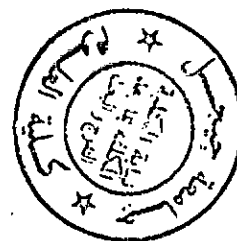
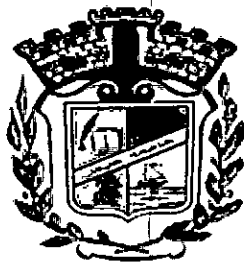


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET ENVIRONNEMENT



MEMOIRE

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

OPTION : ECOTOXICOLOGIE

THEME

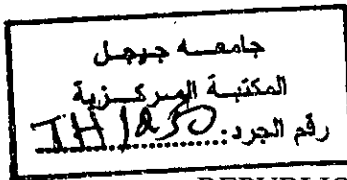
ETUDE DU STRESS OXYDATIF SECONDAIRE A LA CONTAMINATION  
POTENTIELLE DES EAUX D'ALIMENTATION DE LA VILLE DE JIJEL PAR LES  
PESTICIDES

CHEBAB SAMIRA

Juin 2008

**MEMBRES DE JURY :**

PRESIDENT	: Dr LEGHOUCHI Essaid	(Pr)	Université de Jijel
RAPPORTEUR	: Dr LAHOUEL Mesbah	(M.C)	Université de Jijel
EXAMINATEUR	: Dr BENLARIBI Mostefa	(Pr)	Université de Constantine
EXAMINATEUR	: Dr MENAD Ahmed	(M.C)	Université de Constantine
EXAMINATRICE	: Dr AMEDDAH Souad	(M.C)	Université de Constantine



571.9/7

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 ENVIRONNEMENT



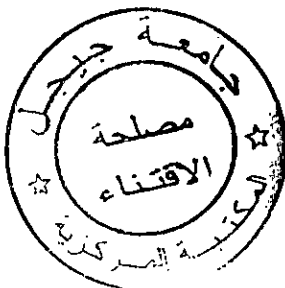
MEMOIRE

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

OPTION : ECOTOXICOLOGIE

THEME

ETUDE DU STRESS OXYDATIF SECONDAIRE A LA CONTAMINATION  
POTENTIELLE DES EAUX D'ALIMENTATION DE LA VILLE DE JIJEL PAR LES  
PESTICIDES



CHEBAB SAMIRA

Juin 2008

**MEMBRES DE JURY :**

PRESIDENT	: Dr LEGHOUCI Essaid	(Pr)	Université de Jijel
RAPPORTEUR	: Dr LAHOUEL Mesbah	(M.C)	Université de Jijel
EXAMINATEUR	: Dr BENLARIBI Mostefa	(Pr)	Université de Constantine
EXAMINATEUR	: Dr MENAD Ahmed	(M.C)	Université de Constantine
EXAMINATRICE	: Dr AMEDDAH Souad	(M.C)	Université de Constantine

## Remerciements

Je voudrais en tout premier lieu, remercier mon Dieu le tout puissant qui m'a donné la capacité afin d'accomplir ce travail et qui m'a guidé vers le bon chemin.

J'aimerais témoigner ma profonde gratitude et sincère reconnaissance à mon encadreur, le docteur **Lahouel Mesbah** qui a dirigé ce travail dans des dispositions pédagogiques et humaines particulièrement agréables et incitatives. Je lui tire ma propre révérence pour son humilité dans le partage du savoir, sa rigueur scientifique, son exigence, ses précieux conseils, sa disponibilité et ses encouragements, en me faisant profiter de son expérience et ses connaissances scientifiques.

J'exprime mes plus vifs remerciements, et ma reconnaissance toute particulière à l'égard de monsieur le docteur **Leghouchi Essaid** professeur et doyen de la faculté des sciences de l'Université de Jijel pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et mettre à ma disposition tous les moyens pour mener à bien cette étude ainsi que d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de présider le jury de soutenance.

Je remercie particulièrement et très sincèrement monsieur le professeur **Benlaribi Mostefa** de l'Université de Constantine, monsieur le docteur **Menad Ahmed** de l'Université de Constantine et madame le docteur **Ameddah Souad** de l'Université de Constantine, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner mon travail.

Je tiens également à remercier vivement et très particulièrement monsieur **Tekouk Mustapha**, Maître-assistant en hydrogéologie à l'Université de Jijel pour le temps qu'il m'a consacré et pour les aides et les fructueux conseils qu'il m'a prodigués.

Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance à monsieur **Desdous A/Rachid** pour son aide précieuse et toutes les explications intéressantes qu'il m'a fournies. Sa compétence et sa grande connaissance des techniques analytiques m'ont été d'une grande utilité pour mener à bien les dosages par GC/SM.

Je remercie vivement monsieur **Bousdira Aphia** pour son aide précieuse et sa disponibilité durant toute la période de la réalisation de mon travail au laboratoire.

Je tiens à exprimer aussi mes vifs et sincères remerciements à monsieur **Mester Ryad** ingénieur agronome, grâce à qui j'ai pu recueillir de nombreuses données et de renseignements sur les pratiques agricoles et l'utilisation de produits phytosanitaires dans la wilaya de Jijel.

J'associe dans une pensée amicale l'ensemble de mes « collègues » : **Nassima, Fatiha, Krenfla, Widad, Safia, Massika et Hassna** pour leur sympathie et surtout pour l'ambiance amicale dans laquelle s'est déroulé ce travail.

Je ne serais bien sûr jamais arrivée là sans l'aide et le soutien de ma famille. Merci à mes parents pour avoir toujours cru en moi, merci de m'avoir soutenue dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout. J'espère vous rendre le bonheur que vous m'apportez.

# SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>01</b>
<b>II. LES PESTICIDES.....</b>	<b>03</b>
II.1. DEFINITION.....	03
II.2. CLASSIFICATION.....	03
II.3. CADRE LEGISLATIF ET REGLEMENTAIRE.....	07
II.4. COMORTEMENT ET TRANSFERT DANS L'ENVIRONNEMENT.....	07
II.4.1. Processus de rétention.....	08
II.4.2. La dégradation des pesticides.....	09
II.4.2.1. La dégradation abiotique.....	10
II.4.2.2. La dégradation biotique.....	10
II.4.3. Transfert vers d'autres systèmes.....	11
II.4.3.1. Transfert vers l'atmosphère : volatilisation.....	12
II.4.3.2. Transfert vers les milieux aqueux.....	12
II.4.3.2.1. Transfert vers les eaux de surface : ruissellement.....	13
II.4.3.2.2. Transfert vers les eaux profondes : lixiviation et lessivage.....	14
II.4.3.2.2.1. Facteurs influençant la contamination de l'eau souterraine par les pesticides.....	15
II.5. EFFETS TOXIQUES DES PESTICIDES.....	18
II.5.1. Effets sur la santé humaine.....	18
II.5.1.1. Cancérogenèse.....	19
II.5.1.2. Effets sur la reproduction.....	19
II.5.1.3. Perturbation du système endocrinien.....	19
II.5.1.4. Effets sur le système immunitaire.....	20
II.5.1.5. Effets neurologiques.....	20
II.5.2. Impact environnemental : écotoxicologie.....	21
II.5.2.1. Effets nocifs sur la microflore du sol.....	21
II.5.2.2. Effets nocifs sur les mammifères.....	21
II.5.2.3. Effets nocifs sur la faune aquatique.....	22
<b>III. LE STRESS OXYDANT.....</b>	<b>23</b>
III.1. DEFINITION.....	23

III.2. PRINCIPALES SOURCES DES DERIVES REACTIVES DE L'OXYGENE .....	25
III.2.1. Sources endogènes.....	25
III.2.1.1. L'auto-oxydation de petites molécules.....	25
III.2.1.2. Xanthine oxydase .....	26
III.2.1.3. NADPH oxydase .....	26
III.2.1.4. Réticulum endoplasmique .....	26
III.2.1.5. Peroxysomes.....	27
III.2.1.6. Mitochondrie .....	27
III.2.1.6.1. Fonction de la mitochondrie et production des ROS.....	28
III.2.2. Sources exogènes.....	30
III.3. SYSTEMES ANTIOXYDANTS .....	30
III.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	30
III.3.1.1. Superoxyde dismutases (SOD).....	30
III.3.1.2. Glutathion peroxidase (GPx).....	31
III.3.1.3. Les catalases .....	32
III.3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques .....	32
III.3.2.1. Les oligoéléments.....	32
III.3.2.2. Glutathion.....	33
III.3.2.3. Ubiquinone et cytochrome C.....	33
III.3.2.4. Vitamine E et vitamine C .....	33
III.4. DEGATS OXYDATIFS CELLULAIRES.....	34
III.4. 1. Oxydations des protéines .....	34
III.4. 2. Peroxydation lipidique .....	35
III.4. 3. Dommages de l'ADN.....	35
III.4. 4. Activation du pore de transition de perméabilité .....	36
III.5. LE STRESS OXYDANT INDUIT PAR LES PESTICIDES .....	37
III.5.1. Le métabolisme des pesticides .....	38
III.5.1.1. Métabolisme des pesticides organophosphorés.....	38
III.5.1.2. Métabolisme des carbamates.....	40
III.5.1.3. Métabolisme des organochlorés .....	41
<b>IV. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>42</b>
IV.1. ANALYSE DE RESIDUS DE PESTICIDES DANS L'EAU.....	42

IV.1.1. Présentation de la zone d'étude .....	42
IV.1.1.1. Situation géographique .....	42
IV.1.1.2. Climatologie .....	43
IV.1.1.3. Activités agricoles .....	44
IV.1.1.4. Utilisation des produits phytosanitaires dans la région .....	45
IV.1.2. Sites et moments de prélèvement des eaux souterraines .....	46
IV.1.3. Procédure d'échantillonnage .....	47
IV.1.4. Choix de la méthode d'extraction .....	47
IV.1.4.1. Protocole d'extraction .....	48
IV.1.5. Choix de la méthode d'analyse .....	48
IV.1.5.1. Principe de CPG / SM .....	49
IV.1.5.2. Appareillage .....	50
IV.2. EVALUATION DU STRESS OXYDANT LIE AUX PESTICIDES .....	51
IV.2.1. Animaux .....	51
IV.2.2. Traitement des animaux .....	51
IV.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement de foie .....	52
IV.2.4. Préparation des mitochondries hépatiques .....	52
IV.2.5. Extraction de la matrice mitochondriale .....	53
IV.2.6. Extraction de la fraction cytosolique .....	53
IV.2.7. Dosage de MDA mitochondrial .....	53
IV.2.8. Dosage de MDA cytosolique .....	54
IV.2.10. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale .....	55
IV.2.11. Mesure de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale .....	55
IV.2.12. Dosage du glutathion hépatique .....	56
IV.3. EVALUATION STATISTIQUE .....	57
IV.3.1. La corrélation .....	57
IV.3.2. Test de Student .....	57
<b>V. RESULTATS ET INTERPRETATION .....</b>	<b>58</b>
V.1. RESULTATS DE LA RECHERCHE DES RESIDUS DE PESTICIDES DANS L'EAU .....	58
V.2. ETUDE DE L'EFFET DES PESTICIDES SUR LA BALANCE ANTIOXYDANT-PROOXYDANT MITOCHONDRIALE ET CYTOSOLIQUE .....	66
V.2.1. Etude de l'effet des deux pesticides sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cytosolique <i>in vitro</i> .....	66

V.2.1.1. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale induite <i>in vitro</i> par les deux pesticides.....	66
V.2.1.2. Evaluation de l'activite des enzymes antioxydantes .....	68
V.2.1.2.1. Evaluation de l'activite enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale.....	68
V.2.1.2.2. Evaluation de l'activite enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale.....	71
V.2.2. Etude de l'effet des deux pesticides sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cytosolique <i>in vivo</i> .....	73
V.2.2.1. Evaluation des taux du MDA mitochondrial et cytosolique.....	73
V.2.2.2. Evaluation des taux de glutathion hepatique .....	76
V.2.2.3. Evaluation de l'activite des enzymes antioxydantes.....	78
V.2.2.3.1. Evaluation de l'activite enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale.....	78
V.2.2.3.2. Evaluation de l'activite enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique.....	80
<b>VI. DISCUSSION .....</b>	<b>83</b>
<b>VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>96</b>
<b>VIII. ANNEXES .....</b>	<b>99</b>
<b>IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>113</b>

# Liste des abréviations

2,4-D	2,4-dichlorophenoxy ethanoic acid
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
AIF	Apoptosis inducing factor
ALT	Alanine aminotransférase
ANT	Translocase des nucléotides adényliques
Apaf 1	Apoptosis Activating Factor 1
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine tri-phosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
C°	Degré Celsius
CAS	Chemical Abstract Service
CAT	Catalase
ClO <sup>-</sup>	Hypochlorite
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CPF	Chlorpyrifos
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
Cu	Cuivre
Cyt C	Cytochrome C
Cyt P450	Cytochrome P450
DDT	Dichloro- Diphénil- Trichloréthane
DJA	Dose journalière admissible
DL 50	Dose létale 50
DT 50	Temps de demi-vie 50
DTNB	Acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque
ECD	Détecteur à capture d'électrons
EFS	Extraction sur fluide supercritique
EGTA	Éthylène glycol bis (aminoéthyléther)-N, N, N', N'acide tétraacétique
ELL	Extraction liquide-liquide
EPS	Extraction sur phase solide
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAD	Flavine-Adénosine-Dinucléotide
FADH	Flavine-Adénosine-Dinucléotide, forme réduite
Fe	Fer
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GSSH	Glutathion-disulfure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HCH	Hexachlorocyclohexane
HPGPx	GPx phospholipide-hydroperoxyde
HSP	Heat Shock Proteins
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
LMR	Limite maximale en résidus



<b>LOO<sup>•</sup></b>	Radical peroxyde
<b>LOOH</b>	Peroxyde
<b>m.a</b>	Matière active
<b>MCPA</b>	4-chloro-2-methylphenoxyethanoic acid
<b>MCPP</b>	Mecoprop
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>Mn</b>	Manganèse
<b>NAD(P)<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucléotide
<b>NADPH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
<b>NaOH</b>	Soude
<b>NBT</b>	Bleu de nitrotétrazolium
<b>NIST</b>	The national institute of standards and technology
<b>NO<sup>•</sup></b>	Monoxyde d'azote
<b>NPD</b>	Détecteur azote-phosphore
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anion peroxyde
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hydroxyle
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>ONM</b>	Office Nationale de la Météorologie
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Péroxynitrite
<b>ppm</b>	Partie par million
<b>PTP</b>	Permeability transition pore
<b>RL</b>	Radical libre
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>Rpm</b>	Rond par minute
<b>SAU</b>	Superficie agricole utilisable
<b>Se</b>	Sélénium
<b>SEM</b>	Somme des écarts moyens
<b>SM</b>	Spectromètre de masse
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>T°</b>	Température
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TCA</b>	Acide trichloroacétique
<b>TCD</b>	Détecteur à conductibilité thermique
<b>TCP</b>	3, 5,6- trichloro-2- pyridinol
<b>TM</b>	Température maximale
<b>Tm</b>	Température minimale
<b>TNB</b>	Acide thionitrobenzoïque
<b>Tris</b>	Tris [hydroxyméthyl] aminométhane
<b>TS</b>	Tris-Sucrose
<b>TSE</b>	Tris-Sucrose-EGTA
<b>U.S.EPA</b>	Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis
<b>VDAC</b>	Voltage Dependent Anion Channel
<b>Vit</b>	Vitamine
<b>Zn</b>	Zinc

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Devenir des pesticides dans l'environnement après application .....	08
<b>Figure 2</b> : Ecoulement de l'eau.....	13
<b>Figure 3</b> : Transfert des pesticides vers les eaux souterraines.....	14
<b>Figure 4</b> : Schéma des différentes formes de ROS.....	23
<b>Figure 5</b> : Chaîne respiratoire mitochondriale.....	28
<b>Figure 6</b> : Production des ROS par la mitochondrie .....	29
<b>Figure 7</b> : Dismutation de l'anion superoxyde par les SOD.....	31
<b>Figure 8</b> : Elimination du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR.....	32
<b>Figure 9</b> : Métabolisme du chlorpyrifos .....	39
<b>Figure 10</b> : Métabolisme du carbaryl .....	40
<b>Figure 11</b> : Situation géographique de la zone d'étude.....	42
<b>Figure 12</b> : Répartitions mensuelles des précipitations (mm) à Jijel (période 1997 à 2006) .....	44
<b>Figure 13</b> : Variations mensuelles de la température (C°) à Jijel (période 1997 à 2006) .....	44
<b>Figure 14</b> : Schéma d'un appareil de couplage GC-MS.....	50
<b>Figure 15</b> : Réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique (TBA) .....	54
<b>Figure 16</b> : Réaction de réduction du DTNB par le glutathion .....	57
<b>Figure 17</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 1 (première campagne d'échantillonnage).....	59
<b>Figure 18</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 2 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	60
<b>Figure 19</b> : Spectre de masse du chlorpyrifos détecté dans le premier échantillon du site N°2 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	61
<b>Figure 20</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 2 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	61
<b>Figure 21</b> : Spectre de masse du chlorpyrifos détecté dans le deuxième échantillon du site N°2 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	62
<b>Figure 22</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	62
<b>Figure 23</b> : Spectre de masse du chlorpyrifos détecté dans le premier échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	63

<b>Figure 24:</b> Spectre de masse de l'endosulfan détecté dans le premier échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	63
<b>Figure 25:</b> Spectre de masse de l'endosulfan II détecté dans le premier échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	64
<b>Figure 26:</b> Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	64
<b>Figure 27:</b> Spectre de masse de l'endosulfan détecté dans le deuxième échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	65
<b>Figure 28:</b> Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°5 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	65
<b>Figure 29:</b> Spectre de masse du chlorpyriphos détecté dans le deuxième échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	66
<b>Figure 30:</b> Variations des taux du MDA mitochondrial généré en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyriphos <i>in vitro</i> .....	68
<b>Figure 31 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyriphos <i>in vitro</i> .....	70
<b>Figure 32 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyriphos <i>in vitro</i> .....	70
<b>Figure 33 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyriphos <i>in vitro</i> .....	72
<b>Figure 34 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyriphos <i>in vitro</i> .....	72
<b>Figure 35 :</b> Variations des taux du MDA mitochondrial après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	75
<b>Figure 36 :</b> Variations des taux du MDA cytosolique après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	76
<b>Figure 37 :</b> Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	77
<b>Figure 38 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	79
<b>Figure 39 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	80

<b>Figure 40</b> : Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois .....	81
<b>Figure 41</b> : Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	82
<b>Figure 42</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 1 (première campagne d'échantillonnage).....	99
<b>Figure 43</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 2 (première campagne d'échantillonnage).....	99
<b>Figure 44</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 2 (première campagne d'échantillonnage).....	100
<b>Figure 45</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 3 (première campagne d'échantillonnage).....	100
<b>Figure 46</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 3 (première campagne d'échantillonnage).....	100
<b>Figure 47</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 4 (première campagne d'échantillonnage).....	101
<b>Figure 48</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 4 (première campagne d'échantillonnage).....	101
<b>Figure 49</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 5 (première campagne d'échantillonnage).....	101
<b>Figure 50</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 5 (première campagne d'échantillonnage).....	102
<b>Figure 51</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 6 (première campagne d'échantillonnage).....	102
<b>Figure 52</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 6 (première campagne d'échantillonnage).....	102
<b>Figure 53</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 1 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	103
<b>Figure 54</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 1 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	103
<b>Figure 55</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 4 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	103

<b>Figure 56</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 4 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	104
<b>Figure 57</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 5 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	104
<b>Figure 58</b> : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 6 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	104
<b>Figure 59</b> : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 6 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	105

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Concentrations maximales de pesticides autorisés dans l'eau potable selon l'OMS.....	15
<b>Tableau 2 :</b> Moyennes mensuelles de Température (C°) et des précipitations (mm) à Jijel (période 1997 à 2006).....	43
<b>Tableau 3 :</b> Pesticides utilisés dans la zone d'étude selon les résultats de l'enquête.....	46
<b>Tableau 4 :</b> Caractéristiques du pic N° 50 du chromatogramme du premier échantillon du site N°2 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	60
<b>Tableau 5 :</b> Caractéristiques du pic N° 36 de chromatogramme du deuxième échantillon du site N°2 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	61
<b>Tableau 6 :</b> Caractéristiques des pics N° 31, 38 et 45 de chromatogramme du premier échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	63
<b>Tableau 7 :</b> Caractéristiques du pic N° 50 de chromatogramme du deuxième échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	64
<b>Tableau 8 :</b> Caractéristiques du pic N° 47 de chromatogramme du deuxième échantillon du site N°5 (deuxième campagne d'échantillonnage).....	65
<b>Tableau 9 :</b> Variations des taux du MDA mitochondrial généré en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos <i>in vitro</i> .....	67
<b>Tableau 10 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos <i>in vitro</i> .....	69
<b>Tableau 11 :</b> Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos <i>in vitro</i> .....	73
<b>Tableau 12 :</b> Variations des taux du MDA mitochondrial après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	74
<b>Tableau 13 :</b> Variations des taux du MDA cytosolique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	75
<b>Tableau 14 :</b> Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.....	77

**Tableau 15 :** Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois. .... 79

**Tableau 16 :** Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois..... 81

# Introduction



## **I. Introduction**

Depuis plusieurs décennies, les systèmes agricoles sont fondés sur le recours aux pesticides de synthèse comme seul moyen permettant d'assurer une protection rapide et efficace des cultures contre la flore adventice, les champignons, les insectes et les autres ennemies des cultures [1]. Le progrès dans la protection des plantes par tout un arsenal de produits phytosanitaires a, en effet, largement contribué à augmenter et à régulariser les rendements agricoles [2,3].

Toutefois, si le rôle des pesticides est d'abord apparu essentiel, leurs effets secondaires nocifs ont été rapidement mis en évidence. En effet, ces substances qui ont une action rapide, peuvent en parallèle avoir une rémanence tenace, de plus, la toxicité liée à leur structure moléculaire, ne se limite pas aux seules espèces que l'on souhaite éliminer, elle s'exerce en outre sur de nombreux organismes non cibles et plus particulièrement l'homme [4,5].

Les dégâts occasionnés sur l'homme sont très importants. Les pesticides sont responsables selon l'OMS de la mortalité d'environ 220 000 personnes chaque année, et de l'empoisonnement d'environ un million d'autres. Aujourd'hui, la liste des effets néfastes liés aux pesticides s'allonge et les études épidémiologiques s'accumulent apportant de plus en plus des arguments scientifiques en faveur d'une toxicité importante et toujours largement sous estimée [6].

Plusieurs études récentes ont montré que, plusieurs pesticides font partie des substances CMR (Cancérogènes, Mutagènes, Reprotoxiques) et sont par conséquent, liés à la recrudescence de nombreux cancers, malformations congénitales, infertilité, problèmes neurologiques, faiblesse du système immunitaire...etc [7,8].

Il est bien établi, en effet, que la toxicité à la fois aiguë et chronique n'affecte pas seulement les utilisateurs de ces produits qui les manipulent directement, mais la population dans son ensemble, étant donné que ces substances sont devenues omniprésentes dans l'environnement et sont responsables d'une contamination généralisée des différents milieux naturels dont les ressources en eau [9].

De nos jours, des cas de pollution des ressources en eau par les résidus pesticides, sont, en effet, signalés quotidiennement dans le monde, alors que la grande partie passe sous

silence à cause du manque de diagnostic réel de la cause. Les pesticides constituent, de ce fait, un sujet de préoccupation majeur et le problème de résidus qui leur est lié reste d'actualité [10].

Dans la Wilaya de Jijel, une forte proportion de la population s'alimente de l'eau potable distribuée par le biais des camions citernes qui la transportent de la région de Taher. Cette eau est, en effet, pompée directement de la nappe souterraine de Rhedjla vers laquelle des puits sont creusés à différents points. On ne dispose actuellement d'aucune information sur la qualité de ces eaux quant à leur contamination par les résidus pesticides. Or, ces points d'eau se situent à proximité d'une zone de forte production agricole, nécessitant l'application régulière des produits phytosanitaires qui peuvent, en effet, compromettre la qualité de ces ressources car ces derniers sont conçus pour être à la fois toxiques et persistants. Certes, si cette contamination vient à se confirmer, elle serait très préoccupante particulièrement sur la santé du consommateur jijelien.

Pour pouvoir apporter les éléments de réponse, le premier volet de notre travail sera consacré à l'évaluation de la contamination des eaux en question par les pesticides, cela se fait en mettant en place un dosage spécifique permettant de déceler toute trace de ces produits dans les eaux analysées.

Dans l'optique de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'effet des pesticides décelés, le second volet de notre travail examine le lien entre l'exposition à ces produits chimiques et le stress oxydatif, un processus délétère responsable de nombreux préjudices sur les différents systèmes biologiques et qui est largement évoqué pour être le mécanisme clé par lequel les pesticides exercent leur toxicité. Pour ce faire, les mécanismes d'induction du stress oxydant seront identifiés d'abord sur des modèles *in vitro* comprenant des cellules hépatiques et des mitochondries isolées du foie, puis complétés par des études *in vivo*, afin de confirmer les présomptions de toxicité qu'ils auraient permis d'identifier.

# **Analyse bibliographique**

# **Chapitre I : Les pesticides**

## II. Les pesticides : caractéristiques et devenir dans l'environnement

### II.1. Définition

L'article 2 de la loi algérienne N° 87-17 du 1 Août 1987 relative à la protection phytosanitaire désigne par pesticide : toute substance ou mélange de substances destiné à repousser, détruire ou combattre les organismes nuisibles, en vue de la protection ou de l'amélioration de la production végétale.

Le terme comprend les agents biologiques, les régulateurs de croissance, les correcteurs de carence, les défoliants, les agents de dessiccation, les agents d'éclaircissage ainsi que les substances appliquées sur les cultures avant ou après récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport [11].

Plusieurs autres termes et expressions définissent les pesticides. Ainsi, produits phytosanitaires, produits anti-parasitaires à usage agricole, produits agrisanitaires, produits agropharmaceutiques, produits phytopharmaceutiques sont les autres dénominations de ce terme [12].

