits collectifs de Redjla au sein des champs agricoles augmente les risques de la contamination. De même, les élevages intensifs des bovins et volailles sur l'ensemble des terrasses alluviales de l'oued Nil sont probablement responsables des transferts des métaux contenant dans ses déjections vers les cours d'eaux.

L'analyse de la littérature scientifique récente porte une attention croissante sur l'impact des pratiques agricoles modernes sur la qualité chimique de l'eau (Devez, 2004). De nombreuses études confirment la part importante de ces pratiques dans l'enrichissement des sources d'eaux superficielles et souterraines en métaux lourds. Une voie qui mène directement à une telle situation est l'utilisation intensive des pesticides et des engrais minéraux riches en cadmium, c'est le cas notamment des engrais phosphatés largement utilisés par les agriculteurs de bassin de l'oued Nil. Les experts estiment que l'utilisation d'engrais phosphatés introduit 82 tonnes par an du cadmium dans l'eau et donc au niveau de chaîne alimentaire (Joris, 2005). Indirectement, l'utilisation des terres peut influencer la concentration des métaux lourds dans les eaux de surfaces et souterraines, en accroissant la mobilité des métaux d'origine humaine ou géologique présents dans les sols du bassin. Les

métaux lourds contenus dans le sol peuvent être transférés dans les masses d'eau par les processus érosifs (Audry, 2003). De plus, l'acidification du sol, causée par la volatilisation de l'ammoniac dans les champs traités, pourrait augmenter la solubilité des métaux lourds emmagasinés dans le sol et, facilitant, leur introduction dans les eaux superficielles et souterraines (Blanchard, 2000). Des taux élevés de prélèvement de l'eau souterraine à des fins d'irrigation, peuvent également altérer le milieu chimique du sol et accroître la mobilité des métaux lourds d'origine géologique. Ce cas se figure clairement dans le bassin de l'oued Nil, lieu d'implantation de plusieurs forages, la région de Regela présente la même particularité où plusieurs puits tubulaires sont implantés dans la région. Cette surexploitation est fort probablement un autre facteur des taux élevés en métaux lourds dans les eaux de ce bassin. Plusieurs cas similaires ont été illustrés dans le monde, l'exemple de la contamination des puits tubulaires de Bangladesh par l'arsenic reste l'exemple le plus spectaculaire (Nicolau, 2005). Les élevages intensifs des bovins et des volailles semblent également une autre source probable de l'apport des métaux lourds dans le sol, et par infiltration, dans les eaux. De nombreuses études ont montré les risques liés à l'utilisation des lisiers animaux, comme fertilisants organiques des sols, dans le transfert du zinc et du cuivre mais également du plomb et du cadmium vers les sols et les eaux souterraines (Meeus et al, 1989). Il apparaît également de façon nette que les rejets en provenance de ces élevages sur l'ensemble des terrasses alluviales situées au sud de la route départementale 135(D-1354), et les rejets d'eaux usées sur les terrasses situées au nord de la D-136 sont également des sources importantes d'enrichissement des eaux de bassin en métaux lourds (Bentir, 1997).

Une autre source de cette contamination peut se rapporter également à l'existence d'une ancienne décharge publique au niveau de l'oued Boukhara, un des affluents les plus importants de l'oued Nil. Une étude de Ademe (1993) sur la composition des ordures ménagères en France, insiste sur la grande responsabilité des décharges publiques dans la contamination des milieux aquatiques en métaux lourds. Selon cette étude la teneur moyenne des ordures ménagères en plomb est de 795 mg / kg, celle du cadmium est de 4 mg / kg. Le tableau ci-dessous donne la distribution et teneurs en métaux lourds dans les diverses fractions des déchets ménagères (Ademe, 1993).

Le risque de pollution des eaux souterraines par les lixiviats des décharges a fait l'objet de plusieurs études. Depuis 1960, certains auteurs comme Gray et al (1974), Rügge et al (1995), Faure et al(1998), Asselin et al (2004), ont montré la présence d'un réel danger lié

à de nombreuses décharges étudiées en France, en Pays de Galles et au Canada sur la contamination des sources d'eau. Il est à noter que les batteries, les piles et les accumulateurs à plomb sont parmi les sources importantes de métaux dans les décharges lorsque ces derniers sont stockés ou incinérés.

La littérature scientifique souligne que la pollution atmosphérique joue également un rôle capital dans les apports en métaux lourds dont notamment le plomb. Toutefois, l'absence des activités industrielles importantes susceptibles de contaminer l'air du bassin, laisse penser que la combustion des carburants des automobiles est parmi les hypothèses proposées pour expliquer la part des dépôts atmosphériques. Les automobiles eux-mêmes constituent, par corrosions, une autre source dont notamment la particularité que la grande majorité de parc automobile de la wilaya est constitué de véhicules d'occasion d'Europe. L'étude réalisée par Pagotto (1999) a permis d'estimer que le carburant est la principale source en plomb. Cela s'explique par l'ajout de dérivés alkylés du plomb (tétraéthyle et tétraméthyle de plomb) comme antidétonant dans les carburants (Pagotto, 1999). Après la combustion du carburant, le plomb est relargué dans l'atmosphère sous différentes formes ; sulfates ou carbonates insolubles, oxydes peu solubles ou halogénures très solubles (Gardas, 2000). De plus, l'utilisation des autres fluides comme les graisses de lubrification et les huiles des moteurs contribuent également aux émissions polluantes des véhicules. L'étude réalisée par Shaheen (1975) a permis d'estimer les flux des métaux liés à ces fluides. Selon cette étude L'huile de moteur par exemple contient 9 ug / g du plomb, alors que l'essence contient jusqu'à 501 mg / l du plomb. Toutefois, et d'après une étude de Gardas (2000) les flux de métaux lourds liés aux carburants ne se limitent pas au plomb (zinc, cuivre, cadmium et chrome).

La situation de la source de Boucherchour à proximité des ateliers de la mécanique automobiles et des garages de lavage-graissage amené à penser que l'infiltration des divers types d'huiles automobiles usagées participent à transférer les métaux de ces huiles vers l'eau souterraine.

Les fumées des incendies de forêts sont aussi une source naturelle qui contribue à l'enrichissement des sols et des eaux en métaux lourds. La couverture végétale très abondante de la région accroître cette probabilité.

Les analyses chimiques des eaux de citernes en métal et en plastique retenus comme échantillons dans notre travail révèlent des teneurs en plomb et en cadmium relativement proches à celles de la source d'approvisionnement utilisée par les propriétaires des camions, le puits de Redjla dans notre étude représente cette source. Les faibles écarts observés en ce

qui concerne la concentration en plomb pour la citerne en métal et la concentration en cadmium pour la citerne en plastique peuvent être expliquées par les migrants issus de matériaux de citernes en contact avec l'eau. Plusieurs études menées dans ce sens ont mis en évidence la forte possibilité de relargages de métaux lourds à partir des matériaux en contact. Par ailleurs, le cadmium est largement utilisé comme agent stabilisateur dans l'industrie des plastiques, le plomb, de sa part, constitue une matière de base dans l'industrie métallurgique, de plus il est utilisé dans la soudure des citernes en métal (Picot, 2003). La bibliographie disponible sur cette source de contamination souffre d'être peu nombreuse et peu précise. Selon cette bibliographie, le migrant est défini comme l'ensemble des substances cédées par un matériau à des denrées alimentaires en contact. Fauris et al (1986) ont évalué des matériaux au contact des eaux au moyen des tests de toxicité cellulaire, le polychlorure de vinyle est parmi les 8 matériaux testés. Cette étude a montré que tous les matériaux sont cytotoxiques. Sauvart et al (1995) ont évalué l'effet de stockage de l'eau dans des matériaux en polymères pendant 24 mois à 20 °C. Sur ces eaux, des analyses chimiques de métaux lourds, de monomère de chlorure de vinyle et d'acétaldéhyde ont été effectuées. Le résultat montre des relargages du zinc, du plomb et du cadmium. Les auteurs concluent que l'évaluation du produit fini de l'emballage est essentielle. Néanmoins, l'effet minimal de migrant observé dans notre étude peut être expliqué par la courte durée de séjour des eaux dans les citernes, selon les propriétaires des camions, cette durée ne dépasse pas 24h à 72h.

Contre toute attente, l'analyse chimique des eaux de distribution publique de la ville de Jijel a montré une teneur relativement faible en cadmium et en plomb. Toutefois, le forage de l'oued Nil présentant une teneur élevée en plomb notamment, n'est pas la source principale d'alimentation de la ville de Jijel en eau potable. Selon la direction de l'eau de la wilaya de Jijel, cette source ne participe qu'avec 25 %, le reste d'eau distribuée publiquement provient de barrage d'El Agram. Il est probable donc que l'effet de la dilution par le mélange contribue à diminuer sensiblement les teneurs en métaux lourds. D'autres processus physico-chimiques sont probablement susceptibles également de diminuer la teneur en métaux lourds dans les eaux distribuées via les conduites publiques, entre autres, les traitements des eaux brutes, les phénomènes d'adsorption, de complexation et de précipitation. Il est à noter finalement que le renouvellement de conduites d'eau potable de la ville de Jijel récemment a permis de minimiser voire d'éliminer la part des corrosions des anciennes conduites dans l'enrichissement des eaux de robinet en plomb notamment.

Néanmoins, la totalité d'un protocole analytique est souvent sujette à de nombreuses erreurs (Di-Bendetto, 1997 ; Apostoli, 2006). Sans parler de la non-représentativité de l'échantillon qui conduira à des résultats sans signification, il faudra s'affranchir des contaminations éventuelles (principalement au cours des phases de collecte et de prétraitement), des pertes par sorption, perméabilité ou réaction chimique (phases de stockage et de prétraitement) ainsi que des interférences physiques ou chimiques survenant lors de la détection.

L'obtention de résultats fiables passe par l'élimination de ces erreurs systématiques. Cette étape s'avère cruciale en analyse de métaux lourds car la moindre erreur peut avoir des conséquences dramatiques sur l'exactitude du résultat. Mener à bien cette tâche nécessite l'identification et la maîtrise des différentes sources d'erreurs possibles (Di-Bendetto, 1997).

L'utilisation des différents réactifs (eau, acides, sels, solvants...), la contamination par le matériel, plus particulièrement dans l'étape de mise en solution essentiellement due à l'adsorption d'éléments lors de manipulations précédentes qui peuvent être relargués dans certaines conditions (traitements nécessitant des temps de contact prolongés, de hautes températures, un travail sous pression) constituent les principales sources de contamination. Les conditions physico-chimiques mises en œuvre et notamment l'extraction et la filtration des échantillons représentent également des grands risques d'une telle contamination. Le matériel de filtration et le filtre lui-même peuvent relâcher des substances dans l'échantillon ou en absorber, ce qui modifier considérablement la teneur en métaux lourds. L'environnement, en l'occurrence le laboratoire où est effectuée l'analyse, constitue lui aussi une source de contamination. La présence d'éléments sous forme de gaz ou d'aérosols peut engendrer des erreurs ce qui nécessitent donc un travail sous hotte hors-poussière ou en salle blanche. Les doigts de l'analyste, sources de chlore, sodium, calcium, plomb, cadmium..., ainsi que le port de bijoux, montres ou l'utilisation de cosmétiques constituent également un potentiel d'erreur à ne pas négliger. À cela s'ajoutent les contaminations éventuelles apportées par les autres manipulations effectuées dans le laboratoire (Eberhart, 1989). En outre, La présence d'éléments autres que celui que l'on désire analyser peut engendrer des interférences de différentes natures physiques ou chimiques. Ces éléments peuvent provenir de la matrice elle-même ou de tout réactif utilisé lors du protocole analytique.... (Blanchard, 2000).

De façon globale, l'évaluation des concentrations des métaux lourds présents à l'état de trace dans l'eau reste une opération délicate et heurte en permanence à des risques de

contaminations. Cependant, l'ensemble des mesures prises lors de la réalisation de travail nous a permis de minimiser ces risques le plus que possible.

Enfin, et dans l'objectif de valider les méthodes analytiques employées dans ce travail, des paramètres fondamentaux ont été pris en compte lors de traitement de nos résultats. Le choix d'une méthode d'étalonnage appropriée (étalonnage externe) représente la première condition à satisfaire pour cette finalité. Par ailleurs, tous les résultats de dosage sont déterminés grâce à deux méthodes analytiques différentes. Ce travail nous a permis de s'affranchir du plus grand nombre d'erreurs systématiques, car Chaque méthode d'analyse possédant ses propres sources d'erreurs. Un autre paramètre très important à été utilisé pour la validation de nos résultats, il s'agit de la comparaison inter-laboratoire de résultats obtenus. Cet outil se révèle très efficace dans la réduction des erreurs systématiques. En effet, outre la détection des erreurs dues à l'analyste lui-même, ceci permet de confronter les résultats obtenus en utilisant une gamme de méthodes beaucoup plus étendue que celle disponible à l'échelle d'un seul laboratoire (Eberhart, 1989). Les analyses du plomb et du cadmium effectuées par d'autres laboratoires concernant la source de Boucherchour et le puits de Redjla confirment nos résultats. Ces analyses effectuées selon la méthode NA 2362 sur l'échantillon de la source de Boucherchour enregistrent une concentration de 80 ug / l du plomb et 22 ug / l du cadmium. Le puits de Redjla montre une teneur de 20 ug / l du cadmium et une teneur de 30 ug / l du plomb. Ces analyses ont eu lieu pendant la saison hivernale (janvier 2007).

L'incertitude de nos résultats, exprimée comme l'intervalle de confiance admis autour de la valeur trouvée (Eberhart, 1989), est déterminée par l'application de contrôle statistique (analyse de la variance). Ce dernier, nous a permis d'assurer la reproductibilité de résultats obtenus par l'absorption atomique et la méthode spectrométrique. En revanche, la méthode colorimétrique à la dithizone est moins reproductible en raison des grandes fluctuations autour de la valeur moyenne. L'absence des différences significatives entre les sites retenus concernant la teneur en plomb selon cette méthode confirme cette constatation.