### II.2. Classification

Plus de 20 000 spécialités commerciales de pesticides et presque 900 matières actives sont actuellement homologuées de part le monde [13]. L'hétérogénéité de ce vaste ensemble rend difficile toute classification [14]. Les pesticides peuvent toutefois être répertoriés en fonction des espèces qu'ils sont censés éliminer. On distingue ainsi :

#### ➤ Les insecticides

Les insecticides sont toute substance qui tue les insectes, empêche l'éclosion des œufs, altère le développement normal des larves ou la maturation sexuelle [15].

Ils se répartissent en trois grands groupes selon leur nature chimique : substances minérales, molécules organiques d'origine naturelle, végétale, ou produits organiques de synthèse qui sont de loin les plus utilisés [16].

#### ➤ Les fongicides

Servant à combattre la prolifération des champignons pathogènes. Ils permettent de lutter contre les maladies cryptogamiques qui causent de graves dommages aux végétaux cultivés [16].

### ➤ Les herbicides

Ce sont des substances destinées à éliminer les mauvaises herbes adventices des cultures. Ils ont des modes d'action peu diversifiés car ils agissent sur une ou plusieurs étapes de la photosynthèse [15,16].

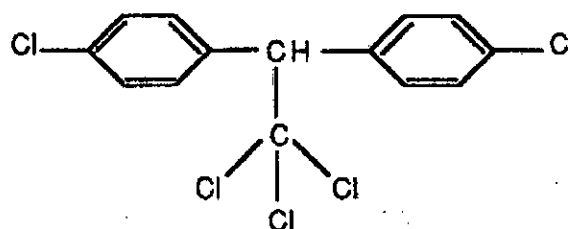
On distingue en outre :

- Les acaricides (contre les acariens),
- Les nématicides (toxiques pour les vers du groupe de nématodes),
- Les rodenticides (contre les rongeurs),
- Les molluscicides (contre les mollusques, limaces, escargots),
- Les corvicides et les corvifuges (contre les corbeaux et tous les oiseaux ravageurs de cultures) [16].

Les trois premiers groupes sont les plus connus. Etant donné leur grande diversité, les produits au sein de chaque groupe peuvent être classés selon leurs particularités chimiques en plusieurs familles chimiques. Au sein d'une même famille, on retrouve, pour les différents composés, des groupes fonctionnels identiques et des similitudes de structure [14,17]. On peut citer comme exemples de familles :

### ➤ Les organochlorés

Ce sont des molécules préparées par chloration d'hydrocarbures aromatiques. Le DDT (Dichloro- Diphénil- Trichloréthane ) fut en quelque sorte le précurseur de cette famille avec à sa suite l'apparition de l'aldrine, de la dieldrine de l'heptachlore et du lindane.



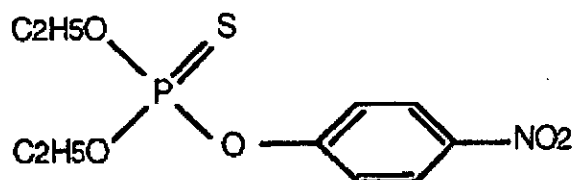
DDT (C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub>)

Ces molécules sont caractérisées par une forte rémanence temporelle et une faible spécificité. Ces propriétés considérées comme des atouts au début de leur utilisation, se sont révélées être catastrophiques à long terme pour l'environnement. Leur demi-vie de l'ordre de 10 ans ou

plus, leur a permis de se stocker durablement dans une grande partie de la biomasse de la planète et d'entraîner une pollution très persistante des différents compartiments de l'environnement. Leur emploi a, par conséquent, été interdit par l'OMS en 1972, et la plus part de ces insecticides ont été retirés du marché mondial [18,19].

### ➤ Les organophosphorés

Sont des esters obtenus en faisant réagir divers alcools avec l'acide orthophosphorique ou l'acide thiophosphorique ( Dimefox, Schradan, Parathion, Malathion...).

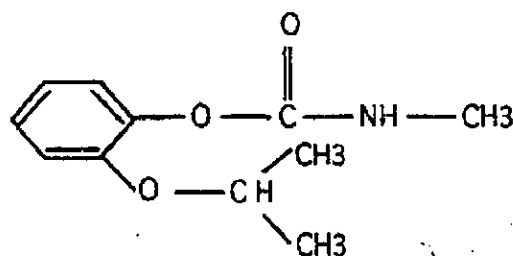


Parathion éthyl (  $C_{10}H_{14}NO_5PS$  )

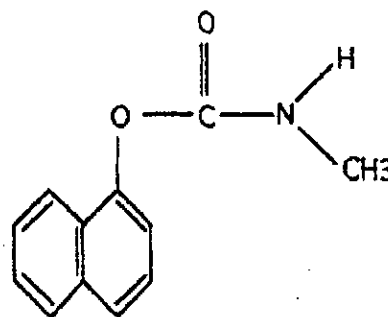
Les organophosphorés ont historiquement, remplacé les organochlorés car ils présentent une faible rémanence. Cependant, ils se caractérisent par une toxicité aiguë très élevée, ils agissent par inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) de façon irréversible, au niveau des terminaisons nerveuses ce qui peut étendre leur action aux mammifères et à l'homme [18,19].

### ➤ Les carbamates

Ce sont des substances dérivées de l'acide carbamique de formule  $NH_2-COOH$ . Ce groupe comprend un grand nombre de molécules parmi lesquelles les plus connues et les plus utilisées sont : le propoxur, le carbaryl, le bendiocarb et tout dernièrement le carboulfan.



Propoxur (  $C_{11}H_{15}NO_3$  )



Carbaryl (  $C_{12}H_{11}NO_2$  )

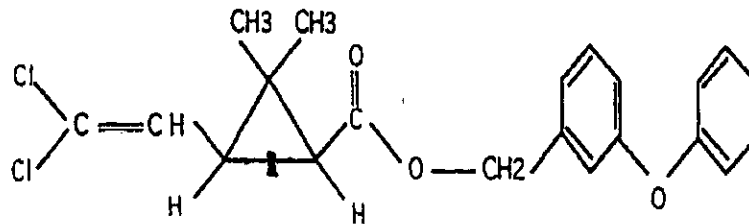
Ceux-ci sont également des anticholinestérasiques, mais dont l'action est réversible contrairement à celle des organophosphorés. Leur demi-vie s'étend de quelques jours à

plusieurs mois, voire plusieurs années dans les eaux souterraines et leur toxicité est variable d'une molécule à l'autre.

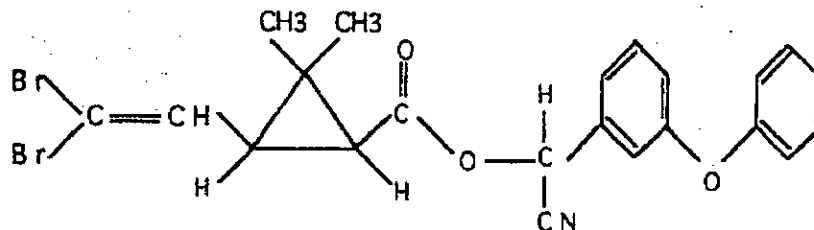
Molécules voisines, les dithiocarbamates sont des dérivés soufrés des carbamates, utilisés comme fongicides (Zinèbe, Manèbe) [18,19].

### ➤ Les pyréthrinoïdes de synthèse

Ils tirent leur nom des pyréthrines, insecticides naturels présents dans les pyrèthres c'est-à-dire dans la poudre des fleurs séchées de deux espèces de plantes africaines originaires du Caucase du genre *chrysanthemum* qui sont cultivées pour cet usage. Chimiquement, les pyréthrinoïdes sont des esters dérivés d'un noyau cyclopropane, ils possèdent, en effet, quatre caractéristiques physico-chimiques aux conséquences pharmacocinétiques et écotoxicologiques majeurs. Ils sont très lipophiles, neutres, très volatils et instables chimiquement, sensibles en particulier à l'oxydation. En raison de cette instabilité, les pyréthrinoïdes détiennent une réputation de forte biodégradabilité (rémanence de l'ordre d'un mois) ne présentant ainsi aucun effet cumulatif sur l'environnement et pratiquement aucune action toxique chez les vertébrés supérieurs. La plupart de ces molécules montrent toutefois une toxicité assez élevée pour les animaux à sang froid, notamment les poissons et les batraciens. Enumérons parmi les plus connus et les plus puissants de ces composés : la perméthrine, la cyperméthrine, l'alphaméthrine, la lambda-cyhalothrine et la deltaméthrine [18,19].



Perméthrine (C<sub>21</sub> H<sub>20</sub> Cl<sub>2</sub> O<sub>3</sub>)



Deltaméthrine (C<sub>22</sub> H<sub>19</sub> Br<sub>2</sub> NO<sub>3</sub>)



On distingue en outre les dérivés de l'urée (diuron, monuron, linuron...), les acides phénoxyalcanoïques (2,4D, MCPA, MCPP....), les phénylurées (isoproturon...), les triazines (atrazine, simazine....) ou encore les triazoles (hexaconazoles....) [18].

### II.3. Cadre législatif et réglementaire

En Algérie, le contrôle des produits phytosanitaires s'est établi peu à peu en fonction de la politique de développement prônée par le pays et la disponibilité des moyens.

Ce contrôle a connu une évolution dans le temps et la promulgation de la loi N° 87-17 de 1987 relative à la protection phytosanitaire a permis d'édicter les mesures relatives à la fabrication, l'étiquetage, l'entreposage, la distribution, la commercialisation et l'utilisation des produits phytosanitaires à usage agricole.

Au terme de cette loi, aucun produit phytosanitaire ne peut être commercialisé, importé ou fabriqué s'il n'a pas fait l'objet d'une homologation [11].

### II.4. Comportement et transfert des pesticides dans l'environnement

Malgré un souci de protection de l'environnement constant et croissant lors de l'utilisation des produits phytosanitaires, seule une faible partie de ces produits entre en contact avec les organismes cibles. La plus part des chercheurs l'évalue à moins de 0,3 %, ce qui veut dire que 99,7 % de la quantité épandue n'atteint pas la cible visée [20,21]. Cette partie se disperse alors dans les trois compartiments de l'environnement : l'air, le sol et l'eau. Les mécanismes qui gouvernent ce devenir sont nombreux et complexes et encore souvent mal connus. Cependant, suivant un schéma classique ils peuvent se classer en trois types :

- La rétention (dans le sol)
- La dégradation (abiotique et biotique)
- Le transfert (vers l'atmosphère, les eaux de surface et les eaux souterraines) [20,22, 23].

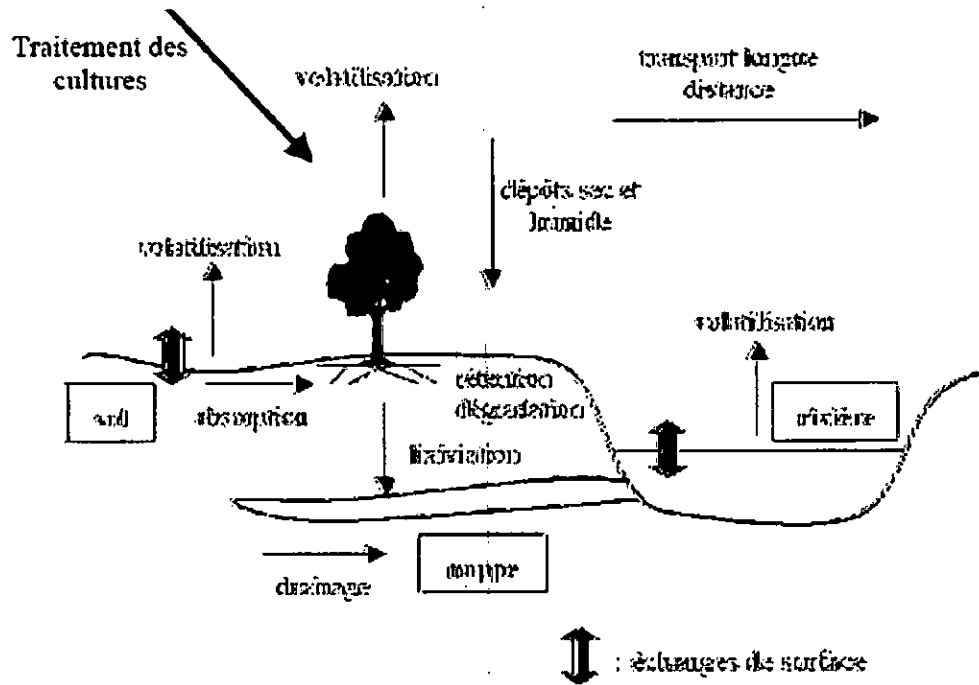


Figure 1 : Devenir des pesticides dans l'environnement après application [24].

#### II.4.1. Processus de rétention

La rétention se réfère à la capacité du sol à retenir le pesticide et à limiter son déplacement à l'intérieur ou à l'extérieur de la matrice du sol. Ce terme englobe le processus d'adsorption sur le sol lui-même, mais aussi d'absorption dans la matrice et les organismes du sol, les plantes et les micro-organismes [12].

L'adsorption représente le phénomène majeur d'immobilisation des composés dans le sol. Les sols à forte teneur en matière organique adsorbent les produits phytosanitaires et limitent ainsi leur migration avec l'eau qui percole et circule en surface, d'où une protection des milieux aquatiques [10, 25].

Plusieurs liaisons de natures différentes peuvent s'établir entre les molécules de pesticides et les particules de sol. Selon l'énergie de ces liaisons, on distingue deux types d'adsorption :

- L'adsorption physique dont l'énergie est faible ( $< 50 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Les liaisons mises en jeu sont de type liaisons d'hydrogène ou de vander wals, et le phénomène observé dans ce cas est réversible.

- L'adsorption chimique qui a une énergie d'adsorption élevée ( $> 80 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). Dans ce cas les liaisons chimiques les plus citées sont les liaisons ioniques et celles de coordination. Cette adsorption est irréversible [10].

Le processus d'adsorption-désorption affecte tous les aspects du comportement des produits phytosanitaires dans le milieu naturel, il contrôle leur persistance, leur dégradation ainsi que leur transfert vers les eaux de surface et les eaux souterraines [25,26].

En effet, une molécule adsorbée, n'est plus ni dans la phase liquide ni dans la phase gazeuse du sol, elle n'est donc plus :

- biodisponible, d'où une réduction de ses effets biologiques.
- dégradée par les micro-organismes du sol, d'où augmentation de sa persistance.
- entraînée par les mouvements de l'eau dans le sol, d'où réduction de la pollution des eaux.

En se désorbant, la molécule redevient biodisponible, dégradable et mobile [25].

#### II.4.2. La dégradation des pesticides

L'étude de la dégradation des produits phytosanitaires constitue aujourd'hui un élément essentiel car décisif dans la mise sur le marché de ces produits [25]. La dégradation des pesticides résulte de l'action du milieu naturel sur la matière active de la formulation chimique [10].

La durée de vie des substances, et donc leur persistance dans l'environnement, est conditionnée par leur réactivité vis-à-vis les processus que l'on qualifie de abiotiques (photolyse, hydrolyse, réaction d'oxydoréduction...) ou biotiques (biodégradation, métabolisation) [16].

En effet, il est difficile de faire la part entre la dégradation biotique et abiotique, car le plus souvent elles se superposent dans le temps et peuvent aboutir à des produits de transformation si similaires. D'un point de vue chimique, la plupart des transformations abiotiques et biologiques obéissent aux mêmes réactions : oxydation, réduction, hydrolyse, déhalogénéation [27].

Il est souvent supposé que les transformations biotiques contrôlent la dégradation des pesticides dans l'environnement car la grande diversité métabolique des micro-organismes du sol, leur capacité d'adaptation et de mutation leur permettent de se développer dans des conditions très variées et de dégrader pratiquement toutes les molécules. Or, dans certains cas, la prépondérance des transformations abiotiques peut être démontrée. Ainsi, les pesticides peuvent être lessivés dans la zone racinaire et ont la possibilité d'atteindre au bout d'un certain temps les eaux souterraines. Les concentrations en nutriments, le taux de matière organique, et le taux de gaz échangé décroît toujours avec la profondeur, ce qui engendre une baisse de la population microbienne et avec elle la probabilité d'occurrence de la plupart des

transformations biotiques. Les transformations abiotiques contrôlent alors probablement la dégradation de nombreux pesticides à des profondeurs suffisantes [12].

#### II.4.2.1. La dégradation abiotique

Elle s'effectue sur le sol sous l'effet des rayons solaires (réactions photochimiques) ou dans l'eau par des réactions d'hydrolyse [10].

##### a) La photodécomposition

Qu'ils soient dans l'air, à la surface du sol, dans l'eau ou sur la plante, les liaisons chimiques entre les atomes des pesticides peuvent être détruites par photodégradation par les rayons ultraviolets de longueur d'ondes comprise entre 100 et 450 nm entre le visible et les rayons X [20].

Les réactions photochimiques englobent différents types de réactions telles que des oxydations, des hydroxylations, des polymérisations, des déchlorinations...etc. Ces réactions se produisent soit directement par l'excitation du pesticide, soit par l'intermédiaire d'un autre composé susceptible lui aussi d'être excité facilement [10].

Les auteurs s'accordent à dire que les phénomènes mis en jeu ne sont généralement pas suffisants en conditions naturelles pour assurer une dégradation complète de la molécule mère [16].

##### b) L'hydrolyse aqueuse

Plusieurs catégories de pesticides (organochlorés, carbamates, alkyl halogénés...) subissent le phénomène d'hydrolyse entraînant des temps de demi-vie de quelques minutes à plusieurs centaines d'années [28].

Ces réactions se déroulent notamment dans la phase aqueuse du sol et peuvent être les processus de dégradation chimique les plus importants [20].

Les mécanismes d'hydrolyse, en concurrence avec les processus de dégradation biotique dans les premiers centimètres du sol, sont prépondérants en profondeur [22].

#### II.4.2.2. La dégradation biotique

La biodégradabilité a été définie comme une transformation structurelle d'un composé "parent" induite biologiquement et qui modifie son intégrité moléculaire. Cette transformation nécessite que le composé (pesticide) soit biodégradable, c'est-à-dire que les micro-organismes du sol possèdent l'appareil enzymatique nécessaire pour l'attaquer [28].

Tous les paramètres qui favorisent la vie microbienne accélèrent les processus de biodégradation : pH, T°, aération, humidité.

Les dégradations de type métabolique ou co-métabolique sont les plus courantes [12]. Si la molécule peut être utilisée directement par la microflore dégradante comme source de carbone et d'énergie, on parle de métabolisme. Au contraire, quand l'énergie nécessaire aux micro-organismes est fournie par la dégradation d'un autre substrat – nommé co-substrat - on parle de co-métabolisme [28,29].

### ✦ Produits de dégradation

Les réactions chimiques des molécules parents ne résultent pas forcément en une « détoxification » des composés. Les principaux produits de dégradation obtenus peuvent être plus persistants (car moins sensibles à la photodégradation) et plus toxiques que les produits d'origine. Par exemple, les principaux produits de dégradation des organophosphorés sont des analogues oxygénés obtenus par une oxydation du groupe P=S en groupe P=O, et qui se caractérisent par une toxicité souvent plus élevée que celle des produits parents.

L'analyse de métabolites des pesticides est plus difficile car les niveaux de concentrations seront évidemment plus faibles que les concentrations des parents et les étalons de ces composés ne sont pas tous disponibles [25].

### ✦ Persistance et demi-vie des pesticides

Le processus de dégradation d'un pesticide dans le sol, qu'il soit chimique ou biologique est indissociable des notions de persistance [21].

Définir la persistance d'un pesticide revient donc à évaluer la résultante d'action d'un ensemble de mécanismes et de facteurs qui contribuent à le faire disparaître. Elle est le plus souvent évaluée par le temps de dégradation de 50% de la substance active (DT 50) qui est exprimée en jours et qui est déterminée par un test au laboratoire ou au champ. Les tests au champ permettent une évaluation du risque environnemental plus précise puisque effectuée dans des conditions réelles [20, 28].

### II.4.3. Transfert vers d'autres systèmes

Les transferts vers d'autres systèmes s'effectuent vers l'atmosphère, dans le sol vers la profondeur et au niveau de la surface du sol vers les eaux de surface [12].

La volatilisation est le phénomène de dispersion dans l'air, alors que le ruissellement et l'infiltration engendrent respectivement la pollution des eaux de surface et des eaux souterraines [10,30].

#### II.4.3.1 Transfert vers l'atmosphère : volatilisation

La volatilisation (dispersion de résidus dans l'atmosphère) est l'un des processus principaux par laquelle les pesticides sont exportés en dehors de la zone cible après application notamment lorsque les traitements visent la surface du sol ou celle des végétaux. [12,31].

La volatilisation peut se produire au moment de l'application depuis la surface ou même dans certains cas où la molécule est très volatile depuis l'intérieur du sol [12].

La volatilisation dépend essentiellement des propriétés physico-chimiques du composé, mais elle peut être influencée par les conditions météorologiques ( $T^\circ$ , humidité, ensoleillement) et la nature de surface d'adsorption des pesticides [32].

La tendance pour une substance dissoute à s'évaporer vers l'atmosphère, c'est-à-dire de passer de l'état dissout à l'état gazeux est évaluée par la constante de Henry H

$H=P/S$  où : H est la constante de Henry en  $\text{atm}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ .

P est la pression de vapeur en atm.

S est la solubilité du composé en  $\text{mol}\cdot\text{m}^3$ .

Si  $H < 10^{-3}$ , le produit est peu susceptible de se volatiliser [16].

Le transfert vers l'atmosphère peut être suivi de retombées sur le sol ou vers les eaux de surface. La redéposition de ces molécules dans les rivières est un phénomène fréquent et conséquent. Les molécules volatilisées peuvent être entraînées très loin et rester dans l'atmosphère pendant un certain temps. Une partie est aussi solubilisée dans les gouttes d'eau et retombe via la pluie à des concentrations non négligeables [20].

#### II.4.3.2. Transfert vers les milieux aqueux

La pollution des sols regagne en partie plus ou moins importante, selon l'environnement naturel les ressources en eau. Pour cette raison, ces ressources sont vulnérables à cause aussi d'autres types de pollution auxquels elles se trouvent exposées.

L'eau excédentaire est susceptible de mobiliser et de faire migrer les produits phytosanitaires vers les ressources en eau, c'est ainsi que, le caractère polluant d'un produit est en pratique

associé à l'incapacité du sol à le retenir ou à le dégrader, avant que, sous l'effet de l'eau, il ne soit dispersé dans l'environnement [16,31].

Ce transfert s'opère soit latéralement par ruissellement, soit verticalement par lixiviation [33].

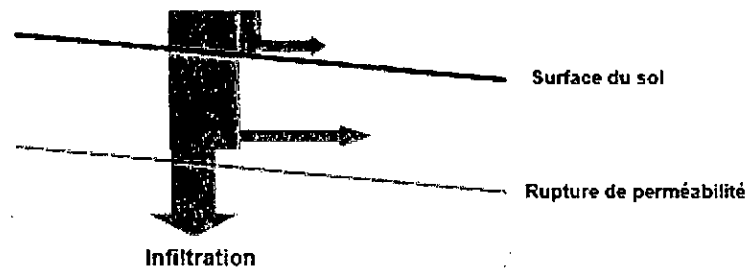


Figure 2 : Ecoulement de l'eau [34].

#### II.4.3.2.1. Transfert vers les eaux de surface : ruissellement

Le ruissellement peut être défini comme le mouvement latéral de l'eau et des matières qu'elle contient à la surface du sol [21].

Ce phénomène est provoqué soit par une intensité de pluie supérieure à la capacité d'infiltration du sol, soit par saturation du sol au-dessus d'un niveau peu perméable [27].

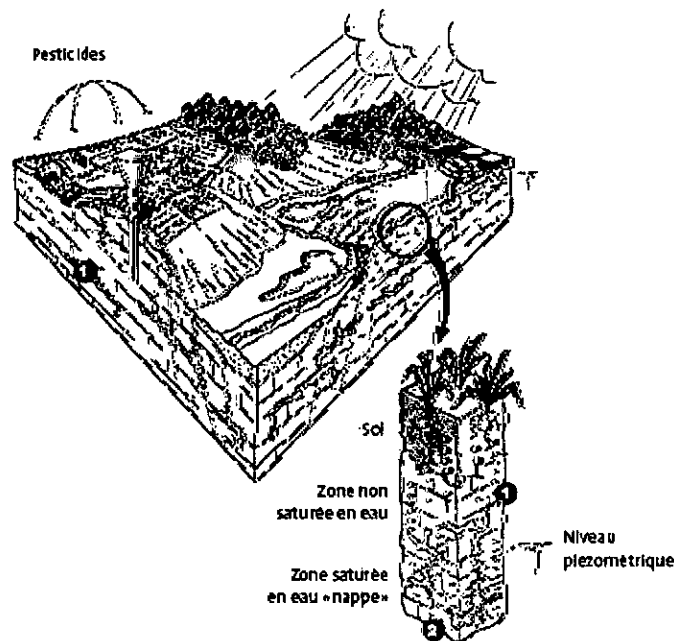
Dans le premier cas, l'eau n'a pas le temps de s'infiltrer dans le sol, elle reste en surface et ruisselle. Dans le cas de ruissellement par saturation, le sol est saturé en eau et ne peut plus incorporer l'eau de pluie qui arrive à sa surface, cette situation se produit quand le sol présente à faible profondeur une couche imperméable [27].

Les produits phytosanitaires vont pouvoir être transportés de deux façons : en solution dans l'eau qui ruisselle ou accrochés à des particules de sol qui sont arrachées par l'eau qui ruisselle. Si le parcours qu'empreint l'eau le permet, en l'absence de zone d'infiltration notamment, les substances actives se trouvent dans l'eau de surface [20].

L'importance de l'entraînement par ruissellement est très variable selon les situations : volume et intensité des précipitations, pente de terrain, présence ou absence de couvert végétal, façons culturales, stabilité culturelle du sol, propriétés des pesticides utilisés ainsi que les quantités appliquées [25,35,36].