V-2. Evaluation des effets de métaux lourds sur le stress oxydant

Tenant compte des niveaux élevés des métaux lourds détectés dans les sources d'eau d'alimentation de la région de Jijel, il nous a paru fondamental, dans la deuxième partie de ce travail, de connaître les effets de cette contamination polymétallique sur la santé des citoyens de la région. Plusieurs études menées en ce sens sur des groupes d'individus ayant été

soumis à une contamination chronique au cadmium et au plomb, révèlent des effets délétères sur différentes fonctions biologiques (Joris, 2005). L'analyse des études épidémiologiques effectuées dans les populations exposées au plomb et au cadmium et des travaux expérimentaux *in vivo et in vitro*, permet de bien répertorier les différents effets de ces métaux sur la santé (N'ladon, 2005). Par ailleurs, dans les années récentes, un autre aspect toxicologique de ces métaux, leur effet sur les marqueurs cellulaires du stress oxydant, a été mis en évidence par de très nombreuses études (Leonard et al, 2004). Cette nouvelle approche a gagné récemment un terrain considérable dans les études écotoxicologiques.

La génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS) (l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique) fait partie du métabolisme normale de la cellule(Pincemail et al, 2002). La chaîne de transport des électrons dans les mitochondries et les lysosomes génère ces espèces de manière constitutive (Le pape, 2003). Par contre, lors d'une contamination par les métaux lourds, il se crée un déséquilibre entre la génération de ROS et la productions d'antioxydants (Joris, 2005). Différentes hypothèses concernant les modes d'action toxique de métaux lourds, comme l'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN, la mythylation, le pouvoir co-carcinogène avec d'autres toxiques environnementaux ont été proposées (Leonard et al, 2004). Le thème commun qui ressort de ces hypothèses est celui du rôle des espèces réactives de l'oxygène. Ces Ros, produits suite à une exposition aux métaux lourds, sont liés aux voies de signalisation cellulaire, à l'apoptose et la mutagenèse de l'ADN (Valko et al, 2006). En effet, de nombreuses études (Toppi et al, 1999 ; Muller, 2004 ; Lopez et al, 2006 ; Martelli et al, 2006) mettent en évidence que la présence des métaux lourds dans la cellule génère la production de ROS : peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxylés, oxyde nitrique et anion superoxyde. D'autres expériences (Stohs et al, 1995 ; Watanabe et al, 2003 ; Valko et al, 2006) montrent que les métaux lourds induisent la peroxydation lipidique des membranes, conduisant à la formation de peroxydes lipidiques, ce qui contribue à augmenter le stress oxydant intracellulaire et à amplifier les dommages oxydatifs.

Notre travail est consacré en premier lieu à la recherche d'une activité pro-oxydante du plomb, du cadmium et du zinc à la suite d'une exposition, *in vitro*, de mitochondries et de cytosols hépatiques des rats à une large gamme de concentration, allant de 1Molaire jusqu'à 10^{-10} Molaire. En deuxième lieu, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet pro-oxydant d'une contamination polymétallique des eaux de boisson en différentes concentrations du plomb et du cadmium pendant une période subchronique de 30 jours sur un

modèle de mitochondries et de cytosols hépatiques des rats males sains consommant en moyen 30 ml de l'eau par jour.

Suite à l'ajout *in vitro* de différentes concentrations du plomb, du cadmium et du zinc aux extraits de mitochondries et de cytosols hépatiques, l'évaluation de l'activité pro-oxydante occasionnée par la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS) est réalisée dans notre travail par l'analyse de l'activité des enzymes intervenant dans la détoxification de ces ROS. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT). En effet, ces enzymes avec la glutathion peroxydase couplées d'autres molécules antioxydantes comme le glutathion total constituent la première ligne de défense des cellules contre les ROS. Une activation ou à contrario, une inhibition de cette ligne indique un état de stress. Par ailleurs, le stress oxydant est également étudié dans différents modèles biologiques suite à une exposition à des agents stressants.

Dans notre étude réalisée *in vitro* ainsi qu'*in vivo*, sur un modèle de mitochondries et de cytosols hépatiques, nous avons trouvé que l'exposition au cadmium seul (*in vitro*) ou associé au plomb (*in vivo*) entraîne une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase de façon concentration dépendante pour les deux études. En revanche, la catalase montre dans les extraits de mitochondries et de cytosols une baisse hautement significative. Cette baisse est également concentration dépendante. De même, l'exposition de nos extraits au cadmium seul dans l'étude *in vitro* ou associé au plomb dans l'étude *in vivo*, révèle une production excessive du MDA, produit de la peroxydation lipidique, et une baisse de taux du GSH hépatique total.

Etant donné sa forte toxicité, une attention toute particulière est aujourd'hui portée au cadmium qui semble exercer sa toxicité au niveau cellulaire en partie en induisant la formation de ROS pouvant provoquer une peroxydation lipidique, des dommages de l'ADN ou encore une oxydation des protéines (Silvestre, 2005). Le cadmium n'est pas un métal biologique, en outre il existe sous un seul état d'oxydation. (Toppi et al, 1999). Il est donc incapable d'induire directement la production de ROS par la réaction de Fenton (Joris, 2005). Cependant il est capable de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. De nombreuses études ont montré que le cadmium, entraîne une surproduction d'espèces réactives d'oxygène associées aux mitochondries (Bertin et al, 2006). Le mécanisme proposé repose sur les altérations directes de la membrane mitochondriale avec une fuite consécutive d'électrons à partir de la chaîne de transport électronique mitochondriale ce qui conduit à une production accrue du chef de file de ROS; l'anion super

oxyde ($O_2^{\bullet -}$). En effet, l'anion superoxyde a été identifié comme étant un médiateur clé dans plusieurs des réactions nuisibles des ROS. Cette situation requiert une activation des SOD qui catalysent leur élimination par dismutation en faisant apparaître de l' O_2 et de l'eau oxygénée (H_2O_2), composés stables et moins toxiques. Selon Bertin et al (2006), l'exposition des cellules endothéliales humaines à une dose de 1-20uM du cadmium génère une surproduction de l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Shih et al (2004) confirment ces résultats sur un modèle de fibroblastes humains normaux et Bolduc et al (2004) sur des cytosols des cellules intestinales humaines exposées à une dose de 50 uM du cadmium pendant 30 minutes.

D'autres hypothèses suggèrent que le cadmium exerce ses effets cytotoxiques indirectement par altération des systèmes de défenses cellulaires (Atli et al, 2006). En revanche, de nombreux travaux soulignent des phénomènes d'adaptations à l'exposition au cadmium par stimulation des activités des enzymes antioxydantes (Bertin et al, 2006). Par ailleurs, les SOD agissent par voie catalytique, un excès de production de l'anion superoxydes conduit à une augmentation de la concentration cellulaire en SOD (Silvestre,2005).

Il convient également de noter que la liaison des cations métalliques aux enzymes pourrait altérer leur activité, non seulement en inhibant mais aussi en stimulant la fonction catalytique de l'enzyme (Ho, 2004).

L'hypothèse de la stimulation de la SOD à l'encontre du stress du cadmium est largement soutenue dans la littérature scientifique par différents travaux expérimentaux. Les travaux de Sarkar et al (1997) et Zikic et al (1998) montrent une forte corrélation entre les concentrations en cadmium dans les érythrocytes et les cellules cardiaques des rats et l'augmentation de la concentration en SOD. Les mêmes résultats ont été également démontrés *in vitro* sur un modèle de mitochondries des cellules nerveuses par Lopez et al (2006). Cependant, Sunitha et al (2001) suggèrent que l'exposition au cadmium *in vitro* sur un modèle de mitochondries hépatiques inhibe les capacités antioxydantes de la SOD et la CAT par accumulation de superoxydes et de peroxydes. Plusieurs autres auteurs (Hussain et al, 1987 ; Ognjanovic et al, 1995 ; Shukla et al, 2000) proposent que la surproduction du MAD chez les rats exposés au cadmium soit probablement la conséquence de cette inhibition. En revanche l'étude de Sarkar et al (1997) rapporte des niveaux élevés du taux du MDA dans les tissus des rats exposés au cadmium en parallèle à une augmentation significative enregistrée dans la concentration en SOD et CAT par rapport aux rats témoins. Ikediobi et al (2004) enregistrent une diminution de la concentration en SOD dans les cellules hépatiques des rats

exposées pendant 4 heures à des fortes doses du cadmium (100-300 μM), néanmoins, cette concentration augment d'une manière significative après 8 heures d'exposition. Les auteurs de cette étude suggèrent l'hypothèse d'une réponse adaptative de cellules pour expliquer ce changement.

Comme le cadmium, le plomb est un élément non essentiel à la vie des cellules eucaryotes, son introduction modifie la biologie des cellules en perturbant une myriade de voies métaboliques et de processus physiologiques (Berrahal et al, 2007). Parmi les mécanismes de toxicité du plomb, nous nous sommes intéressés à leur effet prooxydant au niveau du cytosols et des mitochondries hépatiques. Les résultats de la présente étude montrent, *in vitro*, une augmentation hautement significative de la concentration cytosolique et mitochondriale en SOD avec une déplétion hautement significative en CAT cytosolique et mitochondriale. De même, le taux du MDA enregistre une augmentation hautement significative en parallèle à une diminution hautement significative en taux du GSH hépatique pour l'étude *in vivo*. L'ensemble de ces marqueurs montre une toxicité dose dépendante.

L'activité pro-oxydante du plomb libre ionisé a été étudiée et démontrée dans de nombreuses études. Le plomb joue *in vitro* un rôle capital dans l'induction hautement significative de ROS potentiellement responsable de sa toxicité sur différents organes (cœur, reins, foie, système nerveux, sang, système respiratoire). Il modifie les propriétés de nombreuses protéines cytosoliques et membranaires, en se liant de façon réversible avec le groupement thiol. Le plomb inhibe ainsi l'activité de nombreuses enzymes et particulièrement celle de deux enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème, l'acide δ -aminolévulinique déshydratase (ALAD) et la ferrochélatase (Ahamed et al, 2007). Il en résulte une carence en hème, dans certaines enzymes de la respiration cellulaire, comme les cytochromes, le glutathion et dans d'autres enzymes protectrices des processus oxydatifs, dont notamment la catalase. Cette carence affecte donc, outre la synthèse de l'hémoglobine, des processus cellulaires critiques comme la respiration mitochondriale et le métabolisme oxydatifs

(Figure 57). De plus, plusieurs études ont rapporté que l'autooxydation rapide de substrats de l'ALAD inhibée produire une production accrue de ROS : anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène. D'autre part, ce substrat induit le relargage de fer à partir de la ferritine, ce dernier stimule l'initiation de la peroxydation lipidique. Ainsi, Ribarov et al (1982) et Monterio et al (1991) ont pu mettre en évidence sur différents types de cellules exposées au plomb une production accrue de ROS. D'autres auteurs (Lawton et al, 1991 ; Sandhir et al 1994, et Hsu et al 1997) suggèrent que l'exposition *in vivo* au plomb

s'accompagne d'une augmentation de la génération de ROS et une diminution en glutathion et en groupements sulfhydriles, parallèlement, une baisse de l'activité enzymatique de la CAT est observée. Sandhir et al (1994) ont montré que la plupart des activités enzymatiques antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase) sont expérimentalement inhibées par l'exposition au plomb . Des résultats similaires ont été rapportés par l'étude de Ito et al (1985), les auteurs de cette étude soulignent une diminution dans l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase dans les érythrocytes des sujets exposés au plomb, alors que l'activité superoxyde dismutase du plasma a augmenté. Une fraction de l'action prooxydante du plomb s'exerce également très certainement par l'intermédiaire de la production excessive du malonyldialdéhyde (MDA), Bechara et al., (1993) ont montrés une forte corrélation entre les concentrations élevées en plomb (35ug/dl) dans le sang des sujets exposés et une augmentation hautement significative des niveaux sanguins du MDA. Des résultats similaires ont été également obtenus avec les faibles concentrations en plomb (16,8 ug/dl) par les mêmes auteurs.

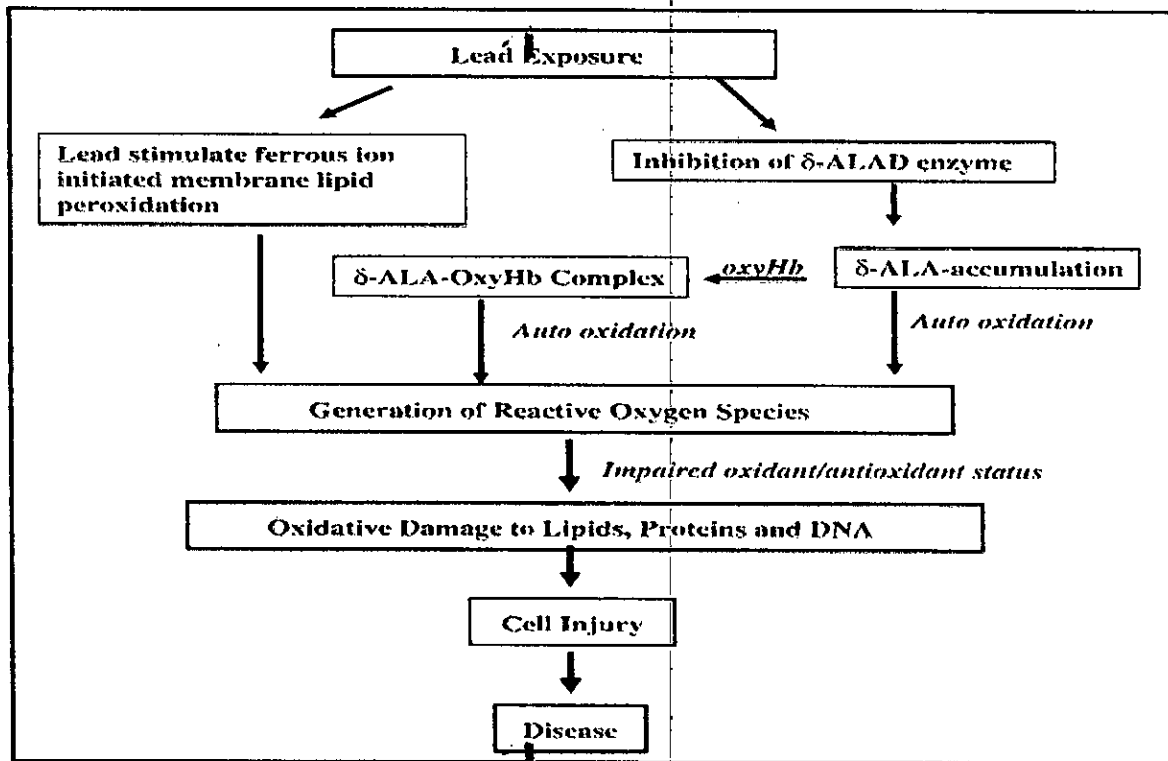


Figure 45 : Mécanismes possibles du stress oxydant du plomb (Ahamed et al, 2007)

Une trop grande concentration de SOD, durant un stress oxydant induit par les métaux, entraîne une production excessive d' H_2O_2 qui devienne rapidement toxique pour la cellule (Silvestre,2005) . La CAT est une enzyme intracellulaire de la première ligne de défense cellulaire qui catalyse la réaction de détoxification d' H_2O_2 par dismutation de peroxyde

d'hydrogène en eau et en oxygène et agit en synergie avec la SOD (Toppi et al, 1999). Toutefois, une production accrue de peroxyde d'hydrogène, peut excéder les capacités antioxydantes de cette enzyme, cela ce traduit par une inhibition de leur activité (Atli et al, 2006). Néanmoins, Les travaux menés dans les années récentes pour tenter d'étudier la réponse de la CAT face au stress métallique suggèrent qu'elle dépende de la dose du métal, mais aussi de la voie de l'exposition (Bertin et al, 2006). Par ailleurs, Les résultats de ces travaux n'ont pas abouti à une conclusion univoque et sont souvent contradictoires en fonction de ces deux variables. Selon Atli et al (2006) Le foie des poissons exposés pendant 96 heures à une dose de 1mg /l de Cd^{2+} montre une inhibition hautement significative de l'activité de la CAT. De même, Yang et al (1996) montrent que l'exposition du hamster à une dose de 4uM d'acétate de cadmium diminue 22 % de l'activité de la CAT. A l'inverse, Sarkar et al (1997) soulignent que le cadmium entraîne une augmentation de cette activité.

Il est admis aujourd'hui que l'ampleur de l'augmentation de stress oxydant est attestée par l'augmentation de malondialdéhyde (MDA) dans les membranes. En effet, il apparaît clairement que l'oxydation des lipides joue un rôle majeur dans la propagation du stress oxydant. La peroxydation lipidique constitue en effet une phase importante dans la seconde vague de stress produite par les ROS. Cette réaction va modifier la fluidité membranaire et activer des enzymes impliquées dans le turnover des acides gras. La libération dans le cytoplasme de ces acides gras aura notamment pour conséquence de produire des molécules qui sont de véritables messagers cellulaires (prostaglandines, leucotriènes, hydroperoxydes...) capables de réguler différentes fonctions fondamentales (division, apoptose, sénescence, réponse inflammatoire...) et d'agir à distance sur des cellules ou organes cibles (Haton, 2005).

L'augmentation de la peroxydation lipidique par le cadmium a été excessivement étudiée par différents laboratoires (Hussain et al, 1987 ; Toppi et al, 1999 ; Sunitha et al, 2001 ; Ikediobi et al, 2004 ; Lopez et al, 2006). Toutefois, les mécanismes de cette peroxydation sont encore mal connus. Casalino et al (2002) soulignent une augmentation significative du taux de MDA observée *in vitro* sur un modèle de mitochondries et de cytosols hépatiques et rénaux de rats incubés pendant 20 minutes à 75 uM de $Cd Cl_2$. Selon les auteurs de cette étude, cette surproduction du MDA n'est pas strictement liée à l'inhibition de l'activité enzymatique enregistrée tant dans les deux isoformes de la SOD que dans la catalase cytosolique et mitochondriale, ils proposent la présence d'autres mécanismes susceptibles d'être impliqués dans cette surproduction. Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* par

les mêmes auteurs, le suivi du taux de MDA au niveau de mitochondries et de cytosols de foie et des reins de rats exposés par voie intra péritonéale à une dose de 2,5 mg/kg de Cd Cl₂ après 6, 24 et 48 heures d'exposition montre une augmentation hautement significative. Le même constat a été enregistré par les mêmes auteurs chez le deuxième groupe de rats exposés pendant 30 jours à une dose de 250 mg/l de Cd Cl₂ dans l'eau de boisson. Hsu et al ,(1997) suggèrent que les dommages oxydatives du plomb au niveau des cellules nerveuses des rats exposés à une forte dose d'acétate du plomb (550ppm) dans l'eau de boisson sont essentiellement liés à une surproduction de MDA. Le même résultat a été obtenu sur plusieurs modèles biologiques *in vitro* (Ribarov et al 1982 ; Monterio , 1991).

Les résultats issus de l'ajout *in vitro* du zinc à nos modèles biologiques employés mettent en relief une réponse relativement différente vis à vis les marqueurs du stress étudiés. En effet, la plus grande part de cette variabilité est due probablement à la nature biologique différente du zinc. Le zinc est un élément essentiel pour tous les organismes vivants (Shuilleabliaen et al, 2006), c'est-à-dire que sa présence en quantité adéquate est requise afin d'assurer certaines fonctions biologiques (Formigari et al, 2007). Une carence en Zinc induit des perturbations parfois importantes de ces fonctions. Ces altérations sont corrigées uniquement par un apport de Zinc, ce qui souligne le caractère essentiel de ce métal (Pillet, 2001). Par ailleurs, tous les organismes vivant possèdent des mécanismes d'adsorption, de transport et d'élimination du zinc à l'opposé du cadmium et du plomb (Ho, 2004), bien qu'une surdose de zinc puisse être potentiellement toxique. Cette toxicité ne survient que lors d'expositions massives compte tenu l'existence de processus de régulation, et notamment d'excrétion, très efficaces au niveau du foie et du rein (Pillet, 2001). L'effet d'une carence en zinc sur le stress oxydant a fait l'objet de nombreuses recherches résumées dans plusieurs publications d'importance (Matsushita et al, 1996 ; Aiuchi et al, 1998 ; Nodera et al, 2001 ; Ho, 2004 ; Santon et al, 2006), nos résultats sont en parfaite corrélation avec l'ensemble des résultats de ces études. Atli et al (2006) ont montré sur un modèle *in vitro* de cellules hépatiques de poissons exposés à des fortes doses du zinc (1,5mg) une inhibition significative de l'activité enzymatique de la catalase. L'étude de Mocchegiani et al (2005) fait état d'une corrélation positive entre les fortes doses du zinc et l'augmentation de l'ampleur des dommages oxydatifs observés au niveau des cellules nerveuses.

L'ampleur du stress oxydant induit par le plomb et le cadmium séparément attestée dans notre étude réalisée *in vitro* témoigne le potentiel prooxydant puissant d'un mélange de

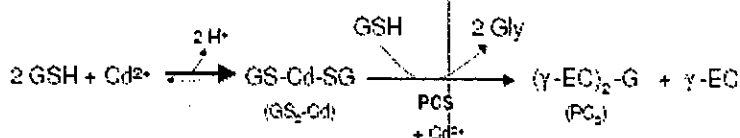
ces deux métaux. En effet, les résultats obtenus suite d'une contamination simultanée par le plomb et le cadmium dans l'eau de boisson pendant 30 jours à révéler des réponses similaires à celles obtenues suite d'exposition à chaque métal séparément dans l'étude *in vitro*. Il est notoire également que l'ampleur du stress oxydant induit face à cette contamination est concentration dépendante. Néanmoins, la courte durée d'exposition ainsi que les faibles doses administrées ont probablement empêché l'apparition d'une réponse adaptative possible. Une telle réponse peut être traduite par une diminution du taux du MAD ainsi qu'un rétablissement d'une activité antioxydante enzymatiques (SOD et CAT) et non enzymatique (GSH) relativement proche de celle de lot témoin. En effet, Masso et al (2007) ont montré par un travail expérimental réalisé *in vivo* sur des femelles de rats gestantes et allaitantes exposées simultanément et séparément à une dose de 300mg/l d'acétate du plomb et 10mg/l d'acétate du cadmium dans l'eau de boisson, un taux du MDA dans les cellules hépatiques, moins élevé dans le lot commun par rapport aux lots recevant séparément le plomb et le cadmium. Ces auteurs enregistrent également une augmentation significative de l'activité enzymatique de la SOD et la CAT dans ce lot. A contrario, Yáñez et al (1991) et Fowler et al (2004) ont pu mettre en évidence des dégâts oxydatifs importants sur les macromolécules des rats exposés tant à des fortes doses qu'à des faibles doses d'un mélange de trois métaux lourds (plomb, le cadmium et l'arsenic) dans l'eau de boisson pendant 30, 90 et 180 jours. Les auteurs de ces deux études suggèrent que l'effet synergique de mélange polymétallique augmente sensiblement l'ampleur de stress oxydant même à des faibles doses par comparaison au stress induit par chaque métal séparément. Le mécanisme commun proposé est directement lié à la mitochondrie la source intracellulaire principale de ROS et la cible privilégiée des attaques de métaux lourds dont notamment le plomb et le cadmium. Ces auteurs notent également une altération des capacités enzymatiques antioxydantes simultanée de la SOD et la CAT.

Le glutathion (GSH), tripeptide riche en groupement -SH hautement réactif, est une composante majeure de la défense antioxydante. Le glutathion joue un rôle vital dans la protection des cellules contre le stress oxydant. Il peut agir comme un antioxydant non enzymatique par interaction directe du groupement -SH avec les ROS ou il peut être impliqué dans la détoxification enzymatique comme cofacteur. Par ailleurs, en situation de stress oxydant, le rôle protecteur et détoxifiant de GSH résulte principalement dans sa fonction de cosubstrat des glutathions peroxydases et glutathions-S- transférases (Haton, 2005). Le rapport glutathion réduit/ glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un

marqueur du stress oxydant car le flux d' H_2O_2 est important, plus le GSH est consommé et le GSSG augmente (Garait, 2006).

Le GSH peut en effet non seulement réduire le peroxyde d'hydrogène en eau et des peroxydes de types ROOH, mais également, et par l'intermédiaire de son groupement thiol, former des complexes métalliques via des réactions non enzymatiques (David et al, 2006). Le devenir de ces composés (métabolisme et transport) varie selon la nature de l'espèce conjuguée au GSH.

Dans le cas de cadmium, le GSH le séquestre selon la réaction 15 montrée par David et al (2006) :



L'exposition *in vivo* des rats à un mélange du cadmium et du plomb dans l'eau de boisson a révélé une diminution hautement significative de la concentration cellulaire en GSH. L'étude de Diaz-Barriga et al (1990) rapporte que le GSH joue un rôle important dans la toxicité des mixtures métalliques. En effet une étude récente de Wang et al (2008) montre que l'exposition des rats à une mixture du 25 ppm d'acétate du plomb et 10 ppm du chlorure du cadmium dans les eaux de boisson pendant une période de 30, 90 et 180 jours entraîne une diminution significative de taux du GSH au niveau des cellules rénales.

Enfin, on peut conclure que les résultats obtenus reflètent fidèlement les grands risques sanitaires auxquels la population de la ville de Jijel est exposée suite à la consommation des eaux contaminées par le plomb et le cadmium. Par ailleurs, ces risques peuvent être accentués dans le temps. Ce dernier représente un paramètre clef dans l'aggravation de la toxicité où l'impact réel d'une telle contamination ne peut se mesurer dans l'immédiat, mais peut être décalé dans le temps. De plus, la possibilité de la présence d'autres contaminants éventuels dans les sources d'eaux de cette ville tels les pesticides avec les effets synergiques probables reste encore une source croissante d'inquiétudes et au centre de nos préoccupations pour des études futures.

4

CONCLUSION

4

4

CONCLUSION

La contamination de l'eau par les métaux lourds est une question mondiale urgente qui pose un sérieux problème environnemental en raison des risques qu'ils peuvent présenter pour la santé humaine et des dangers liés à leur rémanence dans les écosystèmes aquatiques. L'étude des biomarqueurs (enzymatiques et non enzymatiques) du stress oxydant semble une stratégie importante qui donne une évaluation plus précise de la toxicité des métaux lourds au niveau cellulaire.

Les objectifs définis, lors de la mise en place de cette étude étaient de deux types. Le premier visait à constater l'état de contamination des sources d'eau servant à l'alimentation des citoyens de la ville de Jijel par les métaux lourds et à cerner les facteurs et les origines éventuelles de cette contamination. Le deuxième objectif était d'évaluer les effets toxiques de ces métaux sur les biomarqueurs du stress oxydant des mitochondries et des cytosols hépatiques des rats males exposés *in vitro* et *in vivo* aux différentes concentrations des métaux étudiés (plomb, cadmium et zinc).