### II.4.3.2.2. Transfert dans le sol vers les eaux profondes : lixiviation et lessivage

Le transfert vers les eaux souterraines concerne les molécules en solution et celles mobilisées par la désorption et la dissolution. Le transfert est représenté par le passage des composés phytosanitaires de la zone non saturée comprenant le sol à la zone saturée ou zone aquifère. Lorsque les molécules sont en solution, on parle généralement de lixiviation, si les molécules sont associées à la phase solide, on parle de lessivage [12,22].



**Figure 3 : Transfert des pesticides vers les eaux souterraines [37].**

Dans tous les cas, les quantités exportées sont faibles et ne représentent que quelques pourcents des quantités appliquées, néanmoins, elles sont suffisantes pour provoquer des contaminations significatives de l'eau au regard des seuils maximums autorisés pour les eaux potables [27].

Ces seuils ont été fixés par l'OMS pour chaque pesticide en fonction des risques engendrés. On distingue par exemple :



Substance	Formule	Ligne directrice fixée par l'OMS (µg/l)
Alachore	$C_{14}H_{20}ClN O_2$	20
Atrazine	$C_8H_{14}ClN_5$	02
Lindane	$C_6H_6Cl_6$	02
Isoporturnn	$C_{12}H_{18}N_2O$	09
Métalachlore	$C_{15}H_{22}ClN O_2$	10
Bentazone	$C_{10}H_{12}N_2O_3S$	30
Carbofuran	$C_{12}H_{15}NO_3$	05
Chlordane	$C_{10}H_6Cl_8$	0,2

**Tableau 1 : Concentrations maximales de pesticides autorisés dans l'eau potable selon l'OMS [38].**

Pour l'Europe, la norme de potabilité dans les eaux de boisson est toutefois plus exigeante, elle est fixée à 0,5 µg/l pour la somme des substances actives et à 0,1µg/l pour chaque molécule analysée (sauf pour l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et l'époxyde d'heptachlore pour lesquels la valeur est de 0,03 µg/l en raison des considérations sanitaires) [27].

#### II.4.3.2.2.1. Facteurs influençant la contamination de l'eau souterraine par les pesticides

Plusieurs paramètres tels que des propriétés des pesticides, du sol et du site, des pratiques d'utilisation des pesticides et des caractéristiques des produits influencent la probabilité que les pesticides contaminent l'eau souterraine.

##### 1) Propriétés des pesticides

Certaines propriétés des pesticides déterminent leur potentiel de lessivage. Le lessivage étant l'entraînement des pesticides avec l'eau à travers le sol [39].

##### ➤ Mobilité

Il s'agit du potentiel de déplacement d'un pesticide dans le sol. Elle dépend de la capacité de liaison des pesticides aux particules du sol, de la texture du sol et de son contenu en matière organique. Une fois adsorbés, les pesticides sont moins lessivables [39].

➤ **Solubilité aqueuse**

Il s'agit du potentiel qu'a un pesticide de se dissoudre ou de se retrouver en solution dans l'eau. En général, les composés très solubles sont facilement transportés par l'eau, car ils suivent son écoulement. Ils sont souvent peu adsorbés sur les sols, et plus facilement biodégradables, d'où une augmentation du risque de lessivage [39, 40,41].

➤ **Persistence dans le sol**

Ce terme désigne le temps nécessaire pour qu'un pesticide se décompose (les produits de décomposition des pesticides peuvent toutefois affecter la qualité de l'eau). Plus un pesticide met du temps à se décomposer, plus le risque qu'il soit lessivé augmente [39].

## 2) Propriétés du sol

➤ **Teneur en matière organique**

La teneur en matière organique favorise l'agrégation des particules entre elles et assure ainsi la stabilité structurelle des sols [33].

Plus le pourcentage en matière organique est élevé, plus les pesticides peuvent s'y lier (ou s'adsorber), ils deviennent moins sujets au lessivage [39].

➤ **Texture**

Il s'agit de la grosseur ou de la finesse des particules de sol (proportion de sable, de limon et d'argile). L'eau et les pesticides solubilisés s'infiltreront plus rapidement dans les sols de texture grossière (exp. sable) par rapport à ceux de texture fine (exp. Argiles) [39].

➤ **Perméabilité**

Il s'agit de la capacité de déplacement de l'eau dans le sol. La perméabilité dépend de la grandeur et de la continuité des pores dans le sol. Ces pores forment des chemins préférentiels pour l'eau vers l'aquifère. La structure du sol et la présence de macropores (causés par l'action du gel et du dégel, de la sécheresse, des racines ou des organismes vivants (vers de terre, insectes...etc) ont une influence sur le degré de perméabilité.

Dans les sols perméables, les pesticides solubilisés se lessivent rapidement et sont généralement moins décomposés lorsqu'ils atteignent l'aquifère. En effet, ils traversent rapidement les premiers centimètres du sol (zone racinaire) où l'activité microbienne de décomposition est la plus élevée. L'eau souterraine est donc plus vulnérable à la contamination sous les sols perméables [39].

### **3) Propriétés du site**

#### **➤ Pente**

Exprimée en pourcentage, la pente est la différence d'élévation sur une distance donnée. Sur un terrain plat, soit une pente de 0%, les possibilités de ruissellements sont très faibles. Les risques d'infiltration de l'eau dans le sol sont alors plus élevés [39].

#### **➤ Précipitations**

Leur abondance et le moment où elles se produisent ont une influence sur le lessivage. L'eau qui s'infiltre dans le sol en quantité supérieure aux besoins des cultures peut transporter les pesticides vers l'aquifère. Le lessivage des pesticides peut se produire surtout au printemps et à l'automne lorsque la pluviosité est élevée et que les cultures nécessitent peu d'eau [39].

#### **➤ Profondeur de la nappe d'eau souterraine et temps de rétention à proximité de la surface du sol**

Une nappe d'eau souterraine située près de la surface du sol est plus susceptible d'être contaminée qu'une nappe profonde. En effet, si la nappe est élevée, la distance entre la nappe et la surface du sol est plus courte.

Les pesticides mobiles (peu adsorbés par le sol), et ceux qui sont persistants (moins susceptibles de se décomposer) vont se retrouver rapidement dans la nappe.

Plus la nappe reste longtemps près de la surface du sol, plus le risque de contamination est élevé [39].

### **4) Pratiques d'utilisation des pesticides**

#### **➤ Quantité de pesticides appliquée**

L'application fréquente de pesticides et leur utilisation à des doses élevées augmentent leurs quantités au sol et par conséquent, les risques de contamination de l'eau souterraine.

#### **➤ Types d'application**

L'application foliaire réduit la quantité de pesticides sur le sol comparativement à une application effectuée directement au sol (présemis, prélevée ou préplantation) ou par incorporation.

#### **➤ Délai entre l'application d'un pesticide et une pluie (ou une irrigation)**

Plus le délai est court, plus le risque de lessivage du pesticide augmente. En effet, le pesticide aura peu ou pas assez de temps pour être adsorbé par l'organisme nuisible ou par la plante, adsorbé par le sol ou décomposé [39].

## 5) Caractéristiques des puits

### ➤ Localisation des puits par rapport aux sources de contamination

En règle générale, plus la distance entre un lieu d'application ou de manipulation de pesticides et un puits est courte, plus le risque de contamination est élevé.

Des règlements exigent le respect de distances d'éloignement pour certaines activités se déroulant à proximité des puits [39].

### ➤ Construction et entretien du puits

Un puit dont la construction et l'entretien sont déficients rend l'eau souterraine vulnérable à la contamination par des infiltrations. Par ailleurs, un puit abandonné, constitue une voie d'entrée préférentielle des pesticides vers les eaux souterraines [39].

## II.5. Effets toxiques des pesticides

### II.5.1. Effets sur la santé humaine

La toxicité d'un pesticide est son potentiel à produire des effets nocifs sur la santé, à court ou à long terme [42].

L'évaluation des effets toxiques des pesticides est complexe car de nombreux paramètres sont à considérer : la nature du composé, ses propriétés toxico-dynamiques, la durée d'exposition et ses variations, l'effet des mélanges, la nature libre ou liée des résidus...etc [14].

La toxicité aiguë liée aux pesticides se manifeste à la suite d'une exposition unique ou de courte durée. La famille des pesticides la plus incriminée est celle des insecticides et les signes le plus souvent rapportés sont des maux de tête, des nausées, des vomissements, des étourdissements, une fatigue anormale, une perte d'appétit et des irritations cutanées, oculaires ou respiratoires. Ce type d'intoxications résulte souvent d'une exposition accidentelle à la suite du non-respect des recommandations en matière d'utilisation ou d'entreposage des pesticides [17,42].

Toutefois, si l'expression immédiate de la toxicité est bien connue, le décalage entre l'exposition et la découverte d'une anomalie rend délicate l'établissement d'une causalité [14]. Ainsi, les signes d'une intoxication chronique sont souvent difficiles à reconnaître car ces derniers peuvent même survenir alors que la personne n'est plus exposée aux pesticides depuis des années. De ce fait, ce type d'intoxications ne peut être mesuré scientifiquement que plusieurs années après l'homologation des produits [42, 43,44].

Nonobstant les incertitudes en matière d'effets à long terme, les préoccupations actuelles concernent les liens éventuels entre l'exposition aux pesticides et certains effets néfastes tels que le cancer, les effets sur la reproduction, des perturbations du système endocrinien et du système immunitaire ainsi que des effets neurologiques [14,42].

#### II.5.1.1. Cancérogénèse ✓

Plusieurs études expérimentales ou épidémiologiques laissent supposer un risque plus important d'être atteint par certaines formes de cancer à la suite de l'exposition chronique à certains pesticides couramment utilisés.

En effet, différentes organisations telles que le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) et l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (U.S.EPA) ont classé plusieurs pesticides comme cancérigènes ou mutagènes pour l'humain. Les types de cancers les plus souvent cités sont le cancer de cerveau, de poumons, de foie et de l'estomac, les sarcomes des tissus mous, les lymphomes non hodgkiniens, la maladie de hodgkin et la leucémie [42,45,46].

#### II.5.1.2. Effets sur la reproduction ✓

Les pesticides peuvent affecter la reproduction humaine en exerçant une toxicité directe sur les organes de reproduction ou en interférant avec la fonction hormonale [8].

Les pesticides et leurs sous-produits ont été ainsi identifiés en tant qu'agents susceptibles de porter atteinte au processus de fertilité masculine via une toxicité testiculaire. Il a été aussi remarqué que chez les femmes exposées à des pesticides, le risque de mortalité intra-utérin augmentait et que la croissance fœtale diminuait. A noter aussi que les pesticides ont été retrouvés dans le cordon ombilical, mais aussi dans le lait maternel ce qui pourrait expliquer le mauvais développement du fœtus, les malformations congénitales et les anomalies du système nerveux central [47].

#### II.5.1.3. Perturbation du système endocrinien

Selon l'OMS, un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange qui altère les fonctions du système endocrinien et qui, de ce fait, induit des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous population [23].

Les pesticides sont l'une des classes de composés chimiques faisant l'objet de nombreuses investigations quand à leurs effets sur le système endocrinien. Certains pesticides notamment les substances obsolètes mais persistantes comme le DDT et ses métabolites sont fortement

suspectés d'altérer le développement de la fonction reproductrice. De même, les organochlorés analogues du DDT peuvent être responsables d'effets sur la fertilité masculine en provoquant une oligospermie. D'autre part, plusieurs études épidémiologiques ont recherché une association entre l'exposition à certains pesticides (2,4D, atrazine...) et l'apparition de certains cancers hormono-dépendants (cancers thyroïdiens, cancers de la prostate et des testicules, cancers du sein et de l'ovaire). Ces études montrent généralement une association non significative entre ces composés et les cancers étudiés [23,48].

#### II.5.1.4. Effets sur le système immunitaire

Même si les études concernant les effets des pesticides sur les systèmes immunitaires sont encore limitées, certaines soulèvent la probabilité d'un lien entre l'exposition à ces produits et l'augmentation des risques d'atteint de maladies infectieuses.

Des effets comme la chute de production d'anticorps et des réactions d'hypersensibilité retardée pourraient aussi être associés à l'exposition à certains pesticides. D'autre part, plusieurs pesticides communément utilisés pourraient supprimer la réponse normale du système immunitaire humain à l'invasion de virus, de bactéries, de parasites et de tumeurs [42, 43,49].

#### II.5.1.5. Effets neurologiques

Pour certains pesticides, la neurotoxicité est le mécanisme même de leur mode d'action, c'est le cas notamment des organophosphorés qui inhibent les acétylcholinestérases (AChE) conduisant à l'accumulation des acétylcholines [50, 51,52].

Les effets aigus survenant à des doses importantes chez les hommes (agriculteurs) sont maintenant assez bien documentés, notamment en raison des intoxications accidentelles ou volontaires (tentatives de suicide). Ils informent sur la neurotoxicité potentielle de certains produits, principalement les organophosphorés et les carbamates, mais également les anciens organochlorés qui peuvent entraîner des convulsions épileptiformes, les pyréthrinoïdes (paralysies, convulsion à des doses massives), et les dérivés de l'urée (polyneuropathies, troubles neurologique centraux). Concernant les effets chroniques dus aux expositions de faible importance répétées sur une longue durée, les connaissances restent lacunaires et les études épidémiologiques effectuées ne permettent pas, pour le moment, de conclure avec certitude sur les effets chroniques de ces produits [53].

Les principaux effets chroniques étudiés sont les neuropathies périphériques, les troubles neurocomportementaux, et les troubles neuro-dégénératifs notamment la maladie de

Parkinson qui représente le deuxième désordre neuro-dégénératif suscitant ainsi une attention particulière.

En effet, nonobstant les incertitudes en matière du mécanisme précis, la cohérence des résultats de divers études épidémiologiques est un argument en faveur de l'existence d'un lien entre cette maladie et l'exposition professionnelle aux pesticides [4,53,54].

## **II.5.2. Impact environnemental : écotoxicologie**

D'un point de vue écologique, les pesticides ne sont pas des produits anodins. En effet, ils sont responsables de nombreux effets toxiques secondaires causant des risques potentiels pour l'environnement [55].

Comparée à la toxicité humaine, la nocivité pour les espèces environnementales passe souvent au second plan dans les processus d'homologation qui donnent les normes réglementaires pour chaque contaminant [47].

En effet, même si certains pesticides sont plus spécifiques que d'autres, leur action peut aussi s'exercer sur les espèces non visées qui fréquentent les zones traitées ou qui vivent près de celles-ci [42]. L'ensemble de la communauté scientifique s'accorde ainsi sur le danger et la nocivité des produits phytosanitaires et leurs métabolites sur l'environnement [56].

### **II.5.2.1. Effets nocifs sur la microflore du sol**

La microflore est essentielle pour le maintien de la fertilité du sol. Or, même si les traitements sont le plus souvent appliqués sur les parties aériennes des plantes, une bonne partie du produit atteint toujours le sol, où vivent des bactéries, des champignons, des algues, des vers de terre et des insectes.

Les insecticides peuvent être dangereux pour les antagonistes (compétiteurs, prédateurs et parasites) des ravageurs ciblés.

En fait, des études ont montré que l'emploi massif de pesticides peut avoir des répercussions majeurs sur les effectifs d'insectes utiles, notamment sur les pollinisateurs et les insectes prédateurs ainsi que sur les autres invertébrés [56].

### **II.5.2.2. Effets nocifs sur les mammifères**

Les animaux absorbent les produits phytosanitaires via la nourriture ou l'eau d'alimentation, via l'air respiré, ou au travers de leur peau. Ayant franchi diverses barrières, le toxique atteint les sites du métabolisme où il est stocké. Cette exposition peut engendrer chez

les mammifères toute une gamme d'effets toxiques dont des baisses spectaculaires de fertilité sont souvent remarqués [57].

### **II.5.2.3. Effets nocifs sur la faune aquatique**

Les produits phytosanitaires et leurs dérivés peuvent provoquer des dégâts importants dans la faune aquatique. En effet, même si les mortalités des poissons représentent les effets les plus spectaculaires, les autres composantes de l'écosystème aquatique comme les mollusques, les insectes, les petits crustacés, les algues et les plantes aquatiques sont aussi affectées par les effets néfastes des pesticides [42,56].



**Chapitre II :**

**Le stress oxydant**

### III. LE STRESS OXYDANT

#### III.1. Définition

Pour définir le stress oxydant il faut avant tout définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécules possédant un électron non apparié (célibataire) sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une réactivité importante : les radicaux libres réagissent avec des molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade [58].

L' $O_2$  est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leur orbitale externe deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en  $O_2^{\cdot-}$  puis en  $H_2O_2$ . Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS)

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) [59].

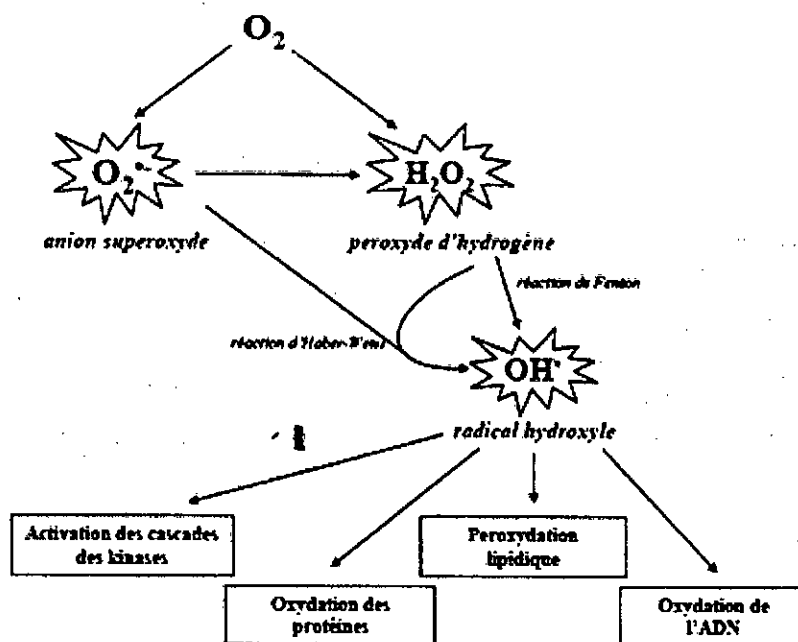
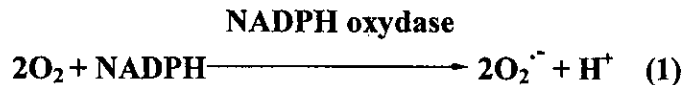


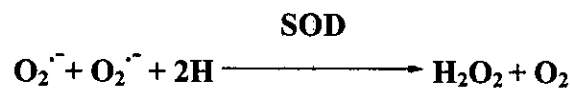
Figure 4 : Schéma des différentes formes de ROS [59].

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) est le produit de la réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire qui capte un électron supplémentaire selon la réaction (1) qui semble surtout catalysée par des NADPH oxydases membranaires [60].



Cet anion, s'il n'est pas très réactif, possède toutefois une demi-vie relativement longue et la capacité de diffuser au travers les membranes cellulaires [61].

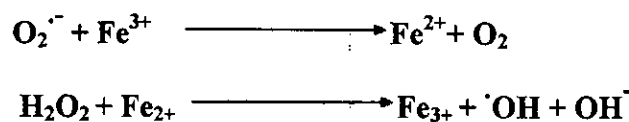
En milieu aqueux, aux pH biologiques, l'anion superoxyde subit un processus de dismutation entraînant la formation de l'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Cette réaction peut être spontanée, mais elle est le plus souvent catalysée par des enzymes appelées: superoxydes dismutases (SOD) [62].



L' $H_2O_2$  n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production [59].

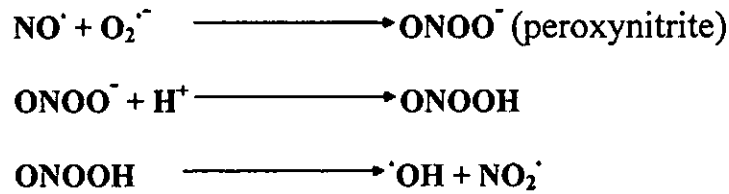
Toutefois, la plus grande toxicité du peroxyde d'hydrogène résulte de sa capacité à générer le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) qui représente le plus puissant oxydant à un électron connu [63].

Ce radical peut être généré de plusieurs façons, par radiolyse de l'eau ( $H_2O_2 + H^+ + e \rightarrow H_2O + \cdot OH$ ) induite par les rayons x, rayons gamma, ou le plus souvent par la réaction Fonton postulée par Haber Weis en 1934. Cette réaction ne peut se produire qu'en présence de sels métalliques qui la catalysent:



Il peut également avoir pour origine l'interaction entre  $O_2^{\cdot -}$  et l'oxyde nitrique  $NO^{\cdot}$ , un radical vasodilatateur produit par de nombreuses cellules comme les phagocytes et les cellules vasculaires endothéliales. Cette réaction génère comme premier intermédiaire l'anion

peroxynitrite qui est un puissant oxydant et agent de nitration notamment des résidus tyrosines.



Le radical hydroxyle est sans conteste le composé le plus réactif. Cette réactivité est telle qu'elle limite sa diffusion et circonscrit le lieu de réaction d'OH<sup>•</sup> à son lieu de formation ce qui lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité. Le radical hydroxyle attaque, en effet, avec beaucoup d'efficacité les lipides et les protéines et induit des effets néfastes prononcés sur le fonctionnement cellulaire [59, 62,64].

L'équilibre -avoir des ROS en quantité nécessaire pour le bon fonctionnement cellulaire et pas en excès pour ne pas trop oxyder - est maintenu au sein de la cellule par des systèmes d'élimination des ROS.

Dans la cellule il existe donc un équilibre entre la production des ROS et leur élimination. Le stress oxydant est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur de la production des ROS qui conduit donc à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels. Ce déséquilibre pro/antioxydant peut avoir une origine exogène ou endogène [65, 66,67].

## III.2. Principales sources des dérivés réactives de l'oxygène

### III.2.1. Sources endogènes

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes. Toutefois, la source endogène prépondérante de radicaux libres est la mitochondrie.

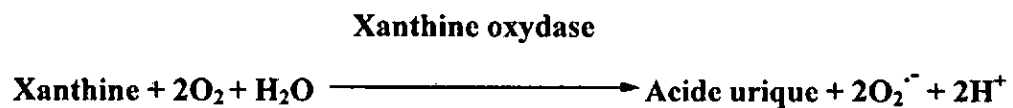
#### III.2.1.1 L'auto-oxydation de petites molécules

Une importante source des ROS cellulaires est liée à l'auto-oxydation de molécules comme la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'anion superoxyde. L'impact de ces auto-oxydations sur la régulation du stress oxydant n'est pas encore clairement défini [65].

### III.2.1.2. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. 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 cellulaire de la xanthine oxydase est principalement cytoplasmique. La production de ROS par la xanthine oxydase est faible en conditions basales, mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie-reperfusion [65].

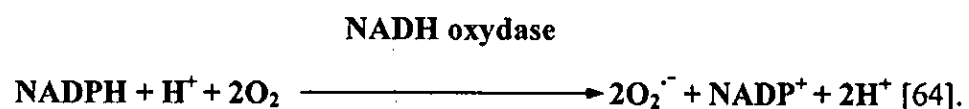
Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi l' $O_2^{\cdot -}$  [68].



### III.2.1.3. NADPH oxydase

La NADPH oxydase est localisée principalement au sein du lysosome des macrophages ou des neutrophiles, elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les microorganismes [59,69].

En effet, cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée, elle permet ainsi de transférer du NADPH à l'oxygène afin de produire du  $O_2^{\cdot -}$ . Cette production de superoxyde est à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'hypochlorite ( $ClO^-$ ), indispensables à la destruction du matériel phagocyté [69,70].



### III.2.1.4. Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS. Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum comme par exemple la sécrétion des protéines [59].

### III.2.1.5. Peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production d' $H_2O_2$  cellulaire. Toutefois, l' $H_2O_2$  est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' $H_2O_2$  produit à niveau de peroxysomes pourrait échapper à la catalase [59].

### III.2.1.6. Mitochondrie

La mitochondrie constitue la principale source des ROS par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produit en effet 90% des ROS cellulaires [59].

Les observations en microscopie électronique montrent que la taille moyenne des mitochondries varie de 0,5 à 1  $\mu m$ . Ces organelles possèdent deux membranes (une membrane externe et une membrane interne) qui définissent deux compartiments : l'espace intermembranaire et la matrice. La membrane interne est plissée (nombreuses crêtes) et présente une perméabilité sélective tandis que la membrane externe est relativement poreuse vis-à-vis de molécules de faible poids moléculaire (< 5 KDa) [71,72].

Les principaux complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire sont situés dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette dernière est donc le siège de la respiration qui correspond à un transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final : l'oxygène [51, 65]. La chaîne respiratoire est ainsi constituée d'une suite de réactions d'oxydoréduction associant l'oxydation du NADH et du  $FADH_2$  à la réduction de l'oxygène et la formation de l'eau. Elle est composée de quatre complexes hétéropolymériques localisés dans la membrane interne mitochondriale [71].

Le complexe I (*NADH ubiquinone oxydoréductase*) est le plus gros des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire avec une masse d'environ 980 000 daltons et 45 ou 46 sous-unités polypeptidiques différentes. Il accepte les électrons du NADH et les transmet, par l'intermédiaire d'une flavine et de sept ou huit centres fer-soufre, à l'ubiquinone UQ qui transfère secondairement ces électrons au complexe III. Ce complexe expulse des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Plus de 60 familles différentes de composés sont identifiées comme des inhibiteurs du complexe I, dont le plus connu est la roténone.