Deux méthodes analytiques et des mesures tripliquées avec des procédures standardisées de prélèvement, de conditionnement, de conservation et de prétraitement des échantillons ont été mises en oeuvre pour une meilleure estimation des concentrations totales en plomb et en cadmium. La présente étude a permis de mettre au point la présence des concentrations très élevées en plomb et en cadmium qui dépassent de loin les normes requises. A l'issue de ces résultats et à partir des données disponibles sur le contexte géologique de la région, nous pouvons conclure, notamment en absence d'une activité industrielle dans la région, la forte contribution du fond pédogéochimique dans les niveaux élevés de cette contamination. L'altération géologique de la roche mère de sous sol fortement minéralisé enrichie les eaux souterraines du bassin de l'oued Nil en métaux. Il semble possible également la présence de plusieurs autres sources susceptibles d'augmenter l'ampleur de cette contamination :

- Les effluents de l'ancienne mine située en montagne de Chahna (reliefs de la petite Kabylie) sont probablement la principale source anthropique en métaux lourds.
- La source agricole, due essentiellement à l'utilisation irrationnelle par les agriculteurs de la région des pesticides et des engrais chimiques riches en métaux lourds, en particulier les engrais phosphatés.
- L'infiltration du lixiviat en provenance des dépôts de l'ancienne décharge de L'oued Boukarha, un des affluents principaux de l'oued Nil.
- Les déversements incontrôlés d'origine urbaine dans le milieu naturel du bassin.

CONCLUSION

➤ La pollution atmosphérique résultant essentiellement de la combustion des hydrocarbures d'automobiles et des incendies des forêts.

L'analyse toxicologique, *in vitro* et *in vivo*, montre que la réponse cellulaire d'une contamination métallique est caractérisée par

- Une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale.
- Une inhibition puissante de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale.
- Une surproduction importante du MDA mitochondrial et cytosolique.
- Une baisse hautement significative du taux du glutathion total hépatique.

Une réponse cellulaire différente est soulignée vis à vis du zinc dans l'étude *in vitro*. Cette différence suggère le rôle essentiel de ce métal dont les propriétés antioxydantes sont connues. Seules les très fortes et les très faibles concentrations en zinc montrent un effet prooxydant. L'exposition subchronique des rats à une contamination poly métallique en plomb et en cadmium dans les eaux de boisson montre une activité prooxydante dose dépendante. L'augmentation de l'activité enzymatique de la SOD, l'inhibition de celle de la catalase, la surproduction du MDA et enfin la baisse du taux du GSH hépatique sont les marqueurs majeurs de cette activité.

Les résultats obtenus dans ce travail permettent d'envisager de nouvelles perspectives pour les études futures :

- Notre travail a mis en évidence une contamination métallique sûre et dangereuse des sources d'eau d'alimentation de la ville de Jijel. Cette mise en évidence s'est faite par quantification en métal total. Il serait intéressant de compléter ces mesures par l'étude de spéciation de métaux. En effet, la concentration en métal total donne une information importante sur le niveau de la contamination mais ne permet pas d'en déduire sa mobilité ni de connaître ses risques potentiels de toxicité et donc de comprendre son devenir dans les eaux naturelles.
- Notre étude a suggéré le rôle capital du fond géochimique de la région dans l'enrichissement des eaux souterraines en métaux lourds. Il apparaîtrait donc fondamental de préciser ce rôle par des études géologiques plus approfondies et la mesure des teneurs en métaux lourds dans les roches et les sols de la région.
- Il serait également intéressant de réaliser une étude spatio-temporelle, ceci dans le but de documenter l'influence des conditions climatiques sur les changements

CONCLUSION

des niveaux de contamination. Cette perspective s'inscrit dans le long terme, dans la mesure où une étude spatio-temporelle au moins de trois ans est apparue nécessaire pour être représentative de la variabilité des conditions climatiques sur la concentration en métaux lourds des eaux.

- Une suite possible à donner à ce travail serait de compléter l'étude sub-chronique de l'activité prooxydante de la pollution poliomyélictique de l'eau par une étude chronique à long terme. Le temps d'exposition est un paramètre clef dans la détermination de la toxicité. L'étude d'un probable effet synergique avec d'autres métaux ainsi que d'autres contaminants, dont notamment les pesticides, est indispensable pour mesurer les risques émergents liés à cette contamination.
- Enfin, à l'échelle fondamentale, une approche chimique appliquée à moyen, voire à long terme, est apparue absolument nécessaire et d'importance cruciale pour mieux connaître et expliquer les mécanismes réactionnels physico-chimiques régissant les effets biologiques délétères de cette contamination et d'en déduire les risques potentiels de toxicité de métaux lourds sur la santé humaine.

1

ANNEXE

1

ANNEXE 1

1

❖ Fiche d'information sur les conditions d'échantillonnage

Non des sites retenus :

- Source de Boucherchour
- Puits de Redjla
- Forage de l'oued Nil
- Source de Bachelot
- Eaux de citrenes

Date : 11-Avril_2007.

Heure : 15h.

Conditions météorologiques :

- Pluie faible
- Vent faible
- Ciel nuageux.

Température : 15 C°

Type de conditionnement :

- Acidification avec 2 ml d'acide nitrique concentré
- Filtration sous vide.

1

❖ Données sur la période de prélèvement

- Début de printemps
- Période relativement prolongée de sécheresse durant la saison hivernale
- Après forte pluie (la semaine précédente du prélèvement)

1

ANNEXE 2

Tampon TS : QSP 500ml

Sucrose	42,8g
Tris.....	0,60g
pH: 7,2 à 4 C°	

Tampon TSE: QSP 500ml

Sucrose	42,8g
Tris.....	0,60g
EGTA	0,19g
pH: 7, 2 à 4 C°	

Solution hypotonique : QSP 100ml

KH ₂ PO ₄	0,49g
MgCl ₂	0,047g
pH : 7,2	

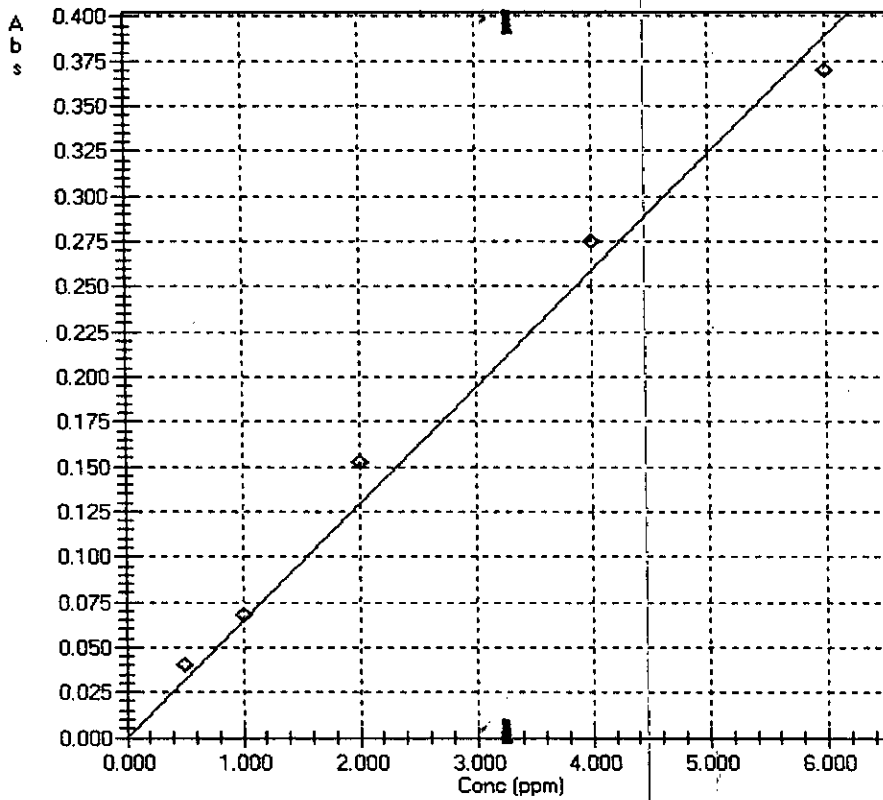
Composition du milieu réactionnel pour le dosage de l'activité enzymatique de la SOD : QSP 10ml du tampon phosphate NaH₂PO₄

Cyanide de sodium 10 ⁻² M	1ml
Solution du NBT 1,76×10 ⁻⁴	0,1ml
EDTA 6,6×10 ⁻³	1ml
Riboflavine 2×10 ⁻⁶	0,1ml
pH : 7,8.	

ANNEXE 3

❖ Courbe d'étalonnage du cadmium par la SAA

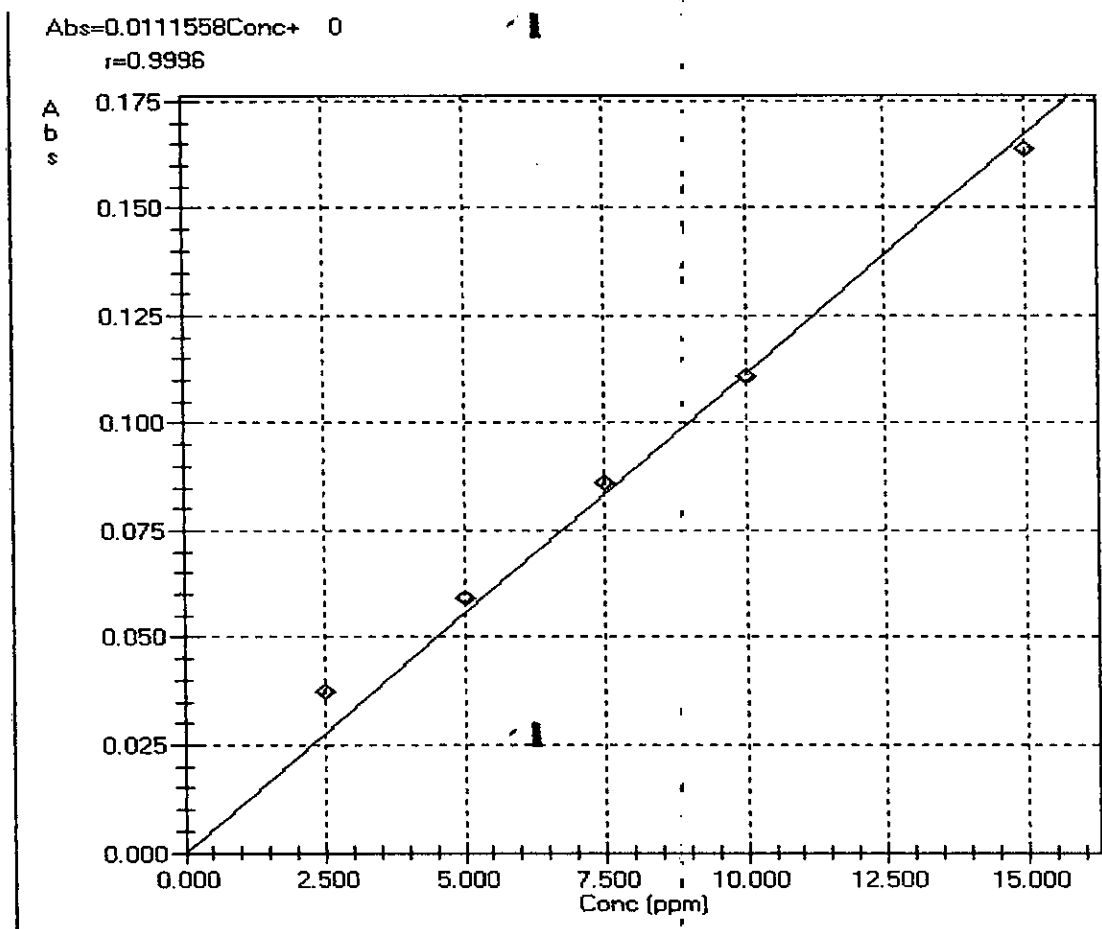
Abs=0.0648576Conc+ 0
r=0.9955



Cd du 12-06-2007

ANNEXE 4

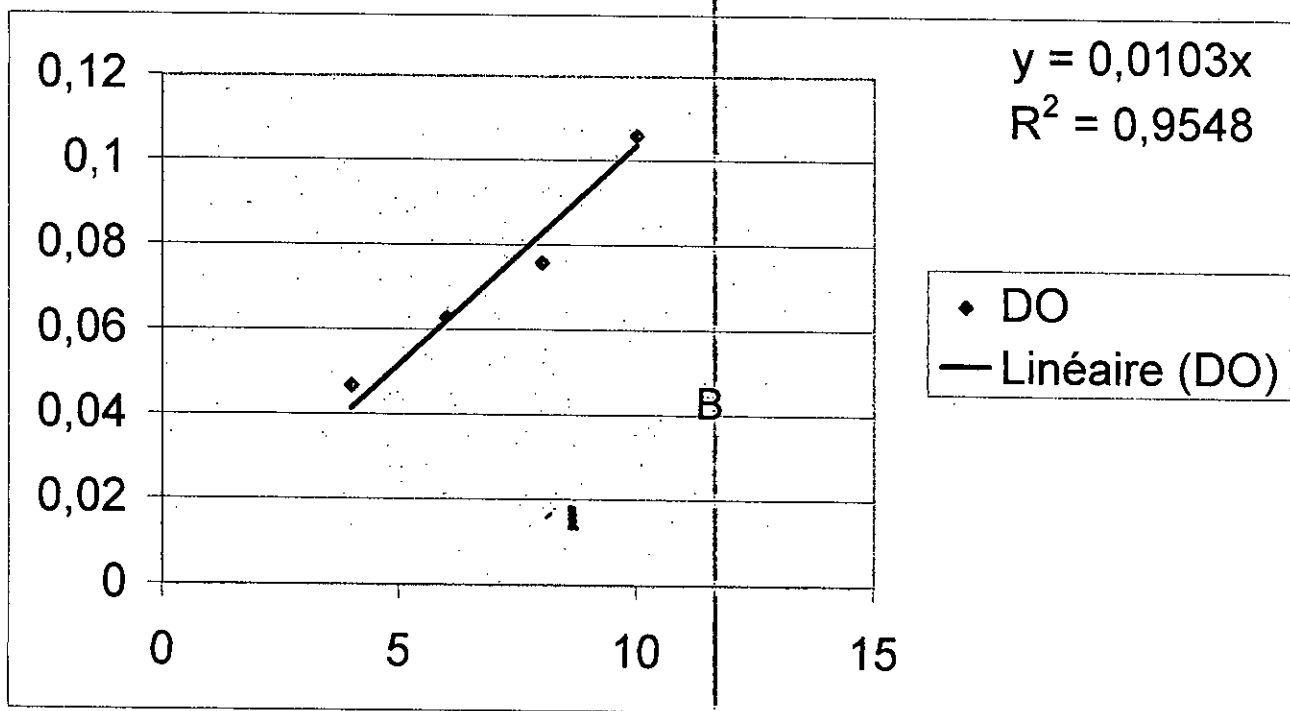
❖ Courbe d'étalonnage du plomb par la SAA