Le complexe II (*succinate ubiquinone oxydoréductase*) a une masse d'environ 200000 daltons. Il est commun au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire. En effet, ce complexe réalise l'oxydation du succinate en fumarate pour réduire le FAD en  $FADH_2$  et les

et  $\text{FADH}_2$  provenant de la dégradation des métabolites (glucose, acides gras et acides aminés) à l'oxygène par l'intermédiaire d'une série de transporteurs d'électrons appelés collectivement la chaîne de transport des électrons (fig. 5). Selon la théorie chimiosmotique, l'énergie issue du transfert des électrons à travers cette chaîne de transport est utilisée pour pomper les protons à travers la membrane mitochondriale interne, de la matrice vers le cytosol. Un gradient électrochimique est alors produit, constitué d'un gradient de protons et d'un potentiel de membrane. Les protons retournent alors dans la matrice à travers le complexe ATP-synthase (complexe V), permettant la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique [76,77]. Les électrons à haute énergie sont donc pris en charge par la chaîne respiratoire où leur énergie est convertie en un gradient de protons survivant à la phosphorylation de l'ADP en ATP [74].

Ces électrons, après s'être vu débarrassés de leur énergie, sont captés par les molécules d'oxygène qui sont réduites en eau. Dans les conditions de fonctionnement optimal, entre 5 à 15% des électrons à haute énergie tombent de la chaîne de transporteurs prématurément. Ils sont directement captés par les molécules d'oxygène qui se transforment non pas en eau mais en radical superoxyde toxique [74].

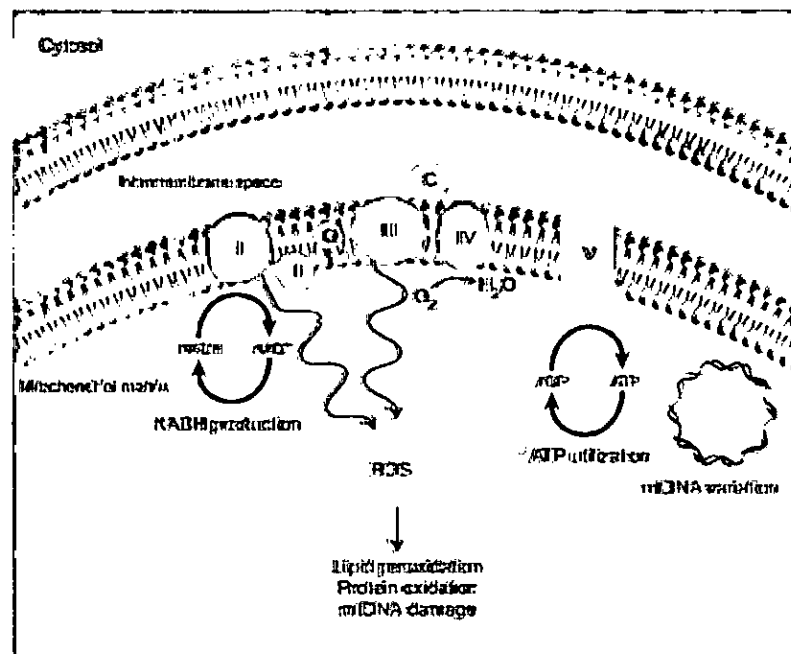


Figure 6 : Production des ROS par la mitochondrie [78].

Les espèces oxygénées réactives sont donc la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme. Leur production est permanente et physiologique [77].

### III.2.2. Sources exogènes

En plus de nombreux systèmes endogènes produisant des radicaux libres, il existe, de nombreuses sources exogènes participant à cette production. Ainsi, les rayonnements électromagnétiques (radiations ionisantes, lumière ultraviolette) certains métaux de transitions (fer), les fumées de combustion (de cigarette, de bois, de matériaux de construction), les produits chimiques (médicaments, pesticides, solvants), les poussières d'amiante et de silice sont autant de facteurs qui contribuent à la genèse des radicaux libres [74,75].

### III.3. Systèmes antioxydants

Les types de radicaux produits ainsi que leurs lieux de production et de propagation étant variés, la riposte antiradicalaire est polymorphe et fait intervenir un vaste réseau de défense antioxydante.

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Les antioxydants sont donc enzymatiques et non enzymatiques [79, 80,81].

#### III.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. Les trois enzymes antioxydantes majeures sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GPx). Aussi bien l'activité que l'expression des gènes codants pour ces enzymes peuvent être augmentées lors d'un stress oxydant [82].

##### III.3.1.1. Superoxyde dismutases (SOD)

Les superoxyde dismutases (SOD) constituent un des systèmes majeurs de défense cellulaire combattant les effets toxiques de l'oxygène [83]. Ces enzymes sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation. Leur rôle est de transformer dans les mitochondries les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) évitant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme la peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) ou le radical hydroxyle ( $HO^\cdot$ ) [84, 85,86].



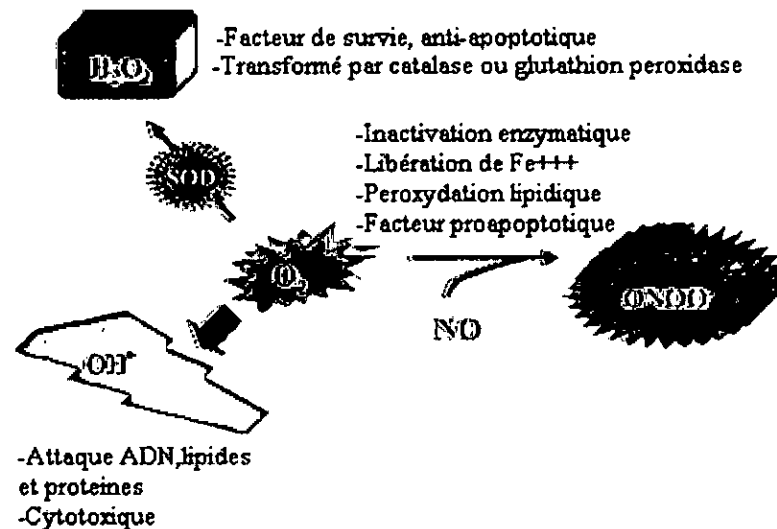


Figure 7 : Dismutation de l'anion superoxyde par les SOD [87].

Les SOD existent sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et leur cofacteurs métalliques : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (Ec-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire [59,88].

Si la SOD Mn semble indispensable à la vie, ce n'est pas le cas pour la forme cytosolique, même si celle-ci joue un rôle important dans l'élimination des ROS [65].

### III.3.1.2. Glutathion peroxidase (GPx)

Les glutathion peroxydases (GPx) agissent en synergie avec les SOD puisqu'elles prennent en charge le  $H_2O_2$  produit à leur niveau en réduisant ce dernier en  $H_2O$ . Elles font partie d'un système complet qui joue un rôle central, non seulement dans le mécanisme d'élimination de  $H_2O_2$  mais également dans la prise en charge des lipides peroxydés [60].

Pour leur fonctionnement, les GPx utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG). Le rapport GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule. Dans les conditions physiologiques, la forme glutathion réduit est prédominante (95 %) [65,89].

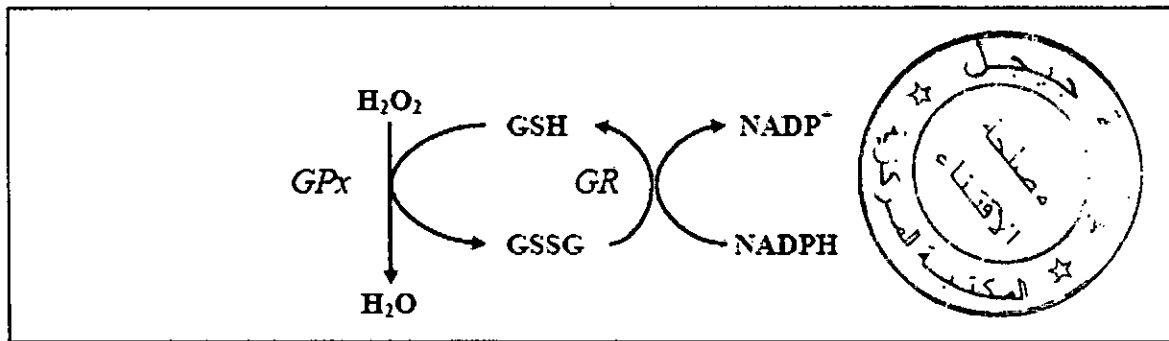


Figure 8 : Elimination du  $H_2O_2$  par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR

Il existe plusieurs isoformes de GPx contenant du sélénium : 1) la GPx cytosolique et mitochondriale, présente dans la plus part des tissus 2) la GPx phospholipide-hydroperoxyde (HPGPx) se trouve dans le cytosol et peut directement réduire les phospholipides, hydroperoxyde et les hydroperoxydes de cholestérol 3) et enfin la GPx extracellulaire [65].

### III.3.1.3. Les catalases

Les catalases qui se localisent surtout dans les peroxyosomes dismutent le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en oxygène et en eau [90, 91,92]. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène ; mais leur rôle reste très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier [89].

Toutefois, ces enzymes semblent jouer un rôle important en présence d'une forte concentration de  $H_2O_2$  à la différence des GPx qui l'éliminent même en faible quantité [60].

### III.3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques

En plus des systèmes enzymatiques, la cellule peut disposer de l'appui de molécules antioxydantes capables de capter et détruire les molécules toxiques. Parmi celles-ci, certaines sont synthétisées par nos cellules, mais la plus part de ces composés sont des vitamines qui doivent nécessairement être apportées par l'alimentation [74].

Dans cette catégorie d'antioxydants nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome C et les vitamines E et C [59].

#### III.3.2.1. Les oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes

antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique du cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. 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) [59].

### III.3.2.2. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide dont la concentration intracellulaire est importante de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  mol/l [93]. Il est riche en soufre ce qui lui confère son rôle de piègeur de radicaux libres jouant ainsi un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX [59,69,89]. Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique [70].

### III.3.2.3. Ubiquinone et cytochrome C

L'ubiquinone ou coenzyme Q<sub>10</sub> est une molécule dotée des propriétés antioxydantes particulièrement complexes [94]. En effet, sous sa forme réduite appelée « ubiquinol », le Q<sub>10</sub> protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxytes. Elle est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS.

Le cytochrome C présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre  $O_2^{\cdot -}$  produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe III formant du cytochrome C oxydé et de H<sub>2</sub>O [59].

### III.3.2.4. Vitamine E et vitamine C

La vitamine E (-tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant [59].

La vitamine E étant liposoluble, elle est reconnue comme antioxydant grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques assurant ainsi la protection de la surface des lipoprotéines et des membranes cellulaires [95,96].

Par réaction avec les radicaux libres, la vitamine E peut toutefois avoir des effets prooxydants. En effet, si le flux de radicaux libres formé est important, la vitamine E devient à son tour une

entité radicalaire qui contribue à augmenter les peroxydations lipidiques. Ces effets prooxydants de la vitamine E n'existent toutefois plus si la vitamine C est présente dans le milieu. Il s'agit, en effet, du fameux effet de synergie qui existe entre la plus part des vitamines antioxydantes [97].

La vitamine C – En plus de sa capacité à régénérer la vitamine E – est très efficace contre les radicaux peroxydes, hydroxydes et superoxydes ainsi que contre les peroxinitrites. Elle représente de ce fait, l'antioxydant hydrosoluble majeur [96,98].

### **III.4. Dégâts oxydatifs cellulaires**

Les ROS peuvent potentiellement réagir avec chaque composant cellulaire et provoquer son oxydation. Cependant, les cibles préférentielles des ROS sont les lipides, suivis par les protéines et les bases constitutives du matériel génétique. L'oxydation (altération) de ces composants cellulaires peut conduire à des pertes de fonction et de l'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) [59, 82,99].

#### **III.4. 1.Oxydations des protéines**

La fonction et l'activité des protéines sont profondément affectées par n'importe quelle altération de leur structure [100].

Les effets des ROS sur les protéines sont complexes, allant de l'oxydation du squelette protéique, c'est-à-dire de la chaîne polypeptidique conduisant à son clivage, à celle des chaînes latérales de différents acides aminés. Certaines protéines voient leur activité augmenter suite à une oxydation, mais la plus part deviennent inactives [98].

Les protéines modifiées par l'oxydation vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (heat shock protein HSP). Ces HSPs permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide [65]. Ainsi, les membres de la famille HSP 70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS [59].

### III.4. 2. Peroxydation lipidique

Les milieux biologiques contiennent une variété d'acides gras polyinsaturés qui sont localisés préférentiellement dans les lipides membranaires assurant la fluidité des membranes. Ces derniers sont toutefois le site privilégié de l'attaque radicalaire en raison de leur degré élevé d'insaturation [59, 101,102].

Les acides gras polyinsaturés contiennent, en effet, des doubles liaisons particulièrement susceptibles à l'attaque des  $\text{OH}^\cdot$ . En présence d'oxygène, la réaction radicalaire se propage formant un radical peroxyde  $\text{LOO}^\cdot$ , qui peut réagir lui-même sur une autre molécule d'acide gras polyinsaturé produisant de proche en proche une peroxydation de tous les lipides membranaires. La réaction radicalaire peut s'arrêter si deux radicaux identiques ( $\text{LOO}^\cdot$ ) réagissent entre eux pour donner une molécule de peroxyde  $\text{LOOL}$  (formé de deux molécules de lipides oxydés) et une molécule d'oxygène  $\text{O}_2$  ou si un autre radical  $\text{OH}^\cdot$  et un radical peroxyde  $\text{LOO}^\cdot$  réagissent entre eux pour donner un peroxyde  $\text{LOOH}$  et une molécule d'oxygène  $\text{O}_2$ , ces réactions entraînent obligatoirement une modification de la structure lipidique des membranes ce qui diminue la fluidité membranaire. De plus, des dérivés de lipides peroxydés, dont certains sont cytotoxiques, sont formés : le plus important étant le malondialdéhyde ou MDA, la mesure de sa concentration est utilisée pour mettre en évidence une attaque de lipides par les radicaux libres [101, 103,104].

### III.4. 3. Dommages de l'ADN

Les ADN nucléaires ou mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante des attaques radicalaires qui peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Les radicaux libres agissent, en effet, en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins. Les cassures observées sont dues aux radicaux  $\text{OH}^\cdot$  issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélaté à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN [86].

Les différents dommages de l'ADN semblent fortement impliqués entre autre dans les phénomènes de mort cellulaire par apoptose avec l'induction du port de transition de perméabilité (PTP) [59,65].

#### III.4. 4. Activation du pore de transition de perméabilité

La structure du PTP est complexe et encore débattue. L'hypothèse dominante consiste à définir le PTP comme un canal transmembranaire composé de protéines situées au niveau de la matrice et des membranes mitochondriales.

Ce complexe protéique serait constitué par la translocase des nucléotides adényliques (ANT) située dans la membrane mitochondriale interne, la cyclophiline D matricielle et le canal à anions voltage-dépendant (VDAC), ou porine, ce canal non spécifique est un acteur central dans la diminution de la force promotrice et provoque un gonflement mitochondrial [71].

Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques (Cyt C, AIF [Apoptose Inducing Factor]). Le Cyt C alors relargué interagit avec Apaf 1 (Apoptosis Activating Factor 1) et la procaspase 9, ce qui a pour conséquence l'activation de la cascade des caspases déclanchant l'apoptose.

L'ouverture du PTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant.

Les ROS agissent directement sur l'ouverture du PTP, cette ouverture serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore [59].

### III.5. Le stress oxydant induit par les pesticides

Les pesticides sont largement connus pour avoir de nombreux effets dommageables sur les différents tissus et systèmes biologiques. Pour tenter d'identifier le mécanisme d'action précis de ces substances chimiques, des études de plus en plus nombreuses examinent, le lien entre l'exposition à ces substances et l'induction d'un stress oxydant responsable des effets dommageables observés [105].

Les résultats des différentes études semblent corroborer ce mécanisme d'action. En effet, de nombreuses études récentes [106; 107, 108, 109, 110, 111, 112] montrent que la toxicité induite par de nombreux pesticides appartenant à différentes classes chimiques est associée par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et de produits dérivant de lipides membranaires endommagés tels que les substances réactives de l'acide thiobarbiturique et des diènes conjugués.

Betoulle [113] a montré que le lindane ( insecticide organochloré) augmente de façon dose-dépendante la production de radicaux libres oxygénés par les phagocytes en activant la protéine kinase C, d'autre part, une augmentation significative des cytochromes P450 des microsomes hépatiques, de l'activité superoxyde dismutase cytoplasmique et de la peroxydation lipidique est observée chez le rat Wistar exposé pendant 15 ou 30 jours par ingestion de nourriture contenant 1,8 mg/ kg/j de lindane [114].

Dans les follicules ovariens isolés, le methoxychlore entraîne une diminution des activités enzymatiques régulant le statut oxydo-réducteur (SOD, CAT) et modifie l'activité respiratoire des mitochondries [115].

D'après Delgado et al [116], le malathion (insecticide organophosphoré) inhibe l'activité des enzymes de régulation du stress oxydant, diminue la production d'ATP et altère la matrice mitochondriale.

Bagchi et al [117], ont montré que l'alachlore et le chlorpyrifos (insecticides) induisent *in vitro* sur des cellules neuronales un stress oxydant conduisant à une peroxydation lipidique, des cassures simple ou double brins de l'ADN, ainsi qu'à une induction de protéines heat shock.

Les mécanismes moléculaires par lesquels les pesticides provoquent un stress oxydant peuvent être multiples, l'induction des cytochromes P450 représente toutefois la piste la plus intéressante. Les pesticides se caractérisent, en effet, par leur capacité à induire des enzymes hépatiques détoxifiantes, de type monooxygénases, à cytochrome P450 assurant la transformation de la plus part de ces molécules en leurs métabolites excrétables de

l'organisme. Or, il est bien établi que les monooxygénases produisent au cours de leur cycle catalytique des espèces réactives de l'oxygène responsables de multiples dommages cellulaires caractérisant le stress oxydant [118,119].

### III.5.1. Le métabolisme des pesticides

Etant donné la grande diversité moléculaire entre les différents groupes de pesticides voire même entre les substances appartenant à un même groupe chimique, le processus métabolique implique une multitude d'enzymes présentant des spécificités variées. Ce dernier est, en effet, difficile à appréhender par un modèle commun et les informations disponibles sont généralement spécifiques d'une molécule donnée. Il est cependant bien admis que les pesticides, comme tous les autres xénobiotiques subissent les deux phases classiques de détoxification à savoir : phase I et phase II.

Les réactions de la phase I fonctionnalisent la molécule, la rendant plus hydrophile, donc favorisent son élimination. Ce sont en général des réactions d'oxydation qui font intervenir des mono oxygénases à cytochrome P450. Il est important de savoir que les pesticides peuvent servir non seulement des substrats pour cette enzyme, mais aussi des inhibiteurs ou des inducteurs.

La phase II conjugue la molécule obtenue après la phase I, avec des accepteurs cellulaires (glucuronide, glutathion, sulfates...) ce qui permet la formation d'un composé hydrosoluble facilement excrétable. Les enzymes impliquées dans ce processus sont surtout des transférases [120, 121, 122,123].

#### III.5.1.1. Métabolisme des pesticides organophosphorés

Les organophosphorés se caractérisent par une structure pouvant renfermer une variété d'atomes (C, O, N, P, S et Cl) et de groupements fonctionnels (Acides, Alcools, Esters et Ethers). De nombreux molécules appartenant à cette classe chimique comportent dans leur structure un groupement thion ( $P=S$ ), l'exemple inclut : parathion, méthyl parathion, chlorpyrifos et diazinon. Ces derniers subissent dans l'organisme une conversion métabolique des thions ( $P=S$ ) en oxons ( $P=O$ ) présentant une très forte réactivité. En effet, les formes oxons de certains organophosphorés, comme le paraxon et le chlorpyrifos-oxon, sont approximativement 1000 fois plus réactives que leurs générateurs : parathion et chlorpyrifos.



De plus, les formes oxons sont des puissants inhibiteurs des acétylcholinestérases (AChE), ce sont, en effet, ces dernières qui sont responsables de la toxicité aiguë dans le système nerveux.

L'activation métabolique en formes oxons est assurée par le cytochrome P450 notamment dans le foie, la réaction mise en jeu est une désulfuration, ainsi, l'atome de soufre S du groupement P=S est attaqué par l'oxygène donnant la forme oxon (P=O) plus une forme active de soufre (S:) elle aussi hautement réactive et capable d'endommager les protéines environnantes y compris les cytochromes CYTs.

Les formes oxons sont ensuite détoxifiées par des réactions d'hydrolyse catalysées par des estérases.

Outre la désulfuration, les organophosphorés peuvent subir une déarylation catalysée elle aussi par le cytochrome P450, cette dernière ne conduit toutefois pas à la génération des intermédiaires réactives, il s'agit, en effet, d'une détoxification.

Pour illustrer le métabolisme des organophosphorés, celui du chlorpyrifos (O, O-diethyl [3, 5,6-trichloro-2-pyridyl]- phosphothionate] est représenté dans la figure 9.

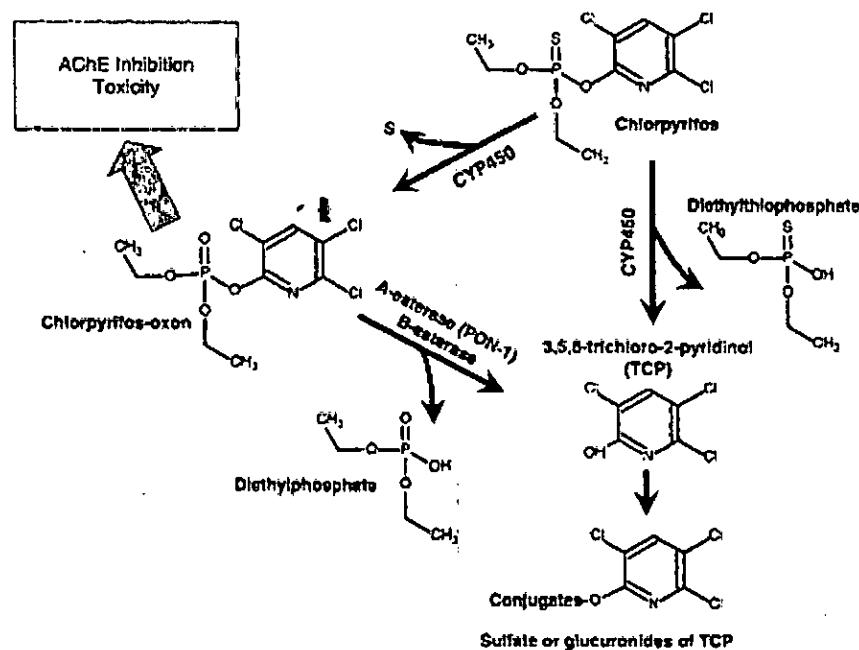


Figure 9 : Métabolisme du chlorpyrifos [124].

Comme le schéma indique, le chlorpyrifos subit soit une désulfuration conduisant à la formation du chlorpyrifos-oxon qui sera ensuite hydrolysé par les estérases hépatiques en

3,5,6- trichloro-2- pyridinol (TCP) et un groupement diethyl phosphate ou plutôt une déarylation formant directement le TCP et un diethyl thiophosphate.

Les études effectuées chez l'homme et les rongeurs ont montré que le métabolite primaire TCP subit ultérieurement une conjugaison avec le sulfate ou le glucuronide permettant de l'excréter en dehors de l'organisme [122, 123,125].

### III.5.1.2. Métabolisme des carbamates

Bien qu'il existe une grande diversité structurelle entre les molécules appartenant au groupement chimique des carbamates, elles sont, en effet, toutes dérivées de l'acide carbamique  $\text{-HOC(O)NH}_2$ . Leur métabolisme inclut comme, pour les autres xénobiotiques, des réactions d'oxydation, de hydrolyse et de conjugaison.

La voie métabolique majeure permettant de détoxifier les carbamates est l'hydrolyse catalysée notamment par des estérases non spécifiques comme les carbE. A cause de l'abondance des estérases chez les mammifères, le taux d'hydrolyse des carbamates est supérieur à celui présent chez les insectes ou les plantes.

Pour illustrer le métabolisme des carbamates, on prend l'exemple représentatif du carbaryl, un produit largement employé comme insecticide. Son processus métabolique est représenté dans la figure 10.

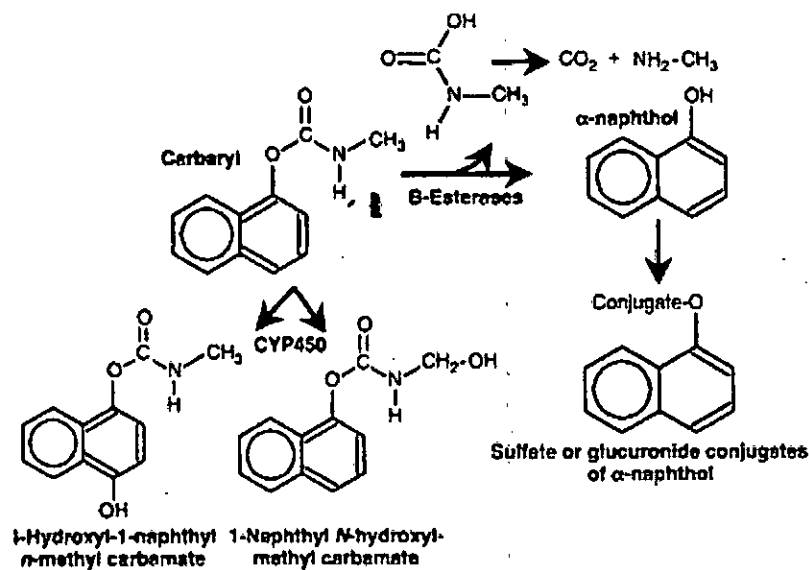


Figure 10 : Métabolisme du carbaryl [122].

Le carbaryl subit, en premier lieu, une hydrolyse par clivage de la bonde ester, ce qui génère le  $\alpha$ -naphthol plus un dérivé méthylé de d'acide carbamique qui est instable et qui se décompose rapidement en  $\text{CO}_2$  et la monométhyleamine ( $\text{CH}_3\text{NH}_2$ ).

Le produit de l'hydrolyse ( $\alpha$ -naphthol) peut ensuite être éliminé par conjugaison avec le sulfate ou le glucuronide.

En plus de l'hydrolyse, le carbaryl peut subir une oxydation par le cytochrome P450, mais cette voie reste, en effet, minime et n'intervient que rarement dans le processus métabolique du carbaryl [122,123].

### III.5.1.3. Métabolisme des organochlorés

Etant tous des inducteurs enzymatiques plus ou moins puissants, les organochlorés entraînent, en effet, une prolifération microsomale essentiellement hépatique avec stimulation du système des mono-oxygénases ( cytochrome P450 ), ils amplifient donc leur propre métabolisme. Ce mécanisme d'action est en partie responsable de la toxicité sur le foie, plus clairement montrée dans les expérimentations animales que chez l'homme (le foie est souvent un des principaux organes cibles de la toxicité chronique des organochlorés chez les rongeurs).

Pour l'insecticides organochloré dieldrine, deux voie de transformation sont, en effet, proposés chez le rat : la première faisant intervenir une oxydation par les cytochromes P450, conduit à la formation de la 9-dihydroxydieldrine, qui est par la suite glucuronoconjuguée et éliminée dans la bile, la seconde, après ouverture de l'époxyde par une époxyde hydratase, conduit à la 6,7-trans-dihydroxydihydroaldrine [126].

## IV. MATERIEL ET METHODES

L'objectif général de ce travail est d'étudier le stress oxydatif secondaire à la contamination potentielle des eaux d'alimentation de la ville de Jijel par les pesticides.

Pour répondre à cet objectif, il a été nécessairement dans un premier temps de mettre au point un dosage sensible et spécifique de façon à déceler toute trace de pesticides pouvant contaminer les eaux en question. L'analyse des résultats de cette première partie a permis de définir une deuxième qui porte sur l'évaluation des effets prooxydants de ces substances *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, après avoir déterminé l'effet de ces molécules sur des homogénats et des mitochondries de foie, une étude a été réalisée chez des rats pour mieux cerner la l'implication des dommages oxydatifs dans la toxicité induite par les pesticides.

L'analyse des résidus de pesticides dans l'eau ainsi que l'évaluation des effets prooxydants de ces substances ont été effectués au laboratoire de Pharmacologie et de Phytochimie à l'Université de Jijel.

### IV.1. Analyse de résidus de pesticides dans l'eau

#### IV.1.1. Présentation de la zone d'étude

##### IV.1.1.1. Situation géographique

Notre zone d'étude est localisée dans la région de Taher située à 18 Km à l'est de Jijel, dans la Wilaya de Jijel. Cette dernière est une ville du nord-est de l'Algérie, elle est située à 360 Km à l'est de la capitale Alger et s'étend sur une superficie de 2398,69 Km<sup>2</sup> avec une façade maritime de 120 Km.

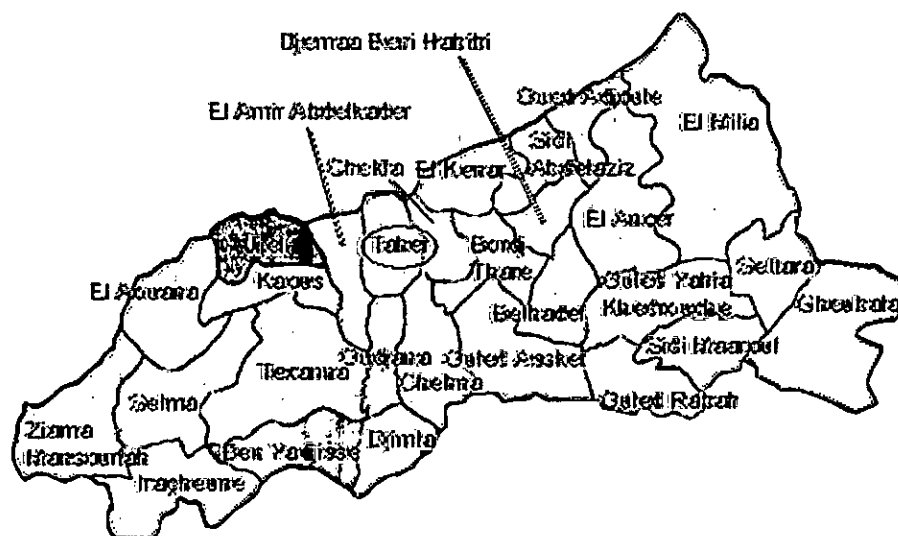


Figure 11 : Situation géographique de la zone d'étude.

#### IV.1.1.2. Climatologie

La Wilaya de Jijel est soumise au climat méditerranéen comportant des étés secs et tempérés et des hivers doux et humides, les températures varient entre 20 et 35 C° en été et 5 à 15 C° en hiver. La saison de pluies dure 6 mois environ avec une moyenne de 1200 mm/ cm de précipitations, cela fait que Jijel détient le record de la pluviométrie en Algérie, ce qui lui assure d'importantes ressources en eaux superficielles. Cette abondance des pluies donne à la région une vocation forestière et arboricole en zones de piémonts et de montagnes favorisant les élevages de bovins notamment.

Les valeurs mensuelles de la pluviométrie et de la température durant la période (1997-2006) sont consignées dans le tableau 2 et les variations sont illustrées par les figures 11 et 12 respectivement.

MOIS	TEMPERATURES (C°)			PLUIES (mm)
	MINIMALE (Tm)	MAXIMALE(TM)	MOYENNE	
Janvier	06.41	16.19	11.30	160.2
Février	06.06	16.00	11.03	107.3
Mars	08.01	18.99	13.50	45.80
Avril	09.68	20.83	15.25	73.80
Mai	13.34	23.87	18.60	49.50
Juin	16.73	28.02	22.37	12.40
Juillet	19.24	30.53	24.88	13.40
Août	20.30	31.60	25.95	18.20
Septembre	18.20	28.84	23.52	89.50
Octobre	15.16	26.37	20.76	63.70
Novembre	10.24	20.06	15.15	172.6
Décembre	13.40	17.62	12.81	191.2

**Tableau 2 :** Moyennes mensuelles de Température (C°) et des précipitations (mm) à Jijel (Période 1997 à 2006, données O.N.M) [127].

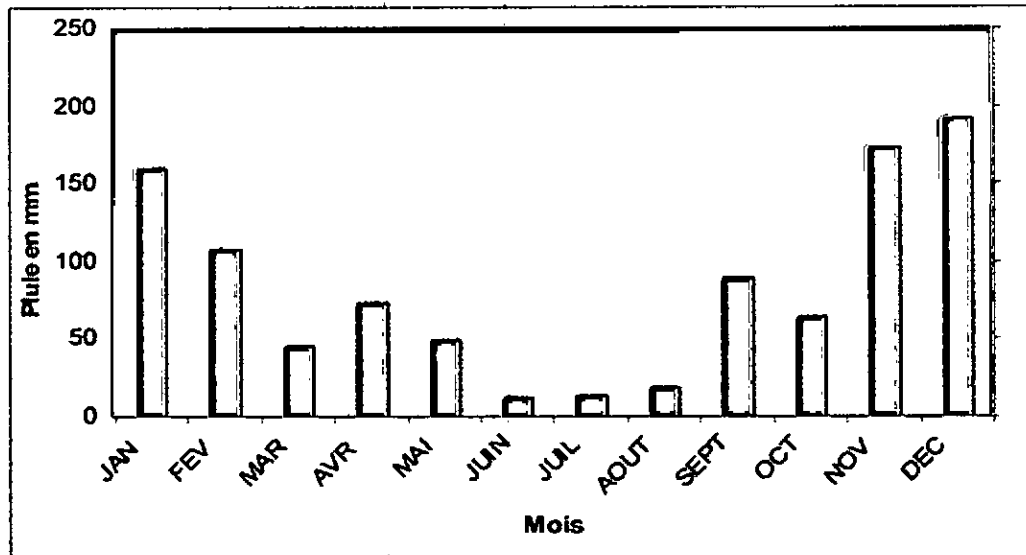


Figure 12 : Répartitions mensuelles des précipitation (mm) à Jijel (Période 1997 à 2006, données O.N.M) [127].

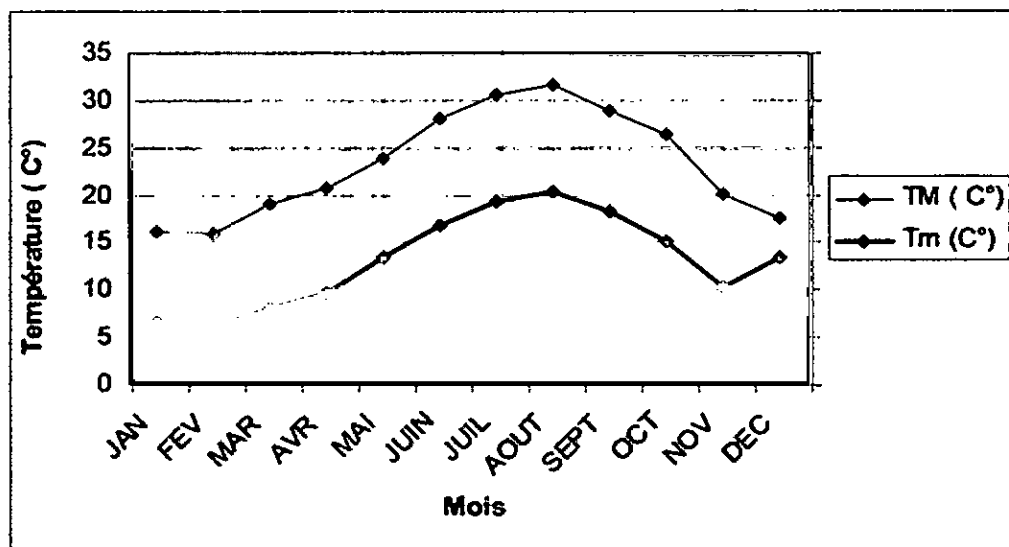


Figure 13 : Variations mensuelles de la température (C°) à Jijel (Période 1997 à 2006, données O.N.M) [127].

#### IV.1.1.3. Activités agricoles

A Jijel, la superficie agricole totale est estimée à 99024 ha, soit 41% de la superficie totale de la wilaya, la superficie agricole utilisable (SAU) est 43649 ha, cette dernière est occupée par deux types d'agricultures :

- une agriculture de montagne essentiellement de type extensif et subsistance occupant 65 % de la SAU totale fortement liée à l'oléiculture et à l'élevage bovin local.

- une agriculture de plaine dominée par le système de type semi-intensif occupant 35% de la SAU totale marquée par une polyvalence à dominance maraîchage et plasticulture.

La superficie des terres agricoles à haut potentiel productif est toutefois réduite notamment du fait du caractère montagneux de la wilaya (80%) [128].

#### **IV.1.1.4. Utilisation des produits phytosanitaires dans la région**

Du fait des avantages qu'elle offre, notamment les bonnes conditions climatiques et la fertilité des sols, notre zone d'étude située dans la plaine alluviale de Taher, est caractérisée par une forte production maraîchère destinée notamment à l'approvisionnement des marchés locaux. Cette culture, est en effet, connue pour être une grande consommatrice des produits phytosanitaires. En effet, devant l'intensification et les conditions écologiques souvent favorables aux déprédations, l'utilisation des pesticides est quasi indispensable car elle constitue la seule garantie pour les producteurs agricoles pour éviter les pertes et s'assurer d'une bonne production.

Ainsi, au niveau de notre zone d'étude, on a pu recenser une large gamme de substances actives appliquées sur les cultures. La classification de ces substances selon la cible visée laisse apercevoir un recours systématique aux trois grandes familles des pesticides à savoir les insecticides, les fongicides et les herbicides. Ainsi, au printemps, les applications sur les zones cultivées concernent les traitement herbicides puis insecticides et fongicides, ces deux derniers peuvent se prolonger jusqu'en été.

Selon la structure chimique, l'enquête conduite auprès de l'ensemble des distributeurs de produits phytosanitaires ainsi que les agriculteurs a montré que le traitement des cultures fait appel à un large panel de substances actives avec une rémanence très variable et un niveau de toxicité également variable. La liste des produits de synthèse les plus utilisés dans la région sont présentés dans le tableau suivant :

Familles chimiques	Matières actives	Noms commerciaux
Organochlorés	Endosulfan	Thiosulfan, Thiodam
Organophosphorés	Chlorpyrifos-Ethyl Pyrimiphos-Methyl Parathion-Methyl Ethoprophos	Dursban, Clorofect Phosal Methyl-Paratox, Pennicap Rhocap
Carbamates	Thirame Propoxur	Thisan Baygon, Propoxur
Pyréthroïdes de synthèse	Deltaméthrine Cyperméthrine Lambda-cyhalothrine	Décis, Alphythrine, Deltarin Cypercal, Cyper-As Lambda-Cythrine, Karaté

**Tableau 3 : Pesticides utilisés dans la zone d'étude selon les résultats de l'enquête.**

#### IV.1.2. Sites et moments de prélèvement des eaux souterraines

Six sites de prélèvement situés dans la région de Rhedjla ont été sélectionnés pour l'échantillonnage de l'eau souterraine. Ces sites sont des puits domestiques appartenant à des producteurs agricoles et situés à proximité des champs. Ils sont utilisés tant pour l'irrigation que pour la fourniture de l'eau potable. La profondeur de ces puits varie de 1,5 à 5 mètre et la distance entre le puits et les champs est de 0.1 à 1 Km. Ces points d'échantillonnage ont été retenus sur la base d'une liste fournie par le bureau d'hygiène de la commune de Taher classant ces points comme étant les plus sollicités par la population locale et les camions-citernes pour l'approvisionnement en eau potable.

Nous avons mené deux campagnes d'échantillonnage, la première du 17 février au 5 mars 2007 et la deuxième pendant la première semaine du mois janvier 2008. Lors de chaque campagne, nous avons prélevé de chaque site deux échantillons de l'eau potable, soit au total, 12 échantillons analysés lors de chaque campagne.



#### IV.1.3. Procédure d'échantillonnage

L'étape d'échantillonnage influence directement la qualité des résultats analytiques obtenus. Des précautions élémentaires sont alors nécessaires afin de minimiser les risques associés à la contamination et de permettre le maintien de l'intégrité des échantillons [ 129].

Ainsi, tous nos prélèvements ont été effectués dans des contenants de verre d'une capacité de 1 L préalablement décontaminés par nettoyage au méthanol puis à l'acétone.

Avant chaque prélèvement, nous avons laissé couler l'eau pendant 5 minutes, pour s'assurer que l'eau prélevée est représentative de celle circulant dans le système de distribution.

Sur le goulot de chaque flacon remplis, nous avons placé une feuille d'aluminium, afin d'empêcher tout contact entre l'échantillon et le bouchon en plastique.

Tous les flacons ont été immédiatement étiquetés pour éviter tous risque de confusion sur l'identité des échantillons (lieu et date de prélèvement) puis expédiés dans une glacière propre au laboratoire où ils ont été conservés à environ 4 °C jusqu'à extraction.

Les délais de conservation des échantillons ont été respectés. Ces délais sont de 7 jours entre le prélèvement et l'extraction et 40 jours entre l'extraction et l'analyse.

#### IV.1.4. Choix de la méthode d'extraction

L'analyse des pesticides contenus dans l'eau s'effectue le plus souvent par les méthodes chromatographiques notamment la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

L'analyse directe des échantillons de l'eau par (CPG) n'est toutefois pas réalisable, il faut, en effet, transférer les pesticides contaminants ces eaux dans un milieu compatible avec l'analyse chromatographique. Une étape d'extraction et de séparation est ainsi strictement nécessaire.

Pour séparer les pesticides de leur matrice aqueuse, différentes méthodes peuvent être utilisées : l'extraction liquide-liquide (ELL), l'extraction sur phase solide (EPS) ou encore l'extraction sur fluide supercritique (EFS) [38, 130].

L'extraction liquide-liquide est la méthode la plus fréquemment utilisée pour séparer les pesticides de l'eau. Cette dernière est basée sur le principe de partage de différents substrats entre la matrice aqueuse et un solvant non miscible.

Il s'agit d'une méthode efficace, présentant toutefois des inconvénients tels que la consommation de grands volumes de solvants, la formation des émulsions, ainsi que les risques liés à l'évaporation des solvants souvent toxiques ou inflammables [131, 132,133].

#### IV.1.4.1. Protocole d'extraction

Pour réaliser une extraction efficace des pesticides, il est impératif de choisir le solvant le mieux adapté selon les caractéristiques de substances qu'on veut extraire. Le choix du solvant s'opère parmi une large gamme de produits de polarité et de densité variables : hexane, éther de pétrole, dichlorométhane, chloroforme, octanol...etc [134].

Notre analyse est une analyse multirésiduelle visant à détecter toute matière active pouvant se trouver dans l'eau quelque soit le groupe chimique auquel cette dernière appartient, nous avons ainsi choisi le dichlorométhane comme solvant d'extraction.

Le fait de choisir le dichlorométhane permet d'augmenter l'efficacité d'extraction dès lors que ce dernier est capable d'extraire une large gamme de pesticides avec des polarités très différentes. En effet, en utilisant le dichlorométhane, non seulement les pesticides non polaires, mais également les pesticides polaires, voire même ceux les plus solubles dans l'eau peuvent être retenus sans perte dans la phase organique. En outre, le dichlorométhane présente l'avantage d'être très volatil facilitant ainsi l'étape de concentration d'échantillon [135,136].

Nous avons réalisé l'extraction liquide-liquide à partir de 500 ml d'eau percolée placée dans une ampoule à décanter de 1L aux quels nous avons ajouté 100 ml de dichlorométhane avant que l'ensemble soit agité durant 10 minutes.

Après décantation, nous avons récupéré la phase organique puis renouvelé l'extraction deux fois dans les mêmes conditions.

Les trois phases organiques obtenues ont été ensuite réunies puis filtrées à travers un filtre contenant 30 g de sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau du solvant.

L'extrait a été enfin concentré par évaporation en utilisant un évaporateur rotatif (rotavap) sous vide dans un ballon chauffé dans un bain-marie. Puis l'extrait sec a été dissout à nouveau dans 1 ml d'hexane de qualité CPG.

Après filtration sur des membranes de 0,45 $\mu$ m, la phase hexanique peut être analysée directement par CPG sans nécessité de passer par une étape de purification [137].

#### IV.1.5. Choix de la méthode d'analyse

L'analyse consistant à détecter les résidus de pesticides dans l'eau est l'une des tâches les plus difficiles, car les teneurs de l'eau en ces composés sont le plus souvent extrêmement faibles. Les pesticides sont, en outre, caractérisés par leur grande diversité notamment concernant leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que par leur coexistence avec des concentrations souvent élevées de composés interférents.

Une méthode sensible, est ainsi nécessaire pour la détection du plus grand nombre de composés possibles [138].

En effet, les techniques chromatographiques ont ouvert de multiples voies d'étude des résidus de pesticides, et le perfectionnement des détecteurs a permis d'atteindre des seuils de perception élevés.

Actuellement, plusieurs types de détecteurs spécifiques peuvent être couplés à un chromatographe : détecteur à capture d'électrons (ECD), détecteur azote-phosphore (NPD), détecteur à ionisation de flamme (FID), détecteur à conductibilité thermique (TCD)...etc. Mais le spectromètre de masse (SM) tend à supplanter tous les autres, car il est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie.

Ainsi, en couplant la CPG à un spectromètre de masse, les possibilités analytiques s'élargissent à une gamme très importante de pesticides. Raison pour laquelle, le couplage CG/ MS représente aujourd'hui la meilleure méthode de dosage pour les pesticides dans les différentes matrices environnementales [139].

#### IV.1.5.1. Principe de CPG / SM

En général, le couplage CG / SM consiste à séparer les composantes d'un mélange et à les identifier à partir de leur spectre de masse caractéristique.

La séparation par CG comprend la division d'un mélange entre la phase gazeuse mobile et une phase stationnaire.

L'échantillon est d'abord introduit en tête de la colonne puis se retrouve dans une petite chambre en amont de la colonne appelée injecteur. L'injecteur est traversé par le gaz vecteur et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon.

Une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le gaz vecteur à travers la colonne et se détacher les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La phase stationnaire va donc provoquer un phénomène de rétention chromatographique avec les composés. Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne.

A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un organe essentiel qui est le détecteur. Cet appareil va produire des ions à partir de chacun des constituants et les séparer en rapport masse / charge ( $m / z$ ) et à les détecter. Les informations obtenues permettent d'établir les abondances relatives des ions en fonction du rapport  $m / z$  et se présentent le plus généralement sous forme d'un histogramme. Ce dernier est spécifique du composé étudié dans les conditions d'analyse appliquées [139,140].

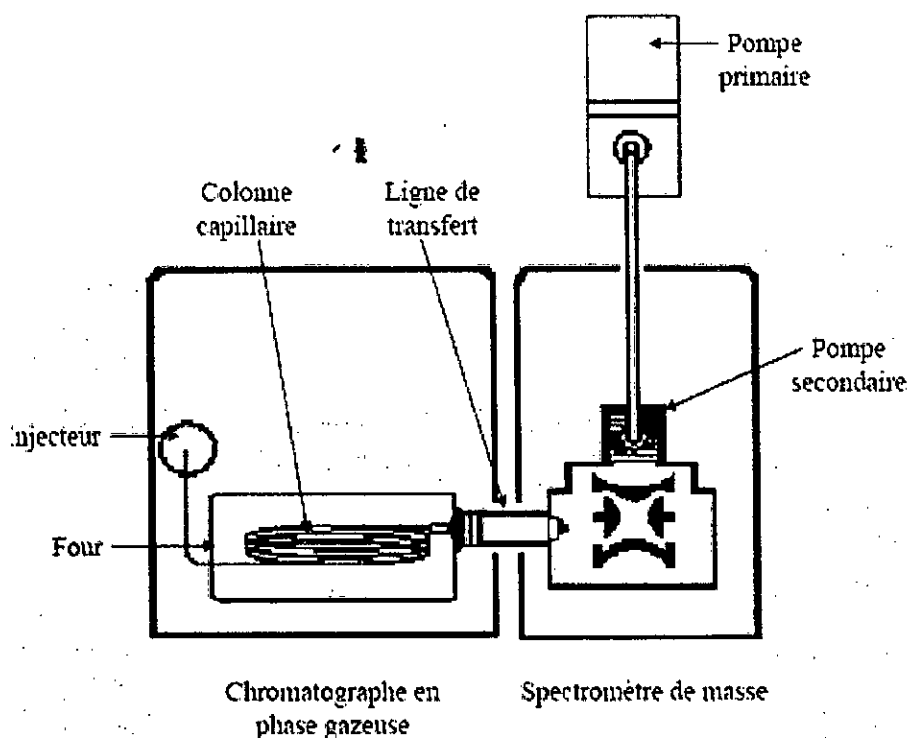


Figure 14 : Schéma d'un appareil de couplage CG-SM [139].

#### IV.1.5.2. Appareillage

Nous avons utilisé un chromatographe QP 2010 de SHIMADZU, équipé d'une colonne capillaire apolaire SE 30 (25mm, 0,25 mm, épaisseur du film 0,25  $\mu\text{m}$ ). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium N55 dont le débit a été fixé à 0.77 ml / min.

L'injection se fait en mode splitless pendant 48 secondes. Ce mode est choisi pour l'analyse de composés faiblement concentrés voire à l'état de traces. En effet, en mode splitless, la fuite est d'abord fermée ce qui permet le transfert de l'intégralité des composés en tête de colonne, puis réouverte afin de purger les vapeurs restantes par la fuite.

Un volume d'échantillon de 1  $\mu\text{l}$  est injecté manuellement à l'aide d'une microsiringue. L'énergie d'ionisation en impact électronique est de 70 eV et la température de l'injecteur est maintenue à 250 °C.

Le programme de température que nous avons choisi est le suivant :

T° initiale :	90 °C pendant 1 minute.
Programme 1 :	20 °C / minute.
T° finale :	180 °C pendant 1 minute.
Programme 2 :	2 °C/ minute.
T° finale :	240 °C pendant 1 minute.
Programme 3 :	20 °C/ minute.
T° finale :	310 °C pendant 10 minutes.
Temps d'analyse :	32,5 minutes.

## IV.2. Evaluation du stress oxydant lié aux pesticides

La seconde partie de notre travail est consacrée à l'évaluation de l'effet prooxydant de deux pesticides sélectionnés : chlorpyrifos (organophosphoré) et endosulfan (organochloré) *in vitro* puis *in vivo*.

Pour l'étude *in vitro*, nous avons incubé des homogénats de tissu (cytosol) ainsi que des mitochondries isolées du foie avec des concentrations croissantes ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-2}$  M) de deux pesticides chlorpyrifos et endosulfan.

Pour celle *in vivo*, les deux pesticides ont été administrés à des rats selon le protocole décrit ci-dessus :

### IV.2.1. Animaux

L'étude est réalisée sur des rats Albinos Wistar mâles provenant de l'institut Pasteur d'Alger (Algérie) dont le poids initial, à l'arrivée au laboratoire, est compris entre 200-240 g. Les rats sont installés dans des cages de 8 rats chacune et acclimatés aux conditions de température ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) et de cycle inversé jour/nuit 12 :12h. Durant toute la période de leur séjour dans l'animalerie, les rats ont reçu l'eau et la nourriture à volonté.

### IV.2.2. Traitement des animaux

Les rats ( $n=32$ ) sont répartis en quatre lots de 8 rats chacun :

**Lot 1 :** Animaux témoins recevant 0.2 ml d'eau distillée par voie orale chaque jour pendant 1 mois.

**Lot 2 :** Animaux recevant par gavage gastrique une dose quotidienne de 4 mg/kg de pesticide chlorpyrifos pendant 1 mois.

**Lot 3 :** Animaux recevant par gavage gastrique une dose quotidienne de 4 mg/kg de pesticide endosulfan pendant 1 mois.

**Lot 4 :** Animaux recevant par gavage gastrique une dose quotidienne de 4 mg/kg de l'association de deux pesticides : chlorpyriphos et endosulfan pendant 1 mois.