Pb du 12-06-2007

ANNEXE 5

❖ Courbe d'étalonnage du cadmium par la spectrométrie moléculaire



A

- Abou-Arab, A.A., 2001.** Heavy metal contents in egyptian meat and the role of detrgent washing on thier levels. *Food Chem Toxicol.* 39:593-9.
- Ademe, S., 1993.** Composition des ordures ménagères en France. Campagne de caractérisation des ordures ménagères. PP22.
- Adriano, D.S., 1986.** Traces elements in the terrestrial environment. New-York.NY: J.Springer-Verlag.PP533.
- Afalfiz, A., Guy, B., Semourd, B., 1998.** Etude métallogénique des indices minéralisés à Fe, Pb, Zn, Cu, Ba, Ag dans les métacarbonates du socle métamorphique de la région de Taher (Jijel) Algérie. Ministre de mines algérienne.
- Afonso, V., Champy, B., Mitrovie, D., Collin, P., Lomri, A., 2007.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : Rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme* : 2975-2983.
- Ahamed, M., Siddiqui , M.K.J., 2007.** Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta* .383 : 57-64.
- Aiuchi, T., Mihara, S., Nakaya, M., Masuda, Y., Nakajo, S., 1998 .** Zinc ions prevent processing of caspase 3 during apoptosis induced by geeanylgeraniol in HL-60 cells.J. *Biochem.* 124.300-303.
- Ajayi, S.O., Osibanjo, O., 1981.** Pollution studies on Nigerian rivers. 2. Water quality of some Nigerian rivers. *Environ.Pollut.(B)*. 95: 2-87.
- Alloway, B.J., 1995.** Heavy metals in soils. Second edition (eds B.J. Alloway). PP. 387. Blakie academic and professional. London.
- Alloway, B.J., Steinnes, E.,1999.** Anthropogenic addition of cadmium to soil. Cité par : Laughlim, M.J., Singh, B.R., eds: *Cadmium in soil and plants*. K.Luwer academic publishers, Dordrecht, Netherhands, 97:123.
- Alonso, E., Santos, A., Callejan, M., Jimeny, J.C., 2004.** Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution of environmental pollution, Chapman et Halle. London. PP291.
- Ando, M., Osawa, T., 1978.** Studies on the disposition of calcium in bones of rats after continuous oral administration of cadmium. *Toxic. Appl. Pharmac.* 46: 625-632.
- ANRH, 1981.** Agence Nationale des Ressources Hydriques, service hydrologique. Bir Mourad Rais, Alger.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Apostoli, P., 2006. Environmental health criteria 243: Elemental speciation in human health risk assessment- Published under the joint sponsorship of World Health Organization. PP 256.

Armenta, M.M., Rios, C., 2007. Cadmium neurotoxicity. Environmental toxicology and pharmacology. Mexico.350-358.

Asselin, C., Junqua, G., Bouzidi, Y., 2004. Le métabolisme de l'incinérateur d'ordures ménagères Thèse de doctorat, univ de Troyes.PP182.

Atli, G.A., Alptekin, O., Tükel, S., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 143: 218-224

Audry, S., 2003. Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot Garonne Gironde. Thèse de doctorat, univ de BordeauxI, PP441.

Averlant, S., Chaboche, L., Truong, B., Vaudel, F., Valeriano, B., 2006. Rapport d'environnement : Ouvrir le robinet, un geste simple...Quels systèmes derrière ? Quelles évolutions futures ? Rapport de l'école nationale supérieure des mines. Saint Etienne.

B

Badouard, D., 2006. Les lésions des acides nucléiques : Détection par CLHP-SMISM dans les milieux biologiques humaines et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de doctorat, univ de Joseph Fourier-Grenoble.PP228.

Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols. Eds : INRA.

Ballerini, D., Gatelier, C., Vogel, T., 1998. Techniques de traitement par voies biologiques des sols pollués. ADEME .PP246.

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Assay of superoxide dismutase. Anal Biochem, 44:276-287.

Beaudeau, J.L., Delattre, J., Théron, P., Rousselot, B.O., Legrand, A., Peynet, T., 2006. Le stress oxydant, composante physiologique de l'athérosclérose. Immuno- analyse et biologie spécialisée 21. 144-150E.

Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes- Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C.A., Abdalla, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A., Di Mascio, P., 1993. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. Quim. Nova 16, 385_ 892.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beliefert, C., Perraud, R., 2001.** Chimie de l'environnement. Air, eau, sol, déchets. 1^{ière} édition. ISBN. PP 477.
- Bentir, M., 1997.** Bulletin International de l'eau et de l'environnement. No 14. PP23.
- Berger, M.M., Chioloro, R.L., 2001.** Apport d'antioxydants en réanimation : pourquoi, lesquels, avec quels objectifs ? J, Réanimation. 527-534.
- Bernhard, M., Brinckman, F.E., Sadler, P.S., 1986.** The importance of chemical «speciation» in environmental process (Springer-Verlage, Berlin). Dahlem. Konfer enzem, life sciences research report. 33, 736p.
- Berrahal, A.A., Naoufel, A.N., Gharbi, H.N., El-Fazâa, S., 2007.** Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. Pharm, toxic. C. R. Biologies 330 :581-588.
- Berthelin, J., Leyva, C., Toutain, F., 1994.** Biologie des sols : Rôle des organismes dans l'altération et l'humification. Cité par : Bonneau, L., Souchier, B., Pédologie, constituants et propriétés du sol. Tom II. Paris, France. PP 143-237.
- Berthoin, K., 2000.** Etude de la toxicité hépatique de la cocaïne associée à de l'alcool. Thèse de doctorat, univ de Joseph Fourier- Grenoble I. Vol : 211. PP 9-27.
- Berti, W., Rayan, A., 1998.** Use of phosphorus to inactivate Pb in contaminated soils. Compte rendu du 16 ième congrès mondial de science de sol. Montpellier. 2p.CD-ROM.
- Bertin, G., Averbek, D., 2006.** Cadmium : cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences . Biochem 88. 1549-1559.
- Biger, E., 1996.** Mesure du bruit de fond géochimique naturel et mise en évidence de l'influence anthropique en zone rurale : Application au bassin de la Seine. Mémoire de DEA de l'université de Pierre et Marie Curie, Ecole des mines de Paris.
- Biney, C., Amuzu, A.T., Calamari, D., Kaba, N., Mbome, I.L., Naeve, H., Ochumba, O., Osibanjo, O., Radegonede, V., Saad, M.A.H., 2001.** Etude des métaux lourds.
- Blanchard, C., 2000.** Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse de doctorat, univ de Lyon.
- Blanquet, J.P., Bonnomet, V., Coquery, A., Gaudillot, A., Gondelle, F., Houeix, N., Legoff, F., 2004.** Devenir et comportement des métaux dans l'eau. Biodisponibilité et modèles

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BLM. Rapport technique de ministère de l'écologie et du développement durable. Direction de l'eau. PP 87.

BNEDR, 2004. Bureau National d'Etudes pour le Développement Rural, projet de l'inventaire forestier national (2000-2005).

Bodek, I., Lyman, W., Reehi, W., Resenblatt, D., 1988. Environmental inorganic chemistry : Properties, process and estimation méthodes. SETAC spécial publications séries. New York, pergamon press.

Bolduc, J.S. , Denizeau, F., Jumarie, C., 2004. Cadmium-induced mitochondrial membrane-potential dissipation does not necessarily require cytosolic oxidative stress: studies using rhodamine-123 fluorescence unquenching, Toxicol. Sci. 77 (2004) 299-306.

Boucheseiche, C., Cnemille, E., Pelte, T., Pojer, K., 2002. Guide technique N° 7 : Pollution et écotoxicologie : Notions de bases. PP 82.

Bourdon, E., 2000. Stress oxydant et glycation. Etude de l'Albumine et des apolipoprotéines AL et B biosynthétisées par l'hépatocyte humaine en culture et importance chez le diabétique. Thèse de doctorat, univ de Bouryogne. UFR de médecine. PP 222.

Bourdon, E., 2004. Altération oxydative de protéines aux importantes physiologiques : l'Albumine- la protéine de régulation du fer (IRP₂), la superoxyde dismutase, le protéosome. PP157.

Bourrelier, R.J., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces : Les risques et leurs gestions. Rapport N° 42 de l'académie des sciences. Paris, France : Lavoisier. Tec. Doc. Vol : 440pp.

Boveris, A., Chance, B., 1979. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide : General properties and effects of hyper basic oxygen. Biochem J. 134: 707- 716.

Brillant, E., 1993. Effets de l'intoxication au chlorure de cadmium chez la truite Mouchetée : *Salvelinus Fontinalis* . Thèse de doctorat, univ de Québec. PP 157.

Brown, M., Lester, J., 1979. Metal removal in activated sludge : Role of bacterial extra cellular polymer. PP : 817-837.

Brugneaux, S., Pierret, L., Mazatoud, V., 2004. Les agressions d'origine anthropique sur le milieu marin côtier et leurs effets sur les écosystèmes coralliens et associés de la martinique. France.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brunet, S., 1999. Vue sur les mécanismes de contrôle hépatique suite au stress peroxydatif induit par le fer. Thèse de doctorat, univ de Montréal. PP176 :20-36.

Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Gide méthodologique pour la mobilisation des transferts des éléments traces métalliques dans sols et les eaux souterraines. Rapport d'étude. PP119.

C

Campbell, P.G.C., Tessier, A., 1986. Current status of metal speciation. Cité par Patterson, T.W., Passino, R., eds: Proceeding of the international symposium on metal speciation, separation and recovery. Chicago. PP: 201-224.

Carthy, M.C., Hedger, J., Benner, R., 1996. Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. Chem. 55. PP : 281-297.

Casalino, E., Calzaretto, G., Landriscina, C.S.C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. Toxicology 179 ;37-50.

Casas, S., 2005. Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *Mytilus Galloprovincialis* en milieu méditerranéen.

Cayuela, M.M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. Bioch: 147-1167.

Chassin, P., Baize, P., Cambier, H., Stercheman, T., 1996. Les éléments traces métalliques et la qualité des sols : Impact à moyen et à long terme. De forum « Le sol, un patrimoine menacé ? ». Paris.

Chatain, V., 2004. Caractérisation de la mobilisation potentielle de l'arsenic et d'autres constituants inorganiques présents dans les sols issus d'un site minier aurifère. Thèse de doctorat, univ de Lyon. PP : 189.

Chiffolleau, J.F., 2001. La contamination métallique. PP40.

C.I.E.S.M. , 2002. Metal and radionuclides bioaccumulation in marine organisms. C.I.E.S.M workshop monographs n° 19. PP128.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C.I.R.E.I (Cellule Inter Régionale d'Epidémiologie et d'Intervention) ., 2001. Dispistage du saturnisme infantile autour des sources industrielles de plomb. Organisation des programmes de dispistage et évaluation de l'efficacité des mesures de réduction de l'exposition. Tom 2. PP175.

Citeau, L., 2004. Etude des colloïdes naturels présents dans les eaux gravitaires de sols contaminés ; Relation entre nature des colloïdes et réactivité vis à vis des métaux (Zn, Cd, Pb, Cu). Thèse de doctorat, univ de Paris- Grignon.161 :35-78.

Clairborne, A., 1985. Catalase activity. Cité par CRC Hand bouk of CRC press, Boca Raton. PP : 283-284.

Clamarie, D., Naeve, H., 1994. Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain. Archives de documents de la FAO. Document technique du CPCA 25.

Coquery, M., Magaud, H., Bonnomet, V., Le Goff, F., Monet, P., 2004. Analyse critique des méthodologies pour la détermination et l'application de normes de qualité environnementale pour les métaux. Rapport de synthèse de Ministère de l'écologie et du développement durable. Direction de l'eau. INERIS. PP28.

Corralés, M., 1987. Contribution à l'étude électrochimique du cuivre en milieu hydrogénocarbonaté. Thèse de doctorat, univ de Pau et des pays de l'Adour. 199 :78-120.

Cossa, D., 1993. Le plomb en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie de la mer. 77 : 47-57.

Coulon, L., 2005. Effet d'un hydro peroxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans les phospholipides plaquettaires. Thèse de doctorat, univ de Lyon. PP194 .

Crine, M., 1993. Le traitement des eaux industrielles chargées en métaux lourds. Tribune de l'eau. PP 561 : 3-19.

Crosnier, J., 1999. Devenir de la pollution métallique drainée par les eaux pluviales : Influence du compartiment microbien et des alternances de dessiccation/réhumectation sur le transfert du zinc dans la zone non saturée du sol. Thèse de doctorat, univ de Claude Bernard-Lyon I. 282 :39-85.

Cuita, A., 2003. Impact de la bioturbation des sédiments sur les transferts et la biodisponibilité des métaux : Approches expérimentales. Thèse de doctorat, univ de Bordeaux I. 437 :25-32.