#### **IV.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement de foie**

A la fin de la période d'administration, les animaux sont sacrifiés, le foie est prélevé et divisé en trois fractions : la première est plongée dans le TSE et utilisée pour la préparation de la suspension mitochondriale utilisée pour le dosage des paramètres mitochondriaux (MDA et enzymes antioxydantes), la seconde dans la solution du KCl sert pour le dosage du MDA hépatique cytosolique, la troisième dans le tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4 ) contenant du KCl à 1.17% qui sert pour le dosage de l'activité des enzymes antioxydantes ( SOD et CAT ) cytosoliques.

#### **IV.2.4. Préparation (extraction) des mitochondries hépatiques**

L'isolement des mitochondries repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle selon la méthode décrite par Rustin et al [141]. Toutes les opérations se déroulent à 4 °C.

Après décapitation d'un rat, 10 g de foie sont prélevés, découpés en petits morceaux, puis rincés deux fois dans le tampon d'isolement (250 mM sucrose, 50 mM Tris, 5 mM EGTA, pH 7,2 ) ou TSE pour éliminer le maximum d'hématies.

Le tissu est broyé dans un potter en verre avec un piston en téflon (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA) contenant 30 ml de TSE ce qui permet la libération des mitochondries. L'homogénat obtenu est centrifugé à 1770 rpm (rond par minute) pendant 10 minutes en utilisant une centrifugeuse de type Sigma 6 K 15. A la suite de cette première centrifugation, à basse vitesse, permettant d'éliminer les gros débris cellulaires, le surnageant est récupéré et centrifugé à 9600 rpm pendant 10 minutes. Le culot mitochondrial ainsi obtenu est remis en suspension dans 13 ml de TSE. Cette suspension est de nouveau centrifugée à 9600 rpm pendant 10 minutes. Le culot contenant les mitochondries est alors repris dans 15 ml de tampon TS ( 250 mM sucrose, 50 mM Tris, pH 7 ) puis subir une dernière centrifugation à 9600 rpm pendant 10 minutes.

Le culot final est subdivisé en deux fractions : la première est reprise dans 200µl du tampon TS pour obtenir la suspension mitochondriale et la seconde dans la solution hypotonique (25

mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,2) qui sert à l'étude des enzymes antioxydantes mitochondriales.

Le concentration protéique de la suspension mitochondriale est déterminée par la méthode de Lowry avec l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard [142].

#### IV.2.5. Extraction de la matrice mitochondriale

Un mélange de solution hypotonique (25 Mm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,2) et du culot (V/V) est congelé-décongelé de 6-8 fois avec potterisation accrue et répétée afin d'éclater les mitochondries. Après centrifugation à 9600 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est utilisé comme source d'enzymes.

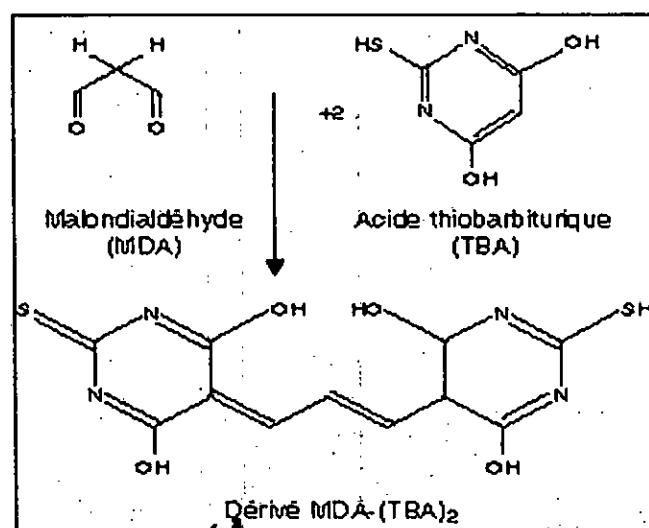
#### IV.2.6. Extraction de la fraction cytosolique

Pour extraire le cytosol des cellules hépatiques, nous avons suivi la méthode décrite en [143]. Après sacrifice d'un rat, 1 g de foie est prélevé, plongé puis homogénéisé dans trois volumes de KCl (1.17 %). L'homogénat est centrifugé à 800 rpm pendant 15 minutes à 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant ainsi obtenu est centrifugé une deuxième fois à 9600 rpm pendant 45 minutes à 4°C et le surnageant issu de cette dernière centrifugation est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques.

#### IV.2.7. Dosage de MDA mitochondrial

Le dosage du MDA, malondialdéhyde, est utilisé pour estimer la peroxydation des lipides dans les membranes et les systèmes biologiques. Le MDA est formé à partir d'une auto-oxydation et d'une dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés dans la cellule, lors d'un stress oxydatif. Le dosage permet donc de mettre en évidence les stress environnementaux pouvant induire une variation du niveau d'oxydation des lipides.

Il est basé sur le fait que le MDA réagit avec 2 molécules de TBA (acide thiobarbiturique) via une réaction d'addition nucléophile catalysée par l'acidité et produisant un chromogène rose-rouge qui absorbe au maximum à 532 nm.



**Figure 15 : Réaction du MDA avec l'acide thiobarbiturique ( TBA)**

Pour le dosage du MDA mitochondrial, nous avons suivi la méthode décrite en [144]. Les mitochondries hépatiques sont suspendues dans le NaCl 0,9 % de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 mg/ml. Nous avons utilisé trois tubes : le tube témoin contenant 800 $\mu$ l de la solution mitochondriale plus 100 $\mu$ l de NaCl, le tube blanc contenant 200 $\mu$ l de NaCl avec 800 $\mu$ l de la solution mitochondriale et le tube de mesure portant 800 $\mu$ l de la solution mitochondriale additionnée de 100 $\mu$ l de différentes concentrations de la substance à tester. Après incubation des tubes à 37°C pendant 10 minutes, nous avons ajouté dans le tube témoin 100 $\mu$ l de la solution de fer (50 $\mu$ l de FeCl<sub>2</sub> 1mM /50 $\mu$ l de FeCl<sub>3</sub> 3 mM) ce qui engendre une peroxydation à 100 % dans ce tube. Après une deuxième incubation de 30 minutes à 37°C et centrifugation de 15 minutes (3000 rpm) à 20°C, 1 ml du mélange (TBA 1% - NaOH 2N) est ajouté à 1 ml de surnageant. Le mélange est enfin incubé pendant 30 minutes à 97°C, refroidit, et la DO est lue à 530 nm. Les concentrations de MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant le tétraméthoxypropane.

#### IV.2.8. Dosage de MDA cytosolique

La peroxydation lipidique a été mesurée par l'essai d'acide thiobarbiturique TBA selon la méthode d'OKHAWA et al 1979 [145]. Le principe d'essai est le suivant : le MDA, un produit secondaire de la peroxydation lipidique, réagit avec deux molécules de TBA dans un milieu acide pour donner un pigment coloré en rose à 100 °C et pH de 2-3 extractible par le butanol et la DO a été lue à 530 nm.



Pour le dosage de MDA cytosolique, nous avons utilisé 1 g de foie additionné à 3 ml de la solution de KCl (1,15 M) puis broyé par un homogénéiseur de DOUNCE. A 0.5 ml de l'homogénat nous avons additionné 0.5 ml d'acide thiobarbiturique 0,67 %.

Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidit puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant à l'aide d'un spectrophotomètre Ultrospec 100 pro. Le taux de 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 de MDA cytosolique est réalisé chez les lots de rats de l'étude *in vivo*.

#### IV.2.10. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale

La catalase est une enzyme héminique peroxysomale qui possède quatre groupes protoporphyrines. L'activité catalytique a été mesurée selon la méthode de Claiborne (1985) [146] par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 240 nm pendant 1 minute à 25 °C. Cette diminution étant due à la dismutation du peroxyde d'hydrogène par la catalase selon la réaction :



En bref, la cuve de mesure contient 1 ml de tampon phosphate (0.1M, pH 7.2), 0.950 ml de peroxyde d'hydrogène (0.019M), 0.025 ml de la source enzymatique (la matrice mitochondriale ou le cytosol) et 0.015 ml de différentes concentrations de la substance à tester.

La lecture de la DO est effectuée à 240 nm chaque minute pendant deux minutes.

L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéines selon la relation suivante :

$$\text{UI/g de protéines} = (2.303/T) \log A_1/A_2 \text{ g de protéines}$$

Sachant que :

A<sub>1</sub> : absorbance au temps 0 min

A<sub>2</sub> : absorbance au temps 1 min

T : intervalle de temps en min

#### IV.2.11. Mesure de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale

L'activité SOD a été évaluée grâce à sa propriété de diminuer la photoréduction du NBT (*nitroblue tetrazolium*) selon la méthode de Fridovich et Beauchamp (1971) [147].

La SOD inhibe la réduction de NBT par l'anion produit suite à la photoréduction de l'O<sub>2</sub> et de la riboflavine, en présence d'un donneur d'électrons comme la méthionine, selon la réaction suivante :



La réduction du NBT par l'anion superoxyde en formazan a été suivie à 560 nm.

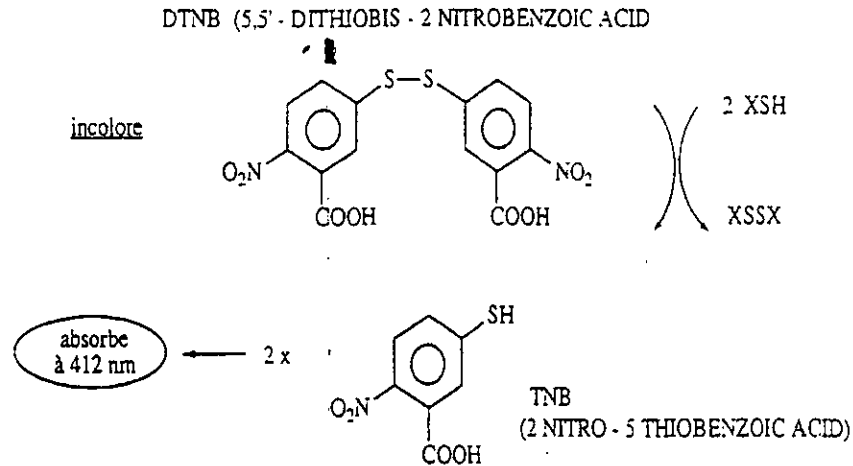
Le mélange réactionnel contient 2 ml du milieu réactionnel ( cyanide de sodium 10<sup>-2</sup> M, solution de NBT 1.76 × 10<sup>-4</sup> M, EDTA 66 × 10<sup>-3</sup> M et la riboflavine 2 × 10<sup>-6</sup> M ), 5 ml de la source enzymatique (cytosol ou matrice mitochondriale ) et 5µL de différentes concentrations de substances à tester. Le mélange a été irradié avec une lampe de 15 watts pendant 10 min. L'absorbance a été mesurée à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI/g de protéines. Le control est préparé dans les mêmes conditions mais en absence de la source enzymatique. Une unité d'activité de la SOD est définie en tant que la quantité d'enzymes requise pour empêcher la réduction du NBT par 50%.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance du control} - \text{absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance du control}} \times 100$$

$$\text{SOD UI/g de protéines} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35$$

#### IV.2.12. Dosage du glutathion hépatique

Pour le dosage du GSH, nous avons utilisé la méthode colorimétrique par le réactif d'ELLMAN (DTNB) comme décrit par Anderson [148]. La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5 dithiodis 2 nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :



**Figure 16 : Réaction de réduction du DTNB par le glutathion**

Pour cela, 1g de foie est homogénéisé avec trois volumes de l'acide trichloracétique TCA (5%) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE et centrifugé à 2000 tours / minute, ensuite 50 µl du surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M et pH 8). 20 µl du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 5 minutes d'incubation, la lecture de densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux de GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimées en millimole de glutathion par gramme de foie ( mmole/ g de foie).

### IV.3. Evaluation statistique

#### IV.3.1. La corrélation

Nos résultats de l'étude *in vitro* sont vérifiés par le calcul de la corrélation entre les concentrations des pesticides et les paramètres étudiés en calculant le coefficient de PEARSON ou de corrélation « r ». Si la valeur de r est voisine de zéro la corrélation est faible, plus r tend vers 1 la corrélation est forte, si  $r=1$  la corrélation est parfaite.

#### IV.3.2. Test de Student

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne et d'écart-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par le pesticides chlorpyrifos, endosulfan ou leur association à celles des groupes témoins en utilisant le test t de Student.

Ns : différence non significative ; \*  $p < 0.05$  : différence significative ; \*\*  $p < 0.01$  : différence très significative ; \*\*\*  $p < 0.001$  : différence hautement significative.

# Résultats & Interprétation

## V. Résultats et interprétation

### V.1. Résultats de la recherche des résidus de pesticides dans l'eau

La première partie analytique consiste à analyser les échantillons de l'eau potable ayant subi l'étape d'extraction par CG/SM afin de déceler les traces de pesticides pouvant contaminer cette eau. Les différents spectres obtenus sont représentés dans l'annexe 1. Le but de cette analyse n'est pas d'obtenir une quantification des substances, mais de mettre en évidence une éventuelle contamination par les résidus pesticides, il s'agit, en effet, d'une analyse qualitative.

A noter que dans un souci de confidentialité, l'identité des puits échantillonnés ne sera pas dévoilée, on se contente d'identifier, dans tout ce qui suit, chaque site de prélèvement par un numéro. Les chiffres de 1 à 6 désignent ainsi les différents points de prélèvement des eaux analysées.

Notre première campagne d'échantillonnage a été effectuée durant la période allant du 17 février au 5 mars 2007. Au total, 12 échantillons ont été prélevés de 6 points d'eau différents, pour chaque point on analyse ainsi deux échantillons d'eau. La technique d'identification des composés repose principalement sur l'interprétation des spectres de masse. Cette identification est faite par comparaison avec la bibliothèque de spectres de masse NIST « The National Institute of Standards and Technology » comportant des références pour 147 198 molécules différentes. Cette banque de données fournit pour chaque spectre une liste de substances avec leur poids moléculaire, leur pic de base, leur pureté et leur fit (ajustement) pour le spectre. Nous choisissons les fites les plus élevés révélateurs que la substance correspond le mieux au spectre de masse.

L'analyse globale des spectres obtenus montre l'existence d'une similitude des composés décelés avec toutefois des pics d'intensité variable d'un échantillon à l'autre. On constate, globalement, peu de variations dans la nature des molécules identifiées dans l'ensemble des échantillons analysés, nous avons ainsi choisi de présenter un chromatogramme, celui du premier échantillon prélevé du site N° 1 de la région de Rhedjla.

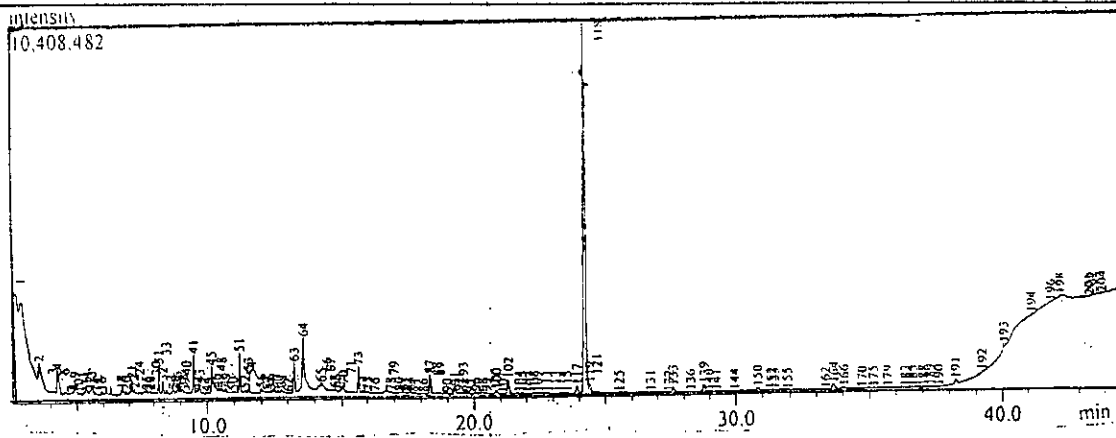


Figure 17: Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 1 (première campagne d'échantillonnage)

La figure 17 représente le chromatogramme du premier échantillon du site N° 1. On peut en premier lieu constater une forte présence des pics contaminants apparaissant par fois avec une forte intensité. Le pic contaminant majeur sort à environ 24 minutes, avec une forte intensité, son aire relative est 5.87 %, dans d'autres chromatogrammes, elle peut atteindre 42.30 % comme dans le cas du deuxième échantillon prélevé du site N°3. Il s'agit, en effet, de 1,2-benzendicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester. Ce composé est un contaminant apparaît dans la totalité des échantillons analysés par CG/SM.

La méthode d'analyse employée nous a permis de détecter la présence de plusieurs substances organiques telles que les alcools (acide oléique : pic N° 64, acide octadecanoïque : pic N° 79), aldéhydes (tétradécanal : pic N° 73, octanal : pic N° 51), cétones (Méthylcyclohexanone : pic N° 63) et les esters (9-octadecanoic acid (Z)-, methyl ester : pic N° 45).

Dans tous les échantillons analysés, des phtalates en quantités notoires ont été décelés (dibutyl phtalate : pic N° 41, dioctyl phtalate : pic N° 43, bezyl butyl phtaltes : pic N° 65).

On peut, en outre, constater la présence de certaines molécules utilisées comme des adjuvants dans la formulation de pesticides, comme par exemple : cyclononasiloxane octadecamlethyl (pic N° 44), naphthalene1-methyl heptanoic acid (pic N° 56), docosylester (pic N°102), apparaissant dans presque tous les échantillons analysés.

Quant aux molécules de pesticides, l'analyse des profils spectraux des différents échantillons n'a pas permis de déceler aucune de ces molécules, à des doses décelables par la méthode analytique employée. L'interprétation des spectres des composés se trouvant à l'état de traces

dans certains échantillons analysés a, en effet, était limitée notamment par un trop fort bruit de fond, qui empêche de distinguer les spectres de masse des composés traces.

La deuxième campagne d'échantillonnage, a été effectuée pendant la première semaine du mois janvier 2008, une série comportant aussi 12 échantillons a été prélevée des même points d'eau retenus pour le prélèvement des échantillons de la première série. D'une façon globale, l'analyse des profils spectraux de l'ensemble des échantillons a permis de mettre en évidence au total 3 molécules de pesticides, il s'agit du pesticide organophosphoré chlorpyriphos et des organochlorés :  $\alpha$ -endosulfan (endosulfan) et l'un de ses isomères  $\beta$ -endosulfan (endosulfan II).

Ainsi, les deux échantillons prélevés du deuxième site ont montré la présence du chlorpyriphos sortant à environ 15 minutes avec des aires relatives des pics de l'ordre de 2.37 % et 0.97 % pour le premier et le deuxième échantillons respectivement. Les chromatogrammes de ces deux échantillons, les caractéristiques des deux pics du pesticide décelé ainsi que les spectres de masse obtenus sont représentés dans ce qui suit :

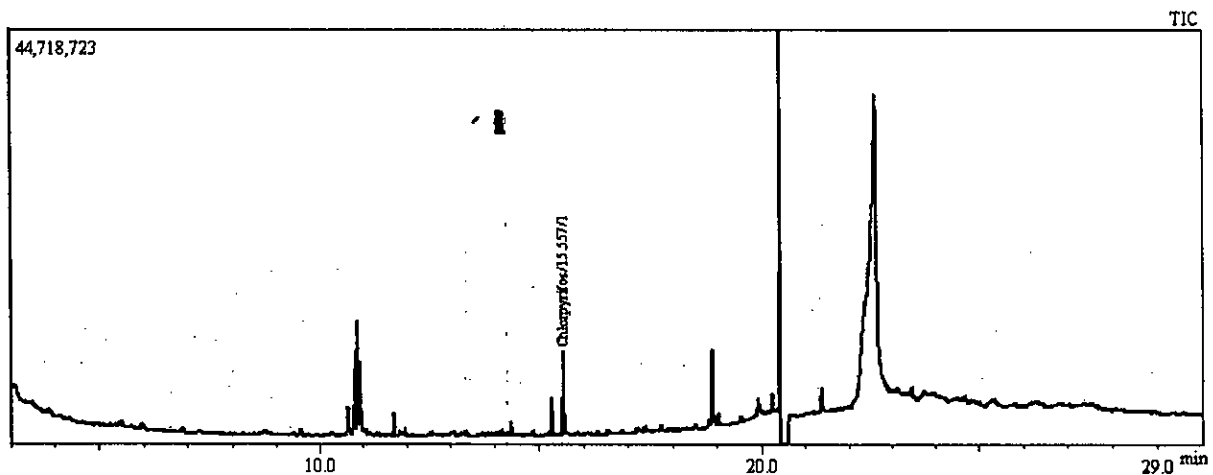


Figure 18 : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 2 (deuxième campagne d'échantillonnage).

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Base m/z	Surface %
50	Chlorpyriphos	15.557	97.00	2.37

Tableau 4 : Caractéristiques du pic N° 50 du chromatogramme du premier échantillon du site N°2 (deuxième campagne d'échantillonnage).

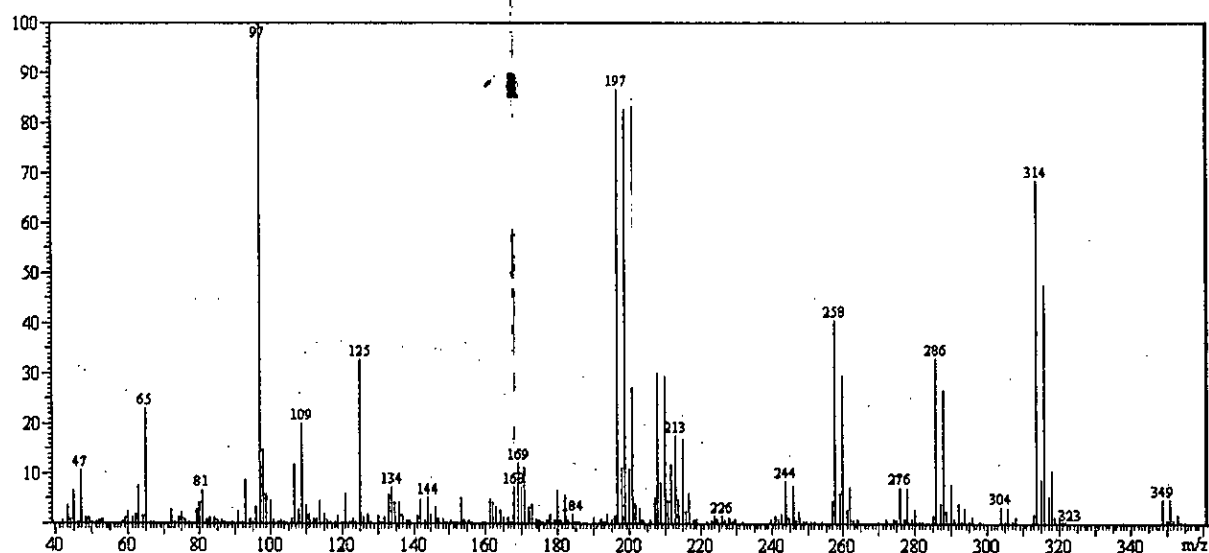


Figure 19 : Spectre de masse du chlorpyrifos détecté dans le premier échantillon du site N° 2 (deuxième campagne d'échantillonnage).

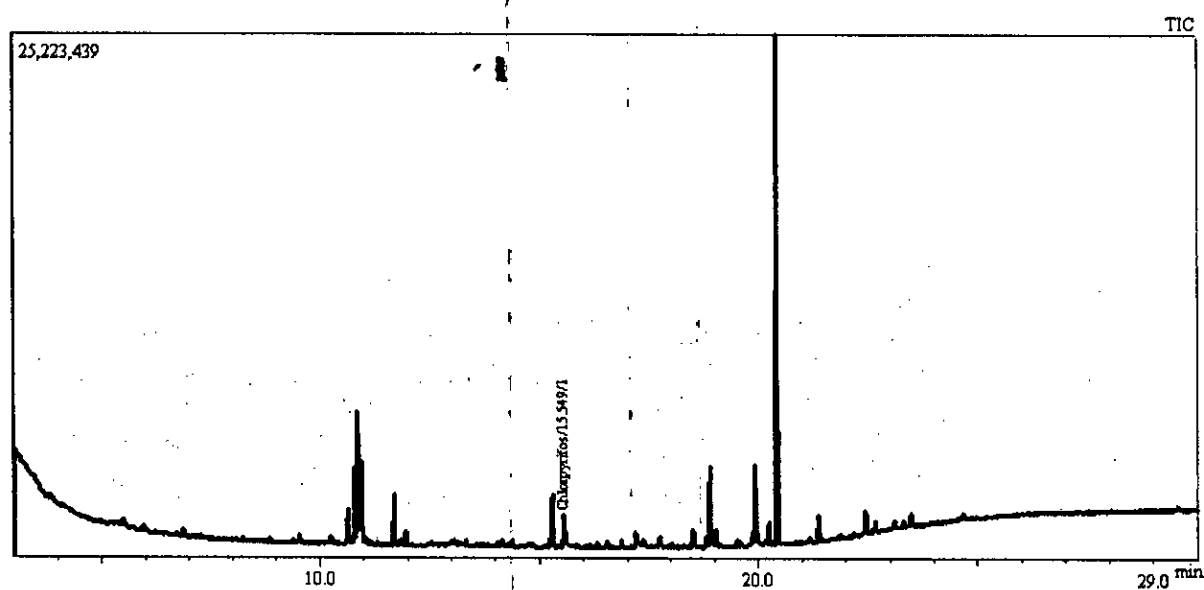


Figure 20 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°2 (deuxième campagne d'échantillonnage).

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Base m/z	Surface %
36	Chlorpyrifos	15.549	96.95	0.97

Tableau 5 : Caractéristiques du pic N° 36 du chromatogramme du deuxième échantillon du site N°2 (deuxième campagne d'échantillonnage).