D

- Daintith, J., 2004.** Adictionary of chemistry. Oxford university press.
- David, G., Cozalt, M., Sanchez, R.M., 2006.** Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. Journal of theoretical biology. 238: 919-936.
- Debieche, T.H., 2002.** Evolution de la qualité des eaux (salinité, azote et métaux lourds) sous l'effet de la pollution saline, agricole et industrielle : Application à la basse plaine de Seybouse nord-est Algérien. Thèse de doctorat, univ de Franche comité, U.F.R des sciences et techniques. PP235 : 6-35.
- Deby, D.G., Deby, M.L., 2002.** Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. Journal de Réanimation. Editions scientifiques et médicales. Elsevier SAS. 11 :28-39.
- Dechelette, M., Palvadeau, S., 2004.** Mise en place d'une compagne de prélèvement : Projet ecodyn, univ de Toulon et du Var. PP132.
- Décloître, F., 1998.** La part des différents aliments dans l'exposition au plomb, au cadmium et au mercure, en France. Cahier de nutrition et de diététique. Vol 33 (3) : 167-175.
- Desboeuf, K., 2004.** Processus de dissolutions des aérosols atmosphériques au sein de gouttelettes nuageuses. Thèse de doctorat, univ de Paris I. PP232.
- Desjardin, V., 2002.** Réduction du chrome (VI) par la souche Streptomyces thermocarboxyduus NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Thèse de doctorat, univ de Lyon. PP247.
- Devez, A., 2004.** Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur écosystèmes aquatiques. Thèse de doctorat, uni de Montpellier. PP169.
- Diaz-Barriga, F., Llamas, E., Mejia, J.J., Carrizales, L., Santoyo, M.E., Vega- Vega, L., Yanez, L., 1990.** Arsenic-cadmium interaction in rats. Toxicology 64 (2), 191-203.
- Di- Bendetto, M., 1997.** Méthodes spectrométriques d'analyses et de caractérisations. Dossier SAM : Les métaux lourds. Axe « Génie des procédés ». Centre SPIN, école des mines de Saint-Etienne.PP49.

Direction des services agricoles, 2007. L'agriculture par les chiffres. Wilaya de Jijel.

Djellit, H., 1987. Evolution tectono-métamorphique du socle Kabyle et polarité de mise en place des nappes de flyschs en petite Kabylie occidentale (Algérie). Thèse de doctorat, univ de Paris sud. PP206.

Douki, T., Oden, F., Caillat, A., Cabet, J., 2004. Predominance of the 1,N²-propano 2'-desoxyguanosine add to among 4- hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radic Biol med*, 37,22-70.

Drever, J.I., 1988. The geochemistry of natural waters. Prentice Hall, 388pp. Cité par Audry, S., 2003.

Drôge, W., 2002. Free radical in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 47-95.

Duquesne, S., 1994. Pollution métallique et biomarqueurs : les métallothionéines. *Anal. Mag.* 22 (1) : 20-23.

E

Eberhart, J.P., 1989. Analyse structurale et chimique des matériaux. Dunod, Bordas. PP614.

Elbaz, F., Pouliche, T., 2005. Origine et dynamique de la contamination par les métaux et métalloïdes dans les systèmes hydrologiques méditerranéens. URM hydrosciences.

Ellman, G., 1959. Plasma antioxydants. *Arch Biochem Biphys*, 82 :70-77.

Emoto, M., 2002. L'eau et le devenir de la terre. Edes TREDANIEL.

Evans, J.L., 1989. Chemistry of metal retention bysoil. *Environ Sci Technol.* 23. PP 1046-1056.

F

Faure, C., Papegay, Y., 1998. Odyssée user's guide. Version 1.7. Rapport Technique n°0224, INRIA.PP 81.

Fauris, C., Danglot, C., Lundstrom, H., Vilagines, R., 1986. Mesure de la toxicité induite par les matériaux en contact avec l'eau potable. *Journal français d'hydrologie* 17(2) 131-142.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O., 2000.** A mechanistic study of the bacterial effect of silver ions on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. *Jbiochem Mater. Res*,52(4): 262-8.
- Fischer, H., Leopoldi, G., Wiss V., Siemens, K., 1933.** *Angew. Chem.* 47, 90 (1934); *Metall u. Erz* 35, 86, 1938.
- Fischer, J., Arnold, J., 2001.** *Chimie pour biologistes*. Port royal livres. Paris. Eds : Bert. Vol 271 :77-79.
- Florence, T.M., Batley, G.E., 1980.** Chemical speciation in natural waters. *CRC crit, Rev Anal, Chem*, 9:219-296.
- Florence, T.M., 1982.** Development of physico-chemical speciation procedures to investigate the toxicity of copper, lead, cadmium and zinc towards aquatic biota. *Anal Chem. Acta* 141: 73-94.
- Formigari, A., Irato, P., Santo, A., 2007.** Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated- apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comparative biochemistry and physiology. Part C* 146: 343-459.
- Forstner, U., Wittman, G.T.W., 1979.** *Metal pollution the aquatic environment*. Springer verlag. Berlin, Heidelberg, New York, PP486.
- Fowler, B.A., Whittaker, M.H., Lipsky, M., Wang, G., Chen, X.W., 2004.** Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90- day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biometals* 17 (5), 567-568.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., Young, S.L., 1983.** Liposome-mediated augmentation of peroxide dismutase in endothelial cell prevents oxygen injury. *J, Biol Chem*, 258 : 12534-12542.
- Frelon, S., 2001.** Influence de métaux de transition sur la dégradation radicalaire de l'ADN. Thèse de doctorat, univ de Joseph Fourier. Grenoble LPP179.
- Fridovich, I., 1978.** The biology of oxygen radicals. *J Scienc*, 201: 875-80.

G

- Gadd, G.M., 1992.** Metals and microorganisms: a problem of definition. FEMS Microbiol Lett. PP 79 : 197-203.
- Garait, B., 2006.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Gli SoDin^R. Thèse de Joseph Fourier, Grenoble I. PP196.
- Gardas, C.d., 2000.** Influences des conditions physicochimiques sur la mobilité du plomb et zinc dans un sol et un sédiment en domaine routier. Thèse de doctorat, univ de PAU et des pays de l'Adour. PP192.
- Gault, N., 2002.** Réponse précoce aux rayonnements ionisants : Effets moléculaires et cellulaires. PP82.
- Girardi, C.L., 2006.** Caractérisation fonctionnelle d'un facteur d'élongation mitochondrial le EF -T_{smi} chez la tomate, approche par transgenèse et protéomique. Thèse de doctorat, univ de Toulouse. PP130.
- Gogenet, G., 2007.** L'eau : Enjeux et perspectives de recherches. MSTP l'eau. PP101 : 15-39.
- Gray, D.A., MATHER, J. D., HARRISON, I. B., 1974.** Review of groundwater pollution from waste disposal site in England and Wales, with provisional guidelines for future site selection. *Q. J. Engng. Geol.*, 7, 181-196.
- Gutteridge, 1993.** Free radicals in disease processes : A compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*, 19: 141-158.

H

- Hadi, M., 2004.** La quercétine et ses dérivées : Molécules à caractères pro oxydant ou capteur de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat, univ de Louis Pasteur Strasbourg I. PP268.
- Hansford, R.G., Hogue, B.A., Mildaziene, V., 1997.** Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donorage. *J Bioenergy Bioembr.* 29 :89-95.
- Hardivilier, Y., 2005.** Caractérisation et expression des gènes de métallothionéines chez deux modèles hydrothermales : *Bathymodiolus thermophilus* et *Bathymodiolus azoricus*. Thèse de doctorat, univ de Maine UFR sciences et techniques. PP166 :44-50.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Haton, C., 2005. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat, univ de Pierre et Marie Curie. PP168.

Hébrard, L., Meffray, L., 2004. Comparaison de méthodes d'analyse des éléments traces métalliques (ETM) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur les sols et les végétaux. PP121.

Hetland, S., Martinsen, I., Radzuk, B., Thomassen, Y., 1991. Species analysis of inorganic compounds in workroom air by atomic spectroscopy. *Anal. Sci*, 7, 1029-1032.

Ho, E., 2004. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. Reviews: Current topics. *Journal of Nutritional of biochemistry*. 15:572-578

H.S.D.B., 2001. Cadmium. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine. [Http:// www. Toxnet. nlm.nih. gov](http://www.Toxnet.nlm.nih.gov).

Hsu, P.C., Liu, M.Y., Hsu, C.C., Chen, L.Y., Guo, Y.L., 1997. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology* 122, 133_ 143.

Hussain, T., Shukla, G.S., Chandra, S.V., 1987. Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharm. Toxicol.* 60, 355-359.

I

Ikediobi, C.O., Badisa, V.L, Ayuk-Takem, L.T., Latinwo, L.M., West, J., 2004. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells, *Int. J. Mol. Med.* 14 :87-92.

Iqbal, M., Som, D.S., Yasumasa, O., Masayoshi, F., Shigero, O., 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddymal mice : Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocyt. *Pharmacology and toxicology*, 92: 33-38.

Ito, Y., Niiya, Y., Kurita, H., Shima, S., Sarai, S., 1985. Serum lipid peroxide level and blood superoxide dismutase activity in workers with occupational exposure to lead. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 56, 119_ 127.

Itokawa, Y., Tomoko, A., Tabei, R., 1974. Renal and skeletal lesions in experimental cadmium poisoning. *Arch. Environ. Health.* 28:149-154.

J

Jeannot, R., Lemiere, B., Chiron, S., Augstin, F., Darmendrial, D., 2001. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Document du BGRM éds. PP85.

Jenne, E.A., 1986. Controls on Mn, Fe, Ni, Cu and Zn concentrations in soils and water : The signification role OF HYDROUS Mn and Fe oxide: In trace inorganics in water . Baker, R.A(ed), ACS publication # 73, Washington. PP:337-387.

Jérôme, C.J.P., 2006. Spéciation et biogéochimie des métaux dans les milieux estuariens (estuaire de l'Escaut). Synthèse bibliographique de l'université libre de Bruxelles. Dept of earth environmental sciences-isotopes : Pétrology and environment.

Joris, M.A., 2005. Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de doctorat, univ de Bordeaux I. PP265.

Journal Officiel de la République Algérienne N° 60., 2005. Lois. 30 Rajab 1426.

Joyce, J., 2002. Oligo-éléments. Sedit édition. PP54.

Jumarie, C., Fortin, C., Houde, M., Campbell, P., Denizeau, F., 2001. Cadmium uptake by coco-2-cells: Effects of Cd complexation by chloride, glutathione and phytochelation. Toxicol.Appl.Pharmacol.170:29-38.

K

Kan, A., Straff, T., 2002. La qualité de l'eau. Compagne suisse de réassurances. Zurich. PP28.

Kelley, A., Foster, F., Galeffi, F., Gerich, J.F., Turner, A.D., Muller, M., 2006. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative and neurodegeneration. Progress in Neurobiology. 79:136-171.

Kim , Y.K., Choi, J.K., Park, Y.S., 1988. Changes in renal function in cadmium intoxicated rats. Pharmacology & toxicology. 63: 342-350.

Kimball, B.A., Callender, E., Axtman, E.V., 1995. Effects of colloids on metal transport in a river receiving acid mine drainage, upper Arkansas river, Colorado, USA. Appl. Geochem, 10:285-306.

Klaus, D.K., 2007. Cellular stress and intracellular zins dyshomeostasis. Archives of Biochemistry and Biophysics. Minireview. Sci direct.

Kyle, J.H., 1987. The variation in apparent trace metal coplexing capacity of natural waters with plating potential using anadic stripping voltammetry. Environ. Technol letters 8: 181-188.

L

Lacost, A., 2001. Neuroendocrinologie et neuroimmunologie du stress chez un model invertébré, l'huître *Crassostrea gigas*. Thèse de doctorat, univ de Pierre et Marrie Curie Paris 6. PP164.

Lange, B., 1947. Analyse colorimétrique. 3^{ème} édition : DUNOD, édis eurs. Paris. Desoer Liege.

Laperche, V., Dictor, M.C., Clozel, B., Baranger, P., 2004. Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués : Rapport final. BRGM/RP. PP138.

Lauglin, M.C., Sigh, B.R., 1999. Cadmium in soils and plants. Rlewer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands.PP273.

Lawton, L., Donaldson, W.E., 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. Biol. Trace Elem. Res. 28, 83_ 97.

Le floche, M., 2004. Caractérisation physicochimique et traçage des émissions particulières métalliques d'une usine d'incinération d'ordures ménagées dans l'air ambiant, exemple de l'UIOM de Toulon (Var, France). Thèse de doctorat, univ de Droit, d'Economie et des sciences d'Aix- Marseille (Aix Marseille III). PP366 :30, 31,52.

Le goff, F.V.B., 2004. Rapport technique de ministère de l'écologie et du développement durable : Devenir et comportement des métaux dans l'eau : Biodisponibilité et modélisation BLM .PP87.

Lehtihet, A., 1983. Etude hydrogéologique de la plaine alluviale de l'oued Nil (région de Jijel). Mémoire d'ingénieur d'état en hydrogéologie, univ de Houari Boumédiene-Alger (Algérie).PP65.

Leita, L., Denobih, M., Muhlachova, G., Mondini, C., 1995. Bioavaibility and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. Biol. Fertil. Soils.19 : 103-108.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Le noble, V., 2003. Elimination de l'arsenic pour la production d'eau potable : oxydation chimique et adsorption sur des substrats solides innovants. Thèse de doctorat, univ de Limoges. PP165.

Leonard, S.S., Horris, G.K., Shi, X.L., 2004. Metal-induced oxidative stress signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* 37: 1921-1942.

Le pape, H., 2003. Etude des propriétés germicides des fibres de carbones active : application à la décontamination de l'air en cabine de l'avion. Thèse de doctorat, univ de Limoges. PP208.

Levassour, P., Tescier, C., 2001. Teneurs en éléments traces métalliques des aliments et des lisiers de porcs à l'engrais de fruits et de porcelets : journée rech. Porcune en France. 33, 77, 62.