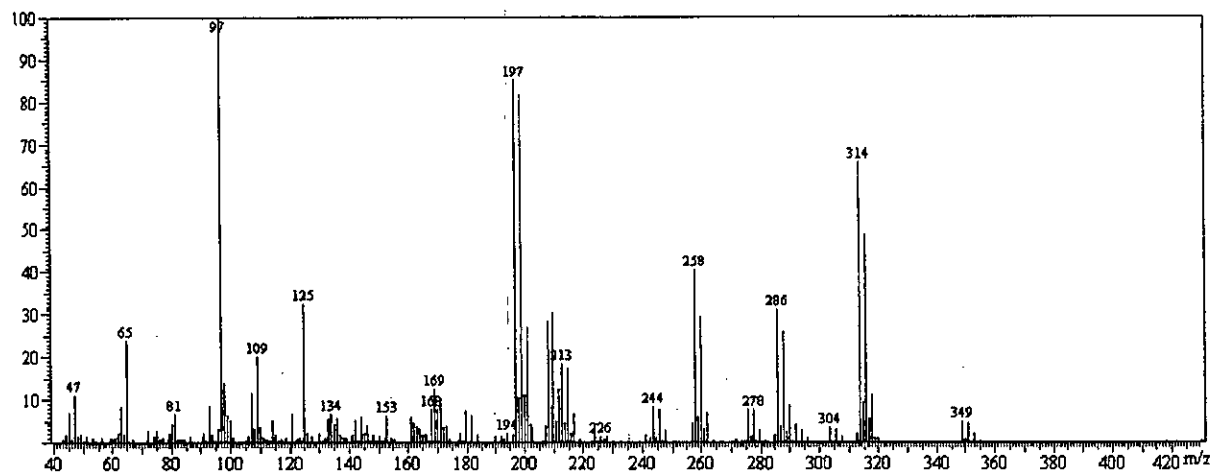


Figure 21 : Spectre de masse du chlorpyrifos détecté dans le deuxième échantillon du site N° 2 (deuxième campagne d'échantillonnage).

L'analyse des chromatogrammes des deux échantillons prélevés du site N°3 a aussi révélé une contamination par les résidus de pesticides. Ainsi, dans le premier échantillon trois molécules différentes ont été mises en évidence, il s'agit du chlorpyrifos sortant à environ 15 minutes, ainsi que l'endosulfan et l'endosulfan II dont les temps de rétention étaient de 62.19 minutes et 26.99 minutes respectivement. Le profil spectral de cet échantillon, les caractéristiques des pics des trois pesticides décelés ainsi que leurs spectres de masse caractéristiques sont représentés dans ce qui suit :

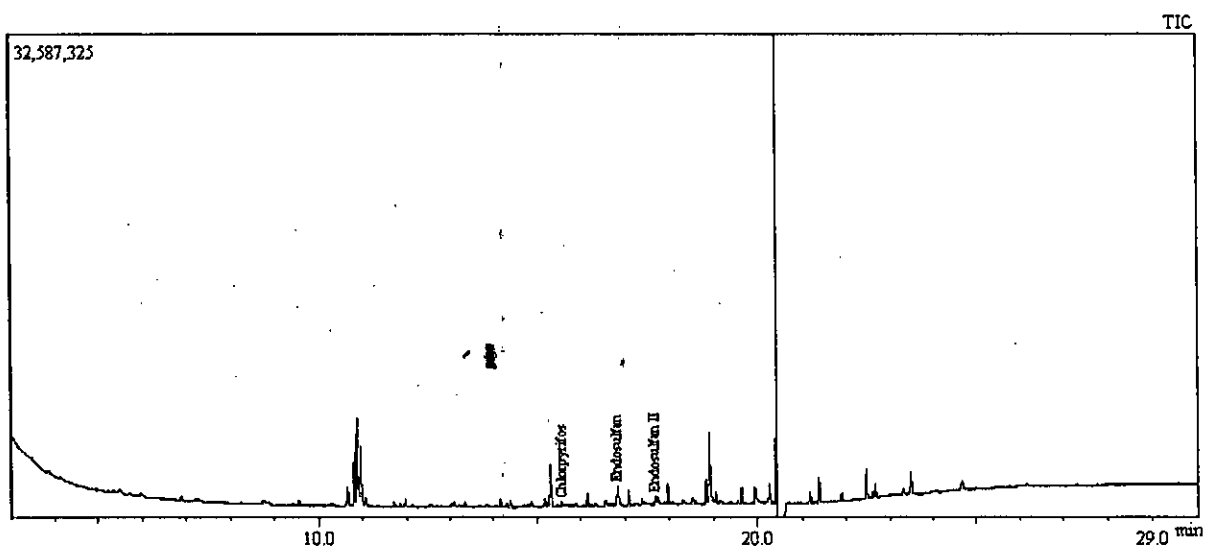


Figure 22 : Profil chromatographique du premier échantillon du site N° 3 (deuxième campagne d'échantillonnage).

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Base m/z	Surface %
31	Chlorpyriphos	15.564	97.00	0.18
38	Endosulfan	16.838	194.90	1.03
45	Endosulfan II	17.698	194.85	0.45

Tableau 6 : Caractéristiques des pics N° 31, 38 et 45 du chromatogramme du premier échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).

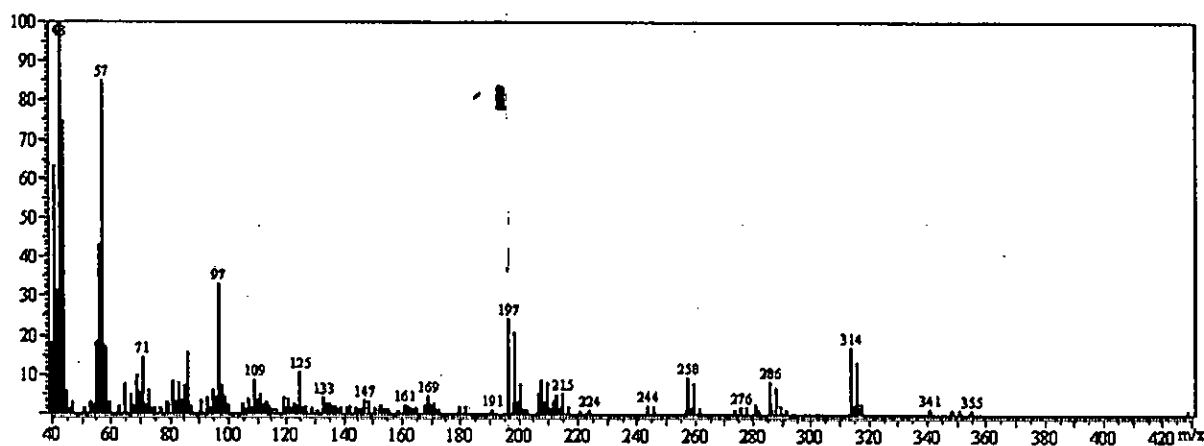


Figure 23 : Spectre de masse du chlorpyriphos détecté dans le premier échantillon du site N° 3 (deuxième campagne d'échantillonnage).

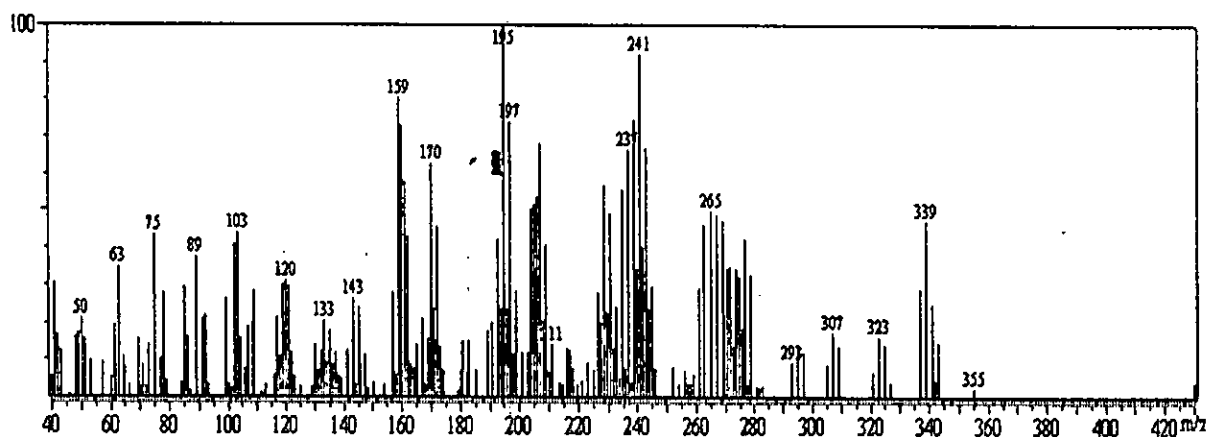
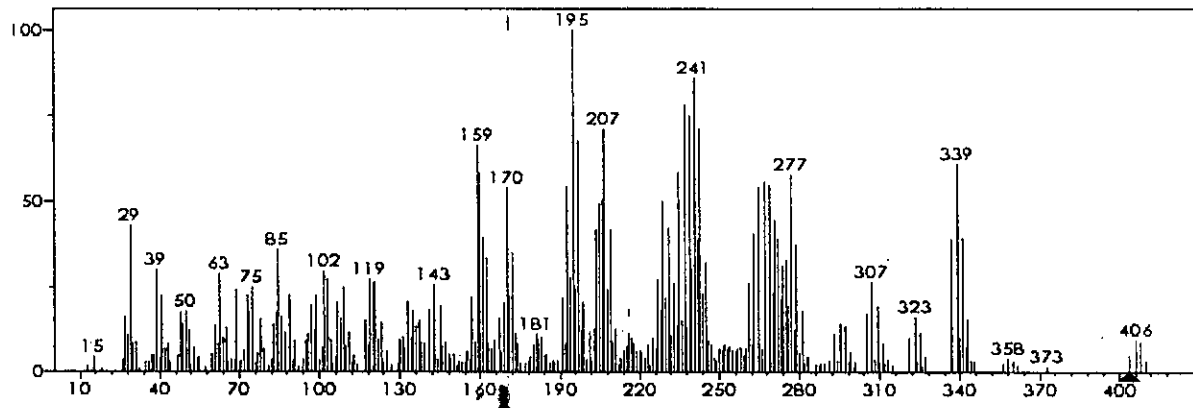
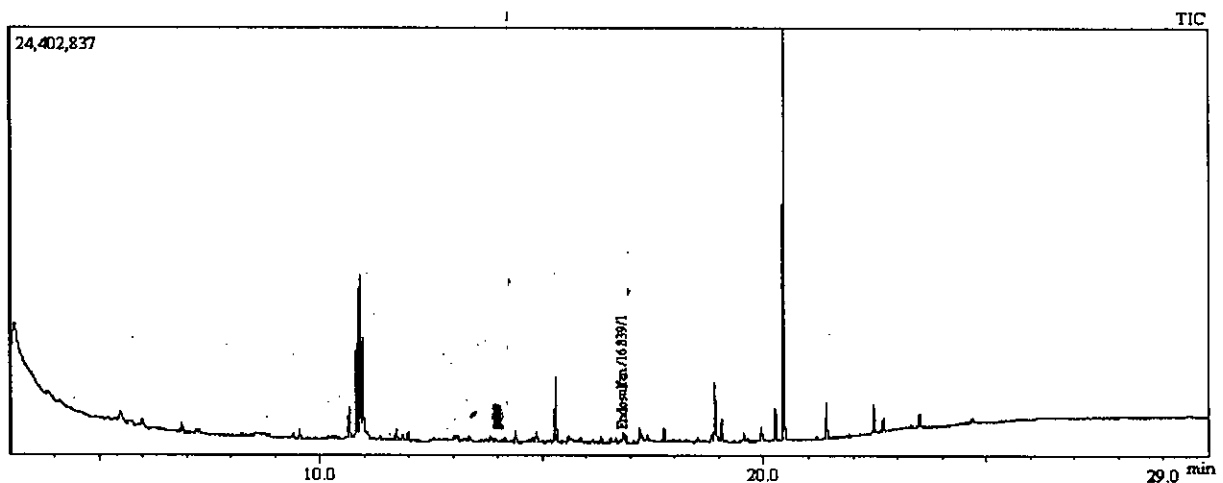


Figure 24 : Spectre de masse de l'endosulfan détecté dans le premier échantillon du site N° 3 (deuxième campagne d'échantillonnage).



**Figure 25 : Spectre de masse de l'endosulfan II détecté dans le premier échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).**

Pour le deuxième échantillon prélevé de ce même site, seul l'organochloré endosulfan a pu être décelé avec un temps de rétention de 16.839 minutes et un pic d'une aire relative de 0.34 %. Le chromatogramme de cet échantillon est présenté par la figure 26 :



**Figure 26 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).**

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Base m/z	Surface %
50	Endosulfan	16.839	194.85	0.34

**Tableau 7 : Caractéristiques du pic N° 50 du chromatogramme du deuxième échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).**

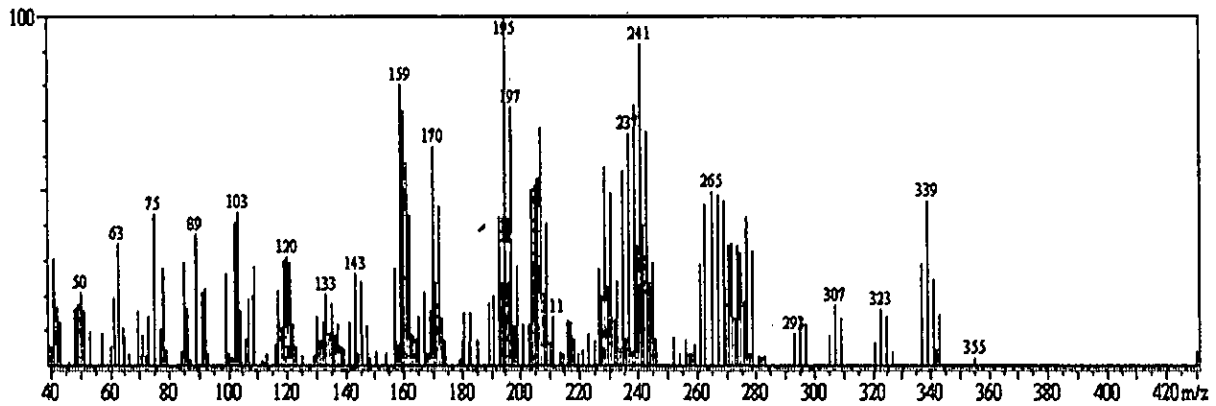


Figure 27 : Spectre de masse de l'endosulfan détecté dans le deuxième échantillon du site N°3 (deuxième campagne d'échantillonnage).

Le dernier échantillon contaminé par des résidus de pesticides est le deuxième échantillon prélevé du site N° 5, la substance détectée est le chlorpyrifos sortant à 15.552 minutes avec un pic d'une aire relative de 0.35 %. Les figures 28 et 29 représentent respectivement le chromatogramme de cet échantillon et le spectre de masse de la molécule de pesticides détectée.

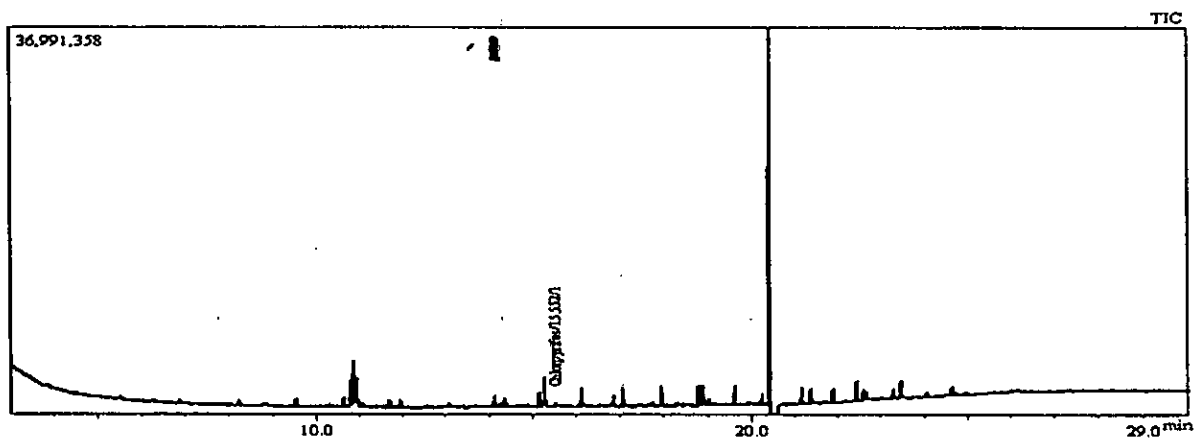


Figure 28 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N° 5 (deuxième campagne d'échantillonnage).

N° du pic	Nom du composé	Temps de rétention (min)	Base m/z	Surface %
47	Chlorpyrifos	15.552	97.00	0.35

Tableau 8 : Caractéristiques du pic N° 47 du chromatogramme du deuxième échantillon du site N° 5 (deuxième campagne d'échantillonnage).

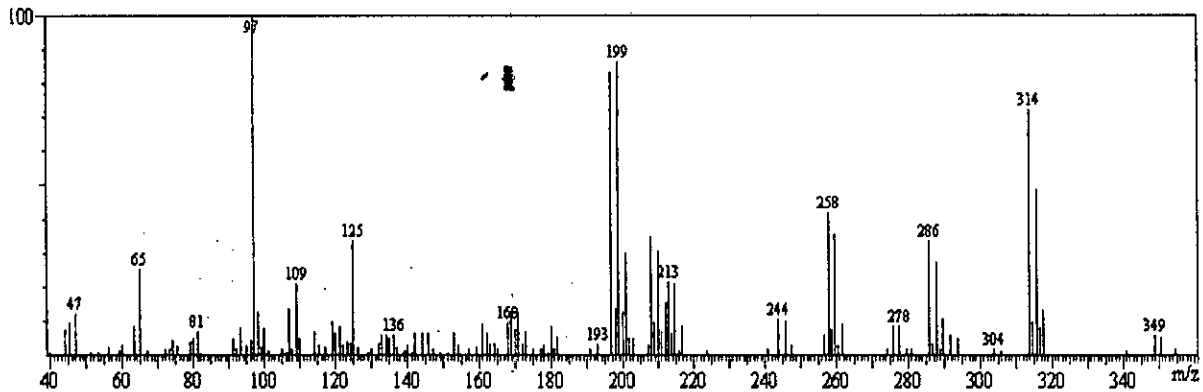


Figure 29 : Spectre de masse du chlorpyrifos détecté dans le deuxième échantillon du site N°5 (deuxième campagne d'échantillonnage).

## V.2. Etude de l'effet des pesticides sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cytosolique

Les pesticides chlorpyrifos et l'endosulfan dont la formulation commerciale renferme les deux isomères détectés dans l'eau analysée (80% d'isomère  $\alpha$  / 20% d'isomère  $\beta$ ) sont alors retenus pour la deuxième partie expérimentale consistant à évaluer l'effet prooxydant pouvant être engendré par l'exposition à ces substances *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats de cette partie expérimentale sont représentés dans ce qui suit :

### V.2.1. Etude de l'effet des deux pesticides sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cytosolique *in vitro*

#### V.2.1.1. Evaluation de la peroxydation lipidique mitochondriale induite *in vitro* par les deux pesticides

La peroxydation des lipides induite *in vitro* par les différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos a été étudiée en estimant le dialdéhyde malonique (MDA) généré suite à cette exposition. Les résultats sont présentés dans le tableau 9 et illustrés par la figure 30.

Au vu de ces résultats, l'incubation des mitochondries hépatiques avec des concentrations croissantes (de  $10^{-10}$  à  $10^{-2}$  M) de deux pesticides chlorpyrifos et endosulfan entraîne une augmentation statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) des taux du MDA. Cette augmentation est, en effet, fortement proportionnelle aux concentrations de deux substances.

Ceci étant clairement démontré par les corrélations linéaires entre les taux d'MDA et les concentrations molaires de deux pesticides testés ( $r = 0.93$  pour le chlorpyriphos et  $r = 0.94$  pour l'endosulfan). En effet, l'incubation des mitochondries même avec des faibles concentrations des deux pesticides a entraîné une augmentation significative du taux d'MDA par rapport aux témoins. Ainsi, à  $10^{-10}$  M, le taux du MDA est de  $5.18 \pm 2.14$  n moles/ mg de protéines avec le chlorpyriphos et  $5.79 \pm 2.21$  n moles/ mg de protéines avec l'endosulfan contre  $3.26 \pm 1.46$  n moles/ mg de protéines du contrôle, soit une augmentation des taux de la peroxydation lipidique de l'ordre de 37.06 % et 43.69 % induite par l'exposition au chlorpyriphos et l'endosulfan respectivement. On note que pour les deux pesticides, l'effet est maximal à la plus forte concentration ( $10^{-2}$  M). A cette concentration, le taux de la peroxydation lipidique a marqué une hausse de 71.20 % et 75.78 % avec le chlorpyriphos et l'endosulfan par rapport aux témoins.

**Tableau 9 : Variation des taux du MDA mitochondrial généré en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyriphos *in vitro*.**

		Concentrations molaires des pesticides (M)				
		$10^{-10}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-2}$ M
Concentrations du MDA mitochondrial (nmoles/ mg de protéines)	Endosulfan	5.79 ± 2.21 *	6.56 ± 2.32 **	7.98 ± 3.06 ***	9.25 ± 2.26 ***	13.46 ± 3.18 ***
	Chlorpyriphos	5.18 ± 2.14 *	5.56 ± 1.96 *	6.13 ± 2.36 **	8.29 ± 3.12 ***	11.32 ± 3.52 ***

**Témoin :  $3.26 \pm 1.46$  nmoles/mg de protéines.** Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type,  $n = 10$  dans chaque groupe. Test de 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 ( $p < 0.001$ ).

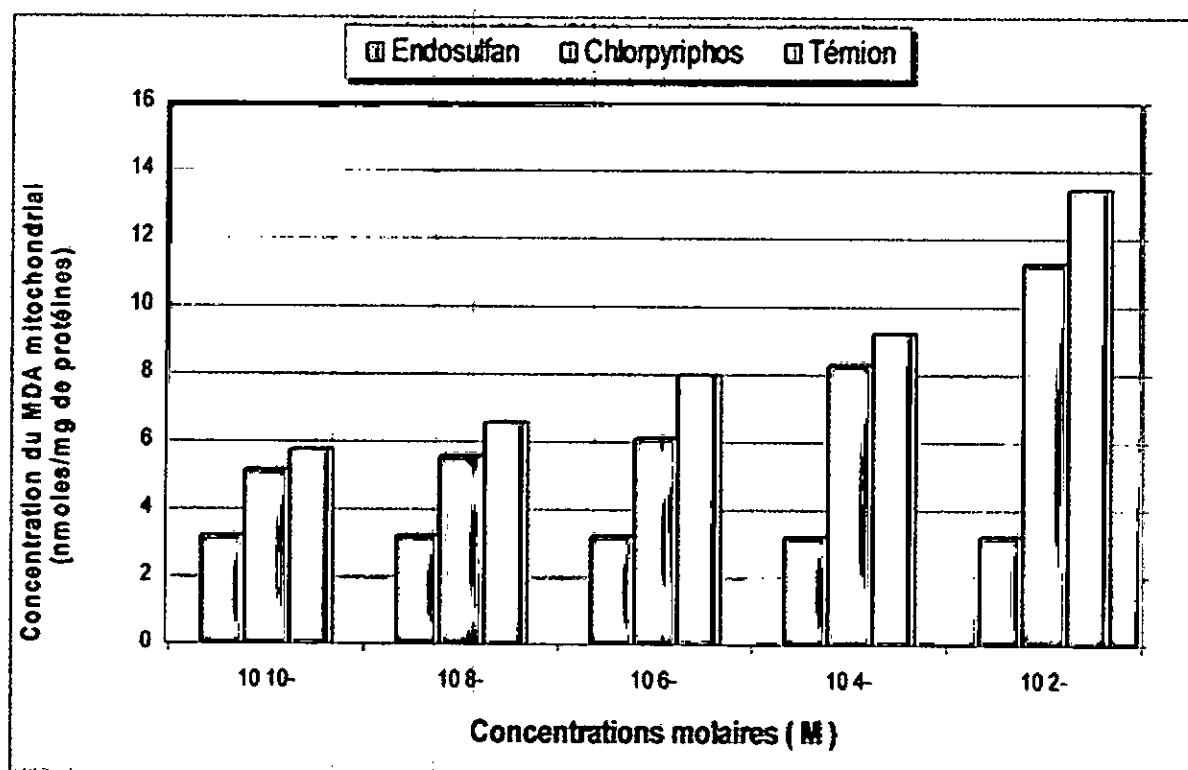


Figure 30 : Variations des taux du MDA mitochondrial généré en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos *in vitro*.

### V.2.1.2. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

#### V.2.1.2.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale

Les variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations molaires du chlorpyrifos et de l'endosulfan *in vitro* sont représentées dans le tableau 10 et dans les figures 31, 32 respectivement.

On constate une induction de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale même par les plus faibles concentrations des deux pesticides, laquelle est maximale avec la concentration de  $10^{-6}$  M pour les deux pesticides (  $741.65 \pm 51.61$  UI/ g de protéines pour l'endosulfan et  $714.31 \pm 43.28$  UI/ g de protéines pour le chlorpyrifos contre  $403.13 \pm 49.76$  UI/g de protéines pour le témoin ). En présence des plus fortes concentrations de deux pesticides (  $10^{-4}$  et  $10^{-2}$  M), l'activité sodique mitochondriale se trouve toutefois largement altérée, une diminution de l'activité de l'ordre de  $-36.63\%$  et  $-30.93\%$  par rapport aux

témoins a été enregistrée en présence de  $10^{-2}$  M de l'endosulfan et du chlorpyriphos respectivement.