Levesque, E., 2006. Oligoéléments et stress oxydant. *Revue de presse. Alimentation et santé.*

Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursells, S.P., Olson, C., Noble, L.J., Yoshimura, N.P., Berger, C., Chan, P.H., 1995. Dilated cardiomyopathy and neuronal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11: 376-381.

Ligeret, H., Barthelemy, S., Zini, R., Tillement, J.P., Labidalle, S., Morin, D., 2004. Effect of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic Biol Med.* 36: 919-929.

Lopez, E., Arce, C., Oset-Gasque, M.J., Canadas, S., Gonzalez, M.P., 2006. Cadmium induced reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic. Biol. Med.* 40,940-951.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological chemistry.* 193: 265-275.

Lu, C.F., 1992. Toxicologie : données générale. Masson édition. Paris. PP313.

M

Macnee, W., Rahman, I., 1999. Oxidative and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease an Inespircrit. *Car. Med.* 160: 958-65.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Maines, M.D., Kappas, A., 1977.** Metals as regulators of heme métabolisme. 198: 1215-1221.
- Maission, P., Preiser, J.C., Bailligand, J.L., 2002.** Reactive nitrogen species : deleterious or not ? Nutrition Chimique et Métabolisme. 16;248-252.
- Marfak, A., 2003.** Radiolyse GAMMA issus des alcools : formation de lepsides. Thèse de doctorat, univ de Limoges.PP220.
- Martelli, E.A., Rousselet, C., Dycke, C., Bournon, A., Mouler, J.M., 2006.** Cadmium toxicity in animal cells by interference with essentiel metals. Biochem 88: 1807-1814.
- Martignon; M., 2007.** Arsenic, plomb et cadmium : de l'environnement jusqu'au lait...un risque pour la santé humaine?. Mémoire bibliographique de l'étude : « Tansport digestif des Eléments Traces Métalliques (arsenic, cadmium, plomb) chez la vache laitière. Ecole doctorale vétérinaire INPENSAT. Toulouse.
- Martin, F., 2003.** Vanin 1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de doctorat, uni de Méditerranée.PP228.
- Martinelli, I., 1999.** Infiltration des eaux de ruissellement pluvial et transfert de polluant associés dans le sol urbain. Vers une approche globale et pluridisciplinaire. Thèse de doctorat, univ de Lyon. PP207.
- Masso, E.L., Corredor, L., Antonio, M.T., 2007.** Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. J Trace Elements Med Biol , doi:10.1016/j.jtemb.
- Mathlesse, G., 1984.** Insatured zone pollution by heavy metal . Springer-Verlag. 79-93.
- Matsushita, K., Kitagawa, K., Matsuyama, T., Ohtsuki, T., Taguchi, A., Mandai, K., Mabuchi, T., Yagita, Y., Yanagihara, T., Matsumoto, M., 1996.** Effect of systemic zinc administration on delayed neuronal death in gerbil hippocampus. Brain Res.743:362-365.
- Mecum, V., 1999.** Les installations intérieures d'eau potable. Office international de l'eau. PP69.
- Meeus, V.K., Scokart, P.O., Deborger, R., 1989.** Revue de l'agriculture. 4(39): 801-816.
- Messaoudi, I., Ben chaoucha, C., 2002.** Fixation du cadmium par différents tissus et ses effets sur le poids corporel et la calcémie chez un rongeur Gerbillidé. Mérione Shawi Shawi. Mammalia. 60(4): 553-562.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Metiche, M., 2004. Environnement : phénomènes de pollution et techniques de protection. Centre univ de Bechar .Algérie. PP 54.

Miquel, G., 2001. Rapport sur : « Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé ». Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et techniques. PP365.

Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F., Malavolta, M., 2005. Brain, aging and neurodegeneration: Role of zinc ion availability. *Progress in Neurobiology* 75:367-390

Monleau, M., 2005. Biocinétique et toxicologie de l'uranium chez le rat après inhalation aigue et répétées. Thèse de doctorat, univ de Méditerranée (Aix-Marseille). PP 346.

Monserrat, J.M., Maetinez, E.P., Amado, L.L., Martinez, G.M.C., Pinho, L.L.G., Gravo, F.M., Lima, V.J., Bianchini, A., 2006. Pollution biomarkers in estuariene animals: critical review and new prespectives. *Comparative biochemistry and physiology*. CBC-07143. PP 14.

Monterio, H.P., Bechara, E.J.H., Abdalla, D.S.P., 1991. Free radical involvement in neurological porphyries and lead poisoning. *Mol. Cell. Biochem.* 103, 73_ 83.

Moss, B., 1980. The used of waste disposal and water supply in ecology of frech water. Publication B.S. Edition; Bichling 8. Oxford.

Muller, F.L.L., 1996. Interaction of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuariene and coastal waters. *Mas.Chem.* 52: 245-286.

Muller, D., 2004. Analyse génétique et moléculaire du stress arsenic des souches bactériennes isolées d'environnement contaminés par l'arsenic. Thèse de doctorat, univ de Strasbourg I. PP164.

Munnich, A., 1994. Biochemical and biomolecular investigation in the respiratory chain deficiences. *Clin Chim Acta.* 288 : 35-51.

N

Nicholson, F., Chabbers, B., Alloway, B., 1998. Proceedings of the world congress of soil scinece. Montpellier. France.

Nicolau, R., 2005. Caractérisation et quantification des transferts dus aux petites rivières côtières méditerranéennes. Thèse de doctorat, unv de Toulouse. PP198.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Nieboer, E., Richardson, D., 1980. The remplacement of the descriptor « heavy metals » with biologically and chemically significant classification of metal ions. Environmental pollution. PP 2-26.

N'ladon, N., 2005. Rapport national sur le cadmium et le plomb de ministère de l'environnement et des ressources forestières. Direction de l'environnement du Togo. PP35.

Nodera, M., Yanagisawa, H., Wada, O., 2001. Increased apoptosis in variety of tissues of zinc deficient rats life. Sci. 69: 1639-1649.

Nolting, R.F., Helder, W., Dibaar, H.G.W., Geringa, L.J.A., 1999. Contrasting behavior of trace metals in the Scheldt estuary in 1978 compared to recent years. J Sea. Res. 42: 275-290.

Noury, P., Migeon, B., Garric, J., Batut, M., Flammarion, P., 2002. Mise au point des conditions pratiques d'utilisation des biomarqueurs EROD dans un réseau de surveillance. Cem agref. Laboratoire d'écotoxicologie. PP30.

Nriagu, J.O., 1989. Lead and lead poisoning in the antiquity wiley interscience. Toronto.

O

Office National de Météorologie (ONM), 2007. Station météo de Jijel aéroport.

Ognjanovic, B., Zikic, R.V., Stajn, A., Saicic, Z.S., Kostic, M.M., Petrovic, V.M., 1995. The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium. Physiol. Rev. 44, 293-300.

Okhawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. Analytical biochem. 95: 351-358.

Olive. G., 2005. Chimie industrielle. Tom 2 : L'eau. 3^{ème} édition. PP105.

Olivier, G., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse de doctorat, univ de Bordeaux I. PP376.

OMS., 2004. Directive du qualité de l'eau de boisson : 3^{ème} édition. Vol1 : recommandations OMS. Genève.

P

Pagotto, G., 1999. Etude sur l'émission et le transfert dans les eaux et les roches des éléments traces métalliques et des hydrocarbures en domaine routier. Thèse de doctorat, univ de Poitiers. Nantes. PP316.

Panfili, F., 2004. Etude de l'évolution de la spéciation du zinc dans la phase solide d'un sédiment de curage contaminé, induit par phytostabilisation. Thèse de doctorat, école doctorale : Biosciences de l'environnement chimie et santé. PP299.

Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodology for assessing exposure to metals : speciation, bioavailability of metals and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56: 110-121.

Pearson, R.G., 1963. Physical and inorganic chemistry: hard and soft acids and bases. *J of Chem Soc*. 85: 3353-3539.

Pichard, A., 2003. Plomb et ses dérivés. Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. ERIS- DRC.PP90.

Pichard, A., 2005. Cadmium et ses dérivés. Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. ERIS- DRC. PP102.

Picot, C., 2003. Intoxication de l'organisme par les métaux lourds et autres toxiques : le mercure, le plomb et cadmium trois métaux toxiques. Conférence ADNO. Paris.

Pillet, S., 2001. Evaluation du risque immunotoxicologique lié à l'exposition au cadmium chez les phoques gris. Thèse de doctorat, univ de Liège. PP334.

Pillier, F., 2002. Biotex : guide biotoxicologique pour les médecins du travail. INRS. Paris PP202.

Pincemil, J., Bonjean, K., Defraigne, J.O., 2002. Nutrition et stress oxydant : mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition chimique et métabolique*. 16 : 233-239.

Plante, R., Benedetti, J.L., 1998. Définition d'une maladie à déclaration obligatoire ou d'une intoxication et d'une exposition significative : le plomb. Direction des risques biologiques, environnementaux et occupationnels. PP62.

Plassard, F., Winiarski, T., Bonvet, V., 1999. Rétention et spéciation des trois métaux lourds dans le sol d'un bassin d'infiltration d'eau pluvial : comparaison entre les modes d'études statistiques et dynamiques. Proceeding de la conférence internationale sur les nouvelles technologies en assainissement pluvial. Novetéch. Lyon. 457-464.

Potvin, R., 2004. Réduction de la toxicité des effluents des mines de métaux de base et précieux à l'aide de méthodes de traitement biologique. Rapport de synthèse environnementale de l'université de Québec. PP50.

Prouvost, H., Declercq, C., Heyman, C., Roger, L., 2003. Contribution des différentes voies d'exposition au plomb et au cadmium de la population vivant dans le secteur de Noyelles-Godault et Audy. PP78.

Q

Quémerais, B., Cossa, D., 1997. Procedures for sampling and analysis of mercury in natural water. Rapport scientifique et technique, 31 E. Centre ST Laurent.

R

Ramonatoxo, K.C., 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition clinique et métabolisme. 20 : 165-177.

Rapport national MEDPOL., 2005. Rapport relatif au plomb et cadmium. Ministère de l'Aménagement du territoire, de l'eau et de l'environnement. PP23.

Reid, M.B., Khawli, F.A., Moody, M.R., 1993. Reactive oxygen in skeletal muscle. Contractility of unfatigued muscle. J Appl Physiol. 75; 1081-7.

Remon, E., 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanées des friches métalliques : vers une nouvelle méthode de bio dépollution. Thèse de doctorat, univ de Jean Nonnet. PP166.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ribarov, S.R., Bochev, P.G., 1982. Lead_hemoglobin interaction as a possible source of reactive oxygen species* a P.-C. Hsu, Y.L. Guo / Toxicology 180 (2002) 33_44 43 chemiluminescent study. Arch. Biochem. Biophys. 213, 288_292.

Richter, J., 1999. The soil as a reactor . Modelling processes in the soil. Han nover Allemagne. PP192.

Rico, A., 2000. Pollutions et pratiques agricoles : deux concepts, dose journalière admissible et chimiodéfense. C R Acad. Paris. 323(200) : 435-440.

Roche, P.A., Gilles, B., 2005. Les enjeux de recherches liés à la directive cadre eau européenne sur l'eau. C.R.Géoscience. 337 : 243-247.

Rodier, J., Bazin, C., Boutin, J.P., Chanbon, P., Rodi, L., 1996. L'analyse de l'eau. 8ième édition.

Roeder, V., 2006. Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune *Laminaria Digitata*. Thèse de doctorat, univ de Rennes 1. PP264.

Ross, H., 1999. Léau et santé publique. Bureau d'audiences publiques sur l'environnement. PP37.

Rosset, P., 2006. Fiche d'impact sur la santé. TIRU. Service DT/ SASE. No 6.

Rouessac, F., Rouessac, A., 2000. Analyse chimique ; méthodes et techniques instrumentales modernes. Sième édition. Dunob, Paris. PP133.

Rousselot, D.B., Peynet, J., Beaudoux, J.L., Théron, P., Le grand, A., Delath, J., 2007. Stress oxydant, fonctions vasculaires et athéroscléroses. Nutrition clinique et métabolisme. 16 : 260-267.

RÜGGE, K., BJERG, P.L., CHRISTENSEN, T.H., 1995. Distribution of organic compounds from municipal solid waste in the grounwater down gradient of lanfill (Grindsted, Danemark). *Envir. Sc. Technol.*,39, 1395-1400.