Le même profil de variations est constaté avec l'activité de la SOD cytosolique. On constate une augmentation hautement significative ( $p < 0.001$ ) avec la concentration de  $10^{-6}$  M de deux pesticides, suivi d'un déclin avec les concentrations  $10^{-4}$  et  $10^{-2}$  M. Une réduction de l'activité sodique cytosolique de  $-33.85\%$  et  $-32.91\%$  par rapport au contrôle a été enregistrée en présence de  $10^{-2}$  M de chlorpyriphos et de l'endosulfan respectivement.

**Tableau 10 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyriphos *in vitro*.**

		Concentrations molaires des pesticides (M)				
		Pesticides	$10^{-10}$ M	$10^{-8}$ M	$10^{-6}$ M	$10^{-4}$ M
SOD mitochondriale (UI/g de protéines)	Endosulfan	483.06 ± 48.15 **	525.32 ± 49.12 ***	741.65 ± 51.61 ***	469.20 ± 46.31 **	306.11 ± 24.13 ***
	Chlorpyriphos	481.68 ± 46.16 **	693.08 ± 51.32 ***	714.31 ± 43.28 ***	472.63 ± 44.89 **	333.63 ± 32.66 **
SOD cytosolique (UI/g de protéines)	Endosulfan	598.65 ± 43.47 **	663.23 ± 45.36 **	843.01 ± 52.23 ***	470.69 ± 38.35 **	401.62 ± 36.34 ***
	Chlorpyriphos	607.84 ± 53.34 **	611.94 ± 54.55 **	798.69 ± 53.36 ***	469.32 ± 39.58 **	395.96 ± 38.65 ***

Témoin SOD mitochondriale ou Mn-SOD :  $403.13 \pm 49.76$  UI/g de protéines.

Témoin SOD cytosolique ou Cu /Zn-SOD :  $523.95 \pm 40.09$  UI/g de protéines.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 10$  dans chaque groupe. Test de 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 ( $p < 0.001$ ).



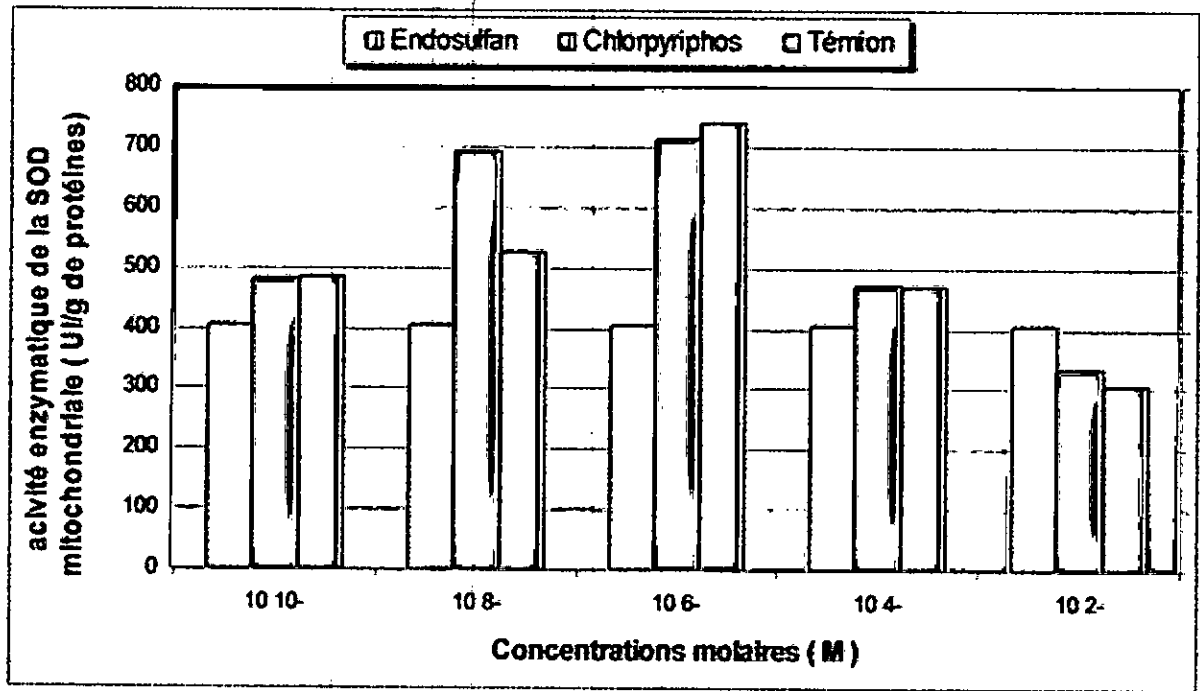


Figure 31 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos *in vitro*.

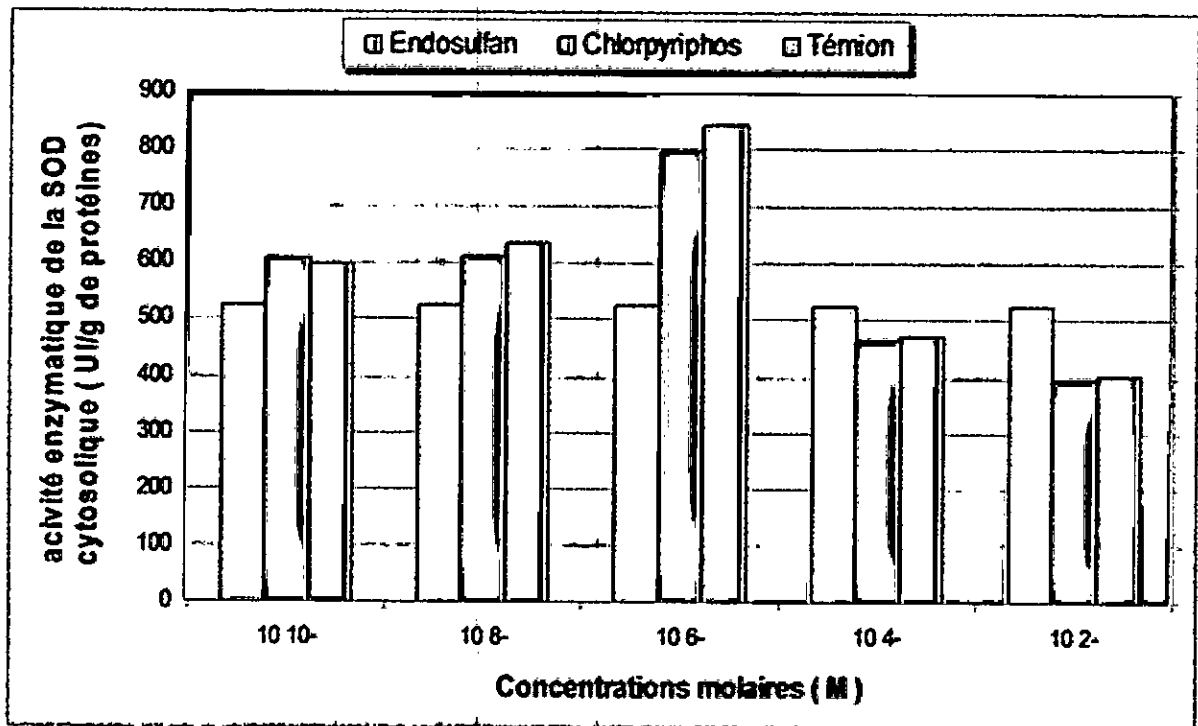


Figure 32 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos *in vitro*.

#### V.2.1.2.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique et mitochondriale

Les variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique en fonction de différentes concentrations molaires de deux pesticides *in vitro* sont représentées dans le tableau 11 et les figures 33 et 34 respectivement.

Les concentrations  $10^{-10}$  et  $10^{-8}$  M du chlorpyrifos et  $10^{-10}$  M de l'endosulfan n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale. Les variations enregistrées par rapport aux témoins sont statistiquement non significatives ( $p > 0.05$ ). Cette activité se trouve toutefois augmentée de façon significative avec les concentrations  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  M de deux pesticides. Ainsi, à  $10^{-4}$  M, l'endosulfan et le chlorpyrifos ont entraîné une augmentation de l'activité catalytique de l'ordre de (+ 42.80 %) et (+38.21 %) respectivement par rapport aux témoins.

En présence d'une plus forte concentration ( $10^{-2}$  M), l'activité catalytique ne montre toutefois plus cette tendance à augmenter, elle se trouve, en effet, significativement diminuée par rapport aux témoins (chlorpyrifos :  $630.87 \pm 48.65$  UI/ g de protéines, endosulfan :  $536.95 \pm 49.35$  UI/g de protéines, témoin :  $697.69 \pm 47.85$  UI/ g de protéines).

On constate une augmentation hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique en présence d'une concentration de  $10^{-4}$  M de l'endosulfan et du chlorpyrifos, atteint  $1225.65 \pm 78.65$  UI/ g de protéines et  $1317.63 \pm 76.54$  UI/ g de protéines pour les deux pesticides respectivement.

Les concentrations les plus faibles de deux pesticides ( $10^{-10}$  M et  $10^{-8}$  M) ne montrent aucun effet sur l'activité catalytique cytosolique ( $p > 0.05$ ), cette dernière se trouve toutefois significativement diminuée par rapport aux témoins avec les concentrations les plus fortes de deux pesticides.

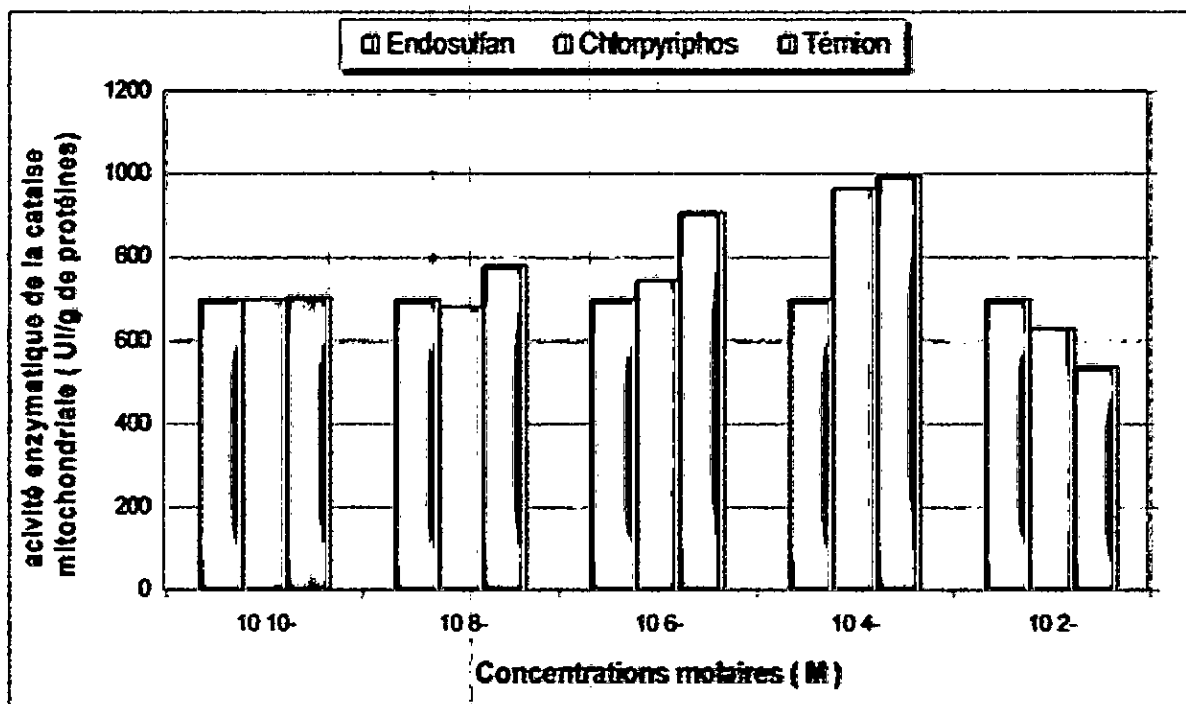


Figure 33 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos *in vitro*.

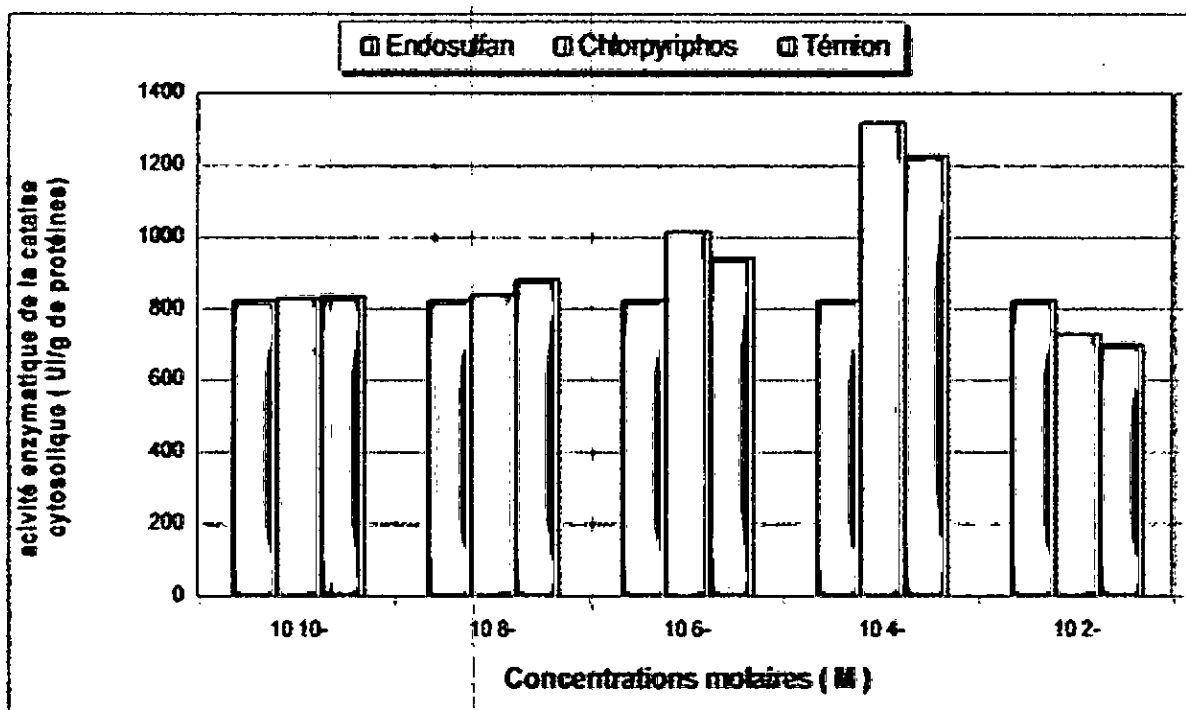


Figure 34 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos *in vitro*.

Tableau 11 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatique en présence de différentes concentrations molaires de l'endosulfan et du chlorpyrifos *in vitro*.

		Concentrations molaires des pesticides (M)				
Pesticides		10 <sup>-10</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-2</sup> M
Catalase cytosolique (UI/g de protéines)	Endosulfan	834.36 ± 55.13 ns	880.71 ± 58.16 ns	939.65 ± 61.39 **	1225.65 ± 78.65 ***	701.72 ± 59.27 ***
	Chlorpyrifos	829.87 ± 56.79 ns	836.79 ± 49.15 ns	1012.32 ± 69.58 ***	1317.63 ± 76.54 ***	732.84 ± 61.19 **
Catalase mitochondriale (UI/g de protéines)	Endosulfan	703.24 ± 49.81 ns	780.31 ± 53.62 *	905.61 ± 63.21 ***	996.36 ± 65.25 ***	536.95 ± 49.35 ***
	Chlorpyrifos	699.63 ± 48.10 ns	683.35 ± 46.96 ns	744.35 ± 47.51 **	964.32 ± 55.32 ***	630.87 ± 48.65 **

Témoin catalase mitochondriale ou Mn-SOD : 697.69 ± 47.85 UI/g de protéines.

Témoin catalase cytosolique ou Cu /Zn-SOD : 825.74 ± 62.23 UI/g de protéines.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 10 dans chaque groupe. Test de 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).

## V.2.2. Etude de l'effet des deux pesticides sur la balance antioxydant-prooxydant mitochondriale et cytosolique *in vivo*

### V.2.2.1. Evaluation des taux du MDA mitochondrial et cytosolique

L'effet de l'endosulfan et du chlorpyrifos administrés à une dose quotidienne de 4 mg/kg/j séparément ou en association pendant 1 mois sur le taux de la peroxydation lipidique mitochondriale et cellulaire a été déterminé par la mesure des taux du MDA mitochondrial et

cytosolique. Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 12,13 et illustrés par les figures 35 et 36 respectivement.

Comparés aux rats témoins, les rats traités par les deux pesticides chlorpyriphos et endosulfan à une dose de 4 mg/ kg/ j pendant un mois montrent une augmentation statistiquement significative ( $p < 0.01$ ) des taux du MDA mitochondrial et cytosolique par rapport aux rats non traités. Ainsi, le groupe traité par le chlorpyriphos a enregistré une valeur moyenne du MDA mitochondrial de  $9.53 \pm 2.41$  n moles / mg de protéines, celui traité par l'endosulfan, la valeur moyenne du MDA mitochondrial est  $12.14 \pm 3.95$  n moles / mg de protéines, contre  $5.74 \pm 1.53$  n moles / mg de protéines chez les rats témoins, soit une augmentation de l'ordre de + 39.76 % pour le chlorpyriphos et + 52.71 % pour l'endosulfan contre les rats non traités.

L'augmentation la plus accentuée est toutefois enregistrée chez les rats ayant reçu l'association de deux pesticides, ces derniers montrent, en effet, un taux d'MDA de  $21.34 \pm 6.24$  n moles / mg de protéines, soit une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) par rapport aux témoins.

**Tableau 12 : Variations des taux du MDA mitochondrial après administration de l'endosulfan, du chlorpyriphos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.**

	Témoin	Chlorpyriphos (4mg/kg/j)	Endosulfan (4mg/kg/j)	Association (4mg/kg/j)
<b>Concentration du MDA mitochondrial (nmoles/mg de protéines)</b>	5.74 ± 1.53	9.53 ± 2.41 **	12.14 ± 3.95 **	21.34 ± 6.24 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 8 dans chaque groupe. Test de 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 ( $p < 0.001$ ).

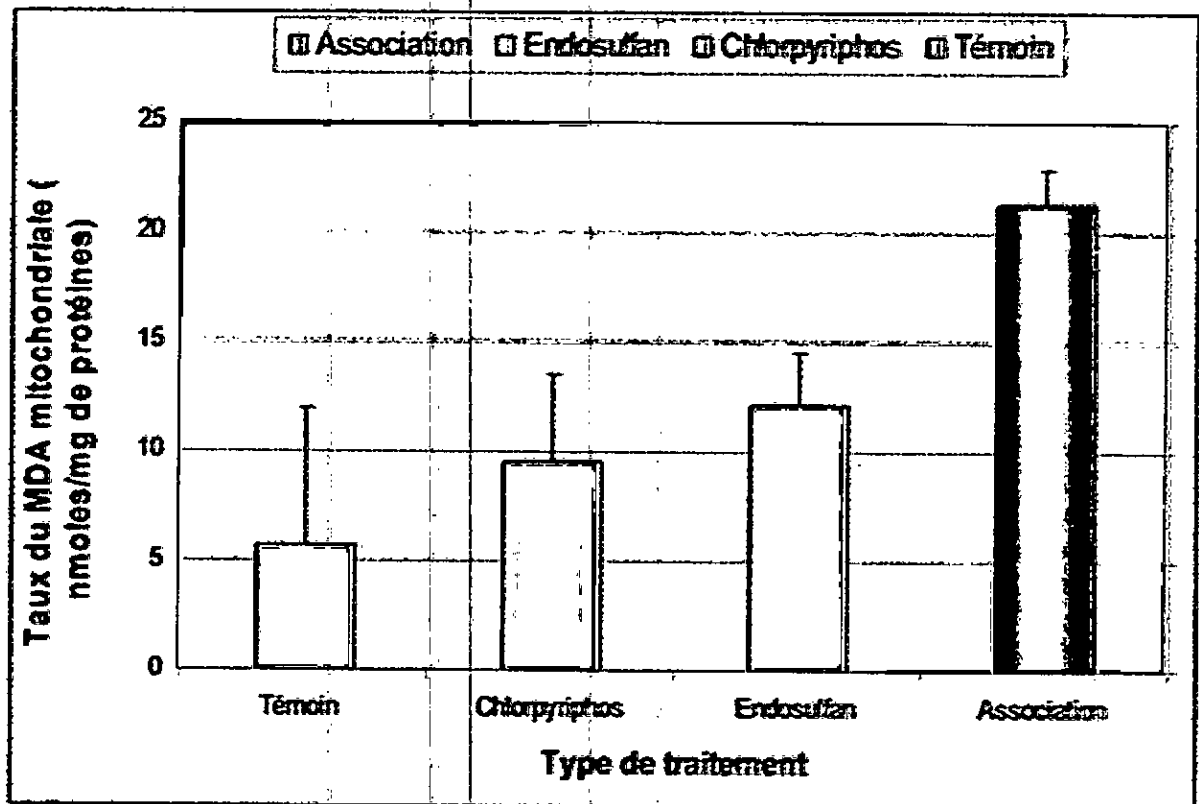


Figure 35 : Variations des taux du MDA mitochondrial après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

Tableau 13 : Variations des taux du MDA cytosolique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

	Témoin	Chlorpyrifos (4mg/kg/j)	Endosulfan (4mg/kg/j)	Association (4mg/kg/j)
Concentration du MDA cytosolique (nmoles/mg de protéines)	7.51 ± 3.24	12.62 ± 4.84 *	16.94 ± 7.07 **	31.25 ± 9.95 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 8 dans chaque groupe. Test de 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 ( $p < 0.001$ ).

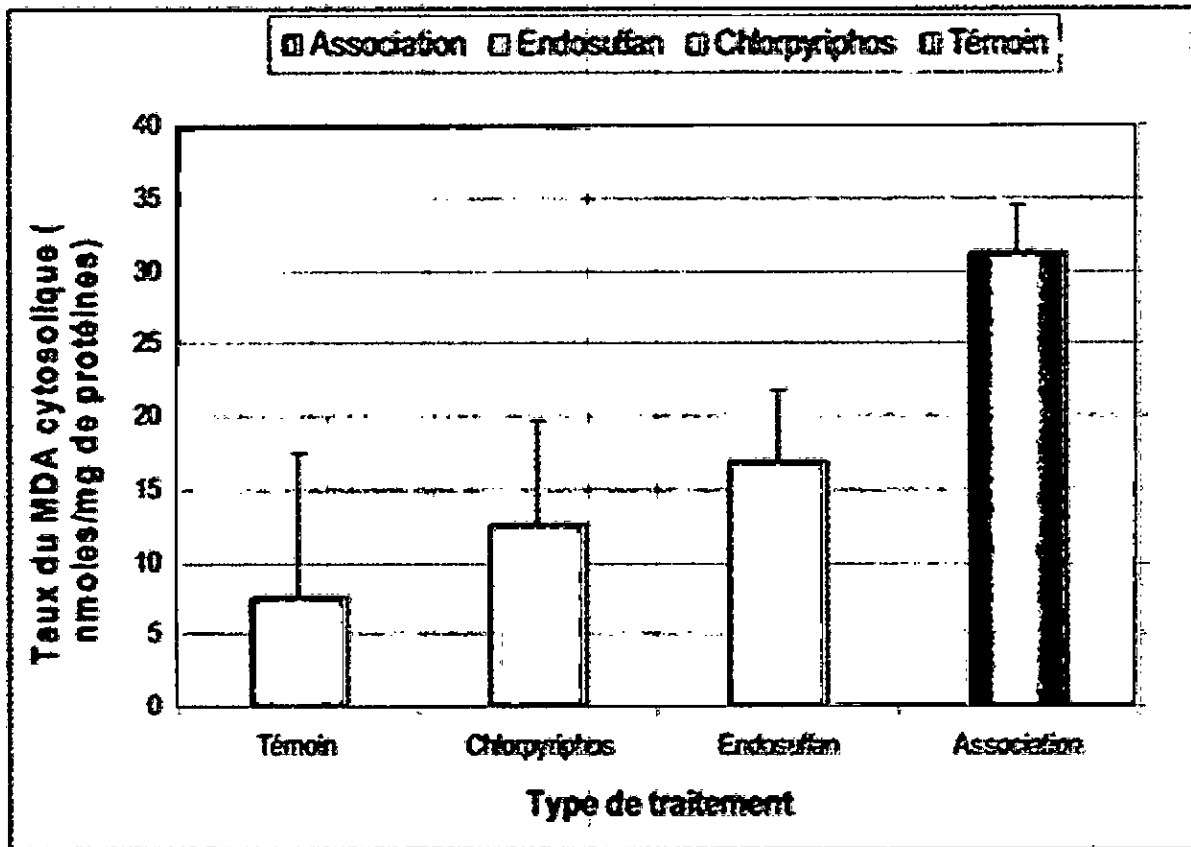


Figure 36: Variations des taux de MDA cytosolique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

#### V.2.2.2. Evaluation des taux de glutathion hépatique

Les taux de GSH cytosolique, après 1 mois de traitement par les deux pesticides chlorpyrifos et endosulfan (4 mg/kg/j) séparément ou en association sont représentés dans le tableau 14 et la figure 37.

Le traitement des rats par les pesticides chlorpyrifos et endosulfan (4mg/kg/j) pendant 1 mois conduit à une diminution très significative ( $p < 0.01$ ) des taux de GSH. Ainsi, ce taux est estimé à  $1.18 \pm 0.2$  mM /g de tissu chez les rats recevant le chlorpyrifos et  $1.27 \pm 0.18$  mM /g de tissu chez ceux traités par l'endosulfan, on constate de ce fait une diminution de l'ordre de - 27.16 % et - 21.60 % entraînée par le chlorpyrifos et l'endosulfan respectivement par rapport aux témoins.

L'association des deux pesticides a montré une diminution plus importante des taux de GSH cytosolique par rapport aux groupes ayant reçu l'un des deux pesticides. On observe une

diminution supplémentaire d'environ - 55.93 % et - 59.05 % des taux de GSH cytosolique par rapport aux groupes traités