Rustin, P., Chretin, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, G.M., Munnich, A., 1994. Biochemical and molecular investigation in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 228:35-51.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

S

- Saad, M.A.H., 1990.** Bases scientifiques du contrôle de la pollution dans les eaux intérieures Africaines. Charges organiques d'origine domestique et industrielle. *FAO Rapp. Pêches*, (437):7-32.
- Salomons, W., 1995.** Environmental impact of metals prevention from mining activities : processes, predictions, prévention. *J Géochim. Explor.* 52 : 5-23.
- Sandhir, R., Julka, D., Gill, K.D., 1994.** Lipoperoxidative damage on lead treatment in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol.* 74, 66_ 71.
- Santon, A., Formigari, A., Albergoni, V., Irato, P., 2006.** Effects of zinc treatment on wild type and MF null cell lines in relation to apoptotic and / or necrotic processes and on MT isoform gene expression. *Biochem Biophys Acta.* 1763 : 305-312.
- Santschi, P.H., Lenhart, J.J., Honeyman, B.D., 1997.** Heterogeneous process affecting trace contaminant distribution in estuaries : the role of natural organic matter. *Mar Chem.* 58 : 99-125.
- Sarkar, S., Yadav, P., Bhatnagar, D., 1997.** Lipid peroxidative damage on cadmium exposure and alteration in antioxidant system in rat erythrocytes: a study with relation to time. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11, 8-13.
- Sarr, M., 2004.** Modulation de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) en physiologie vasculaire : intérêt des stocks mobilisables de NO et des antioxydants naturels. Thèse de doctorat, univ de Louis Pasteur. PP188.
- Sasseville, J.L., 1980.** La problématique des substances toxiques dans l'environnement. Tom1 : l'agression toxique. Bureau sur les substances toxiques. Ministère de l'environnement. Québec. PP46.
- Sauvant, M.P., Pepin, D., Bohatier, J., 1995.** Chemical and in vitro toxicological evaluations of water packaged in polyvinyl chloride and polyethylene terephthalate bottles. *Food Additives and Contaminants* 12(4), 567-584.
- Servais, S., 2004.** Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga3; Thèse de doctorat, univ de Claude Bernard Lyon I. PP163.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shaheen, D.G., 1975.** Contribution of urban roadway to water pollution. Rapport de EPA, n EPA-600/2-75-004.PP118.
- Shih, C.M., Ko, W.C., Wu, J.S., Wei, Y.H., Wang, L.F., Chang, E.E., Lo, T.Y., Cheng, H.H., Chen, C.T., 2004.** Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 91: 384-397.
- Shuilleablain, N., Mothersill, S., Sheeham, D., 2006.** Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 65: 332-341.
- Shukla, G.S., Chiu, J.F., Hart, B.A., 2000.** Cadmium-induced elevations in the gene expression of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung and alveolar epithelial cells. *Toxicology* 151, 45-54.
- Sigg, L., Warner, S., Berla, P., 1992.** Chimie des milieux aquatiques. Masson, Paris. PP225.
- Silvestre, F., 2005.** Réponse à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin : *Ericheir Sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse de protéine. Thèse de doctorat, univ de Notre dame de la paix. PP72.
- Simon, D., 2004.** Modèles murins pour l'ataxie de Friedreich : de la caractérisation aux essais thérapeutiques. Thèse de doctorat, univ de Louis Pasteur. PP219.
- Smets, H., 2005.** Pour un droit effectif à l'eau potable. Académie de l'eau. ALESN; Nanterre. PP142.
- Soares, A.F., 2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat, univ de Lyon. PP133.
- Sobhi, Y., 1997.** Toxicologie des métaux lourds chez les organismes aquatiques; aspects environnementaux et expérimentaux. Thèse de doctorat, univ de Fès, Maroc. PP300.
- Sposito, G., 1986.** The polymer model of thermochemical clay mineral stability. *Clays and Clay minerals.* 34 : 198-203.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Digiulio, R.T., Forlin, L., Fowler, B.H., Sanders, B.B., Vanheld, P.A., 1992.** Molecular and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Editors : Michigan, USA; Louis Publishers.
- Stohs, S.J., Baghi, D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 18 (2) : 321-36.

Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Jell, R., Gulotta, V.C., 2001. A fraction of yeast Cu Zn superoxide dismutase and its metallochaperone, ccs, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem.* 276 : 38084- 38089.

Sunitha, M., Nagaraj, P., Varalakshmi, 2001. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* 72Ž.516_523.

T

Tekkouk, M., 2005. Etude de la pollution par les sulfates des eaux du bassin versant de l'oued Djendjen. Mémoire de magister en hydrogéologie, univ de Constantine. PP262.

Templeton, M.D., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G., Muntau, H., Vanleenwen, H.P., 2000. IUPAC guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of trace elements. *Pure Appl Chem.* 72: 72-143.

Tessier, A., Turner, D.R., 1995. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. New York : John Wiley and Son eds. PP679.

Thévenot, D.R., Lestel, L., Tusseau, M.H., Genzalez, V.J.L., Mybech, M., 2007. Les métaux dans le bassin de la Seine : un exemple de circulation dans l'anthropocene. PIRN-Plaquette. PP64.

Tierra toxic., 2002. Terrorisme chimique ?. *Revue de toxicologie.* Lyon. France. (4) .PP28.

Toppi, D.S., Gabrieli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany.* 41 : 105-130.

Toulon, M., 2004. Conséquences moléculaires des expositions aiguës et chroniques à l'uranium sur le transcriptome murin. Thèse de doctorat, univ de Montpellier. 25-75.

Town, R.M., Felella, M., 2002. Implication of natural organic matter binding heterogeneity on understanding lead (II) complexation in aquatic systems. *The science of total environment.* 143-153.

U

UNESCO., 2003. L'eau pour les hommes, l'eau pour la vie. Rapport mondial sur la mise en valeur des ressources en eau. PP36.

V

Valko, M., Pihodes, J.C., Moncol, J., Izatovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induces cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 1601-40.

Verloo, M., 2003. Les métaux lourds dans les denrées alimentaires : origines et évolution des teneurs. Faculté des sciences agronomiques et biologiques. Université GENT.

Veschambre, S., 2006. Caractérisation et quantification des éléments traces métalliques dans les dépôts et les particules atmosphériques de la vallée de l'Aspe (Pyrénées) .Mise en place d'indicateurs de la qualité de l'air lié au trafic routier. Thèse de doctorat, univ de Pau et Pays de l'Adour. PP336.

Vicente, N., 1983. Action des polluants sur les écosystèmes littoraux méditerranéens. *Oceanis*. 9 : 481-492.

Vincent, R., Gasperi, J., Azimi, S., Celaudon, T., Moilleron, R., Cebbo, C., 2004. Hydrocarbons and heavy metals fixed to the life station sediments of Paris agglomeration. PP30.

W

Wang, G., Fowler, B.A., 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* doi:10.1016/j.taap.01.017.

Watanabe, M., Henmi, K., Ogawa, K., Suzuki, T., 2003. Cadmium dependant generation of reactive oxygen speis and mitochondrial DNA breks in photosynthetic and photosynthetic strain of *Euglema gracilis*. *Camp Biochem Physiol. C-toxicol Pharmacol.* 134/ 2276234.

Watjen, W., Cox, M., Biagioli, M., Beyermann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells : mediation

Weissenhorn, I., 1999. Les mycorhizes à arbuscules dans des sols pollués par des métaux lourds : tolérance aux métaux et rôle dans leur transfert aux plantes. Thèse de doctorat, univ de Nancy I. PP166.

Weissgarten, J., Berman, S., Modai, D., Rosenberg, R., Rapoport, M., Colen, M., Avertukh, Z., 2002. Zinc metabolism affects apoptosis rate and proliferative responsiveness of PBMC from patient on chronic hemodialysis. *Metabolism*. 51 : 1392-1396.

WHO., 1992. World Health Organization: our planet, our health. Geneva. PP282.

Wieseman, D.A., Wells, M.M., Hubbard, M., Welker, J.E., Black, S.M., 2007. Alteration in zinc homeostasis underlies endothelial cell death induced by oxidative stress from acute exposure to hydrogen peroxide. *Am J Physiol, Lung Cell Mol. Physiol.* 292; 2165-2177.

Wilser, O., 2004. L'eau un bien commun. Edition Gunars Briedis. PP36.

Wink, D.A., Cook, J.A., Kim, S.Y., Vodotz, Y., Pacelli, R., Krishna, M.C., 1997. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates, chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem.* 272: 11147- 517.

Y

Yanagisawa, H., Sato, M., Nodera, M., Wada, O., 2004. Excessive zinc intake elevates systemic blood pressure levels in normotensive rats. Potential role of superoxide induced oxidative stress. *J Hypertens.* 22:543-550.

Yáñez, L., Carrizales, L., Zanatta, MT, Mejía, JJ, Batres, L, Díaz-Barriga, F, 1991. Arsenic-cadmium interaction in rats: toxic effects in the heart and tissue metal shifts. *Toxicology* 67 (2), 227-234.

Yang, J.L., Chao, J.L., Lin, J.G., 1996. Reactive oxygen species may participate in mutagenicity and mutational spectrum of cadmium in Chinese hamster ovary-K1 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 9:1360- 1367.

Yong, R.N., Mohamed, A., Warkentin, B., 1992. Principles of contaminant transport in soil. Amsterdam, Netherlands. PP73.

Z

Zikic, R.V., Stajn, A.S., Ognjanovic, B.I., Kostic, M.M., Pavlovic, S.Z., Petrovic, V.M., 1998. The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 17, 259-264.

Zmirou, D., 2000. Quels risques pour notre santé? . Edition Suros. Paris. PP335.

NOM BELLI	PRENOM NASSIMA	Date de soutenance Juin 2008
La contamination potentielle des eaux d'alimentation de la ville de Jijel par les métaux lourds serait elle responsable de stress cellulaire ?		
RESUME		
<p>Les métaux lourds sont des constituants naturels de la croûte terrestre qui peuvent se disséminer, notamment dans l'environnement aquatique, par l'intermédiaire de phénomènes naturels ou par certaines activités humaines qui favorisent leur dispersion. Le but de notre travail est de constater en premier lieu l'état de contamination des sources d'eau d'alimentation de la ville de Jijel par les métaux et d'évaluer les origines éventuelles de cette contamination, et en deuxième lieu d'évaluer l'effet pro oxydant de ces métaux, in vitro et in vivo, sur un modèle de mitochondries et de cytosols hépatiques des rats. Les analyses chimiques effectuées ont révélé une contamination dangereuse de toutes les sources d'eau de la région. La plus grande partie de cette contamination provienne de la nature minéralisée du fond géochimique ainsi que d'autres sources anthropiques dont notamment les effluents de l'ancienne mine de Chahna, les effluents agricoles et domestiques et les dépôts atmosphériques. In vitro, le plomb et le cadmium montrent un effet pro oxydant puissant même à faibles doses, alors que le zinc n'est toxique qu'avec les plus fortes et les plus faibles doses. Cet effet est traduit par une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale, une inhibition de l'activité de la CAT cytosolique et mitochondriale, une surproduction du MDA mitochondrial et cytosolique et enfin une diminution du taux du GSH hépatique. Les mêmes effets sont également obtenus in vivo chez les rats exposés pendant 30 jours à une contamination polymétallique en plomb et en cadmium des eaux de boisson. L'ensemble de résultats obtenus montre que le niveau alarmant de cette contamination nécessite la mise en place de moyens de lutte contre cette contamination.</p>		
Mots-clefs : métaux lourds, plomb, cadmium, eau, stress oxydant, SOD, CAT, MDA, GSH.		
Abstract		
<p>The heavy metals are natural constituents of the terrestrial crust that can himself dessiminer, notably in the aquatic environment, by the natural phenomenon acting or by certain human activities that encourage their scattering. The goal of our work is in the first place to evaluate the state of contamination's sources of drinking water in Jijel by metals and to evaluate the possible origins of this contamination, and in second place to investigate the prooxydant effect of these metals, in vitro and in vivo, on a model of mitochondria and hepatic cytosol of rats. The chemical analyses revealed a harmful contamination of all regions' water sources. The biggest part of this contamination comes from the mineralized nature of bottom geochemical as well as others anthropogenic sources which notably sewages of the ancient mine of Chahna, the agricultural and domestic sewages and the atmospheric deposits. In vitro, the lead and the cadmium show a powerful prooxydant effect even to low doses, whereas zinc is only toxic with high and low doses. This effect is translated by a highly meaningful increase of cytosolic and mitochondrial SOD activity, an inhibition of cytosolic and mitochondrial CAT activity, an overproduction of cytosolic and mitochondrial MDA and finally a reduction of the rate of the hepatic GSH. The same effects are obtained also in vivo at rat exposed during 30 days to a mixture contamination of lead and cadmium of the drinking waters. The whole of results obtained watch that the alarming level of this contamination requires the setting up of struggle means against this contamination.</p>		
Word-keys: heavy metals, lead, cadmium, water, stress oxidizing, SOD, CAT, MDA, GSH,,		
ملخص		
<p>المعادن الثقيلة هي مكونات طبيعية للقشرة الأرضية تتواجد في كل الأوساط الطبيعية و خصوصا في الوسط المائي عن طريق الظروف الطبيعية أو بعض الأنشطة الإنمائية التي تساعد على انتشارها. الهدف من هذا العمل هو تحديد درجة تلوث مصادر مياه الشرب لمدينة جيجل بهذه المعادن مع محاولة تحديد المصادر المحتملة لهذا التلوث من جهة مع دراسة الأثر المؤكسد من جهة أخرى داخل خلويًا وخارج خلويًا على عينة من ميتكوندريا و هيولة خلايا كبد الفئران. نتائج التحاليل الكيميائية لبحثنا أثبتت نسبة تلوث خطيرة لكل مصادر المياه بالمنطقة. المصدر الأساسي المحتمل لهذا التلوث هو الطبيعة الجيوكيميائية لتربة المنطقة الغنية طبيعيًا بالمعادن مع وجود مصادر أخرى خارجية كالمخلفات المعدنية للمنجم السابق بجبال الشحنة و مخلفات الأنشطة الزراعية و التلوث الهوائي. داخل خلويًا الرصاص و الزرنيخ اظهرا اثر تأكسدي قوي حتى مع التراكيز الضعيفة في حين أن الزنك لم يظهر هذا الأثر إلا مع التراكيز القوية جدا و الضعيفة جدا. هذا الأثر السمي ترجم برفع نشاط إنزيم السوبر أكسيد ديسمناز داخل كل من الميتكوندريا و الهيولة، تثبيط نشاط إنزيم القتالاز في الميتكوندريا و الهيولة، رفع إنتاج دي الذهب ما لونيك في الميتكوندريا و الهيولة و أخيرا انخفاض في نسبة القلوثاتيون الكبدية. نفس الأثر السمية تم الحصول عليها في الدراسة داخل خلوية على فئران تم تعريضهم لمدة 30 يوما إلى تلوث معدني مزدوج من الرصاص و الزرنيخ من خلال مياه الشرب. مجموع النتائج المتحصل عليها تظهر أن مستويات التلوث المعدني بالمنطقة جد منفره مما يوجب ضرورة البحث عن سبل لمكافحتها.</p>		
الكلمات المفتاح : المعادن الثقيلة، الرصاص، الزرنيخ، الماء، الجهد التأكسدي، السوبر أكسيد ديسمناز، القتالاز، دي الذهب ما لونيك، القلوثاتيون.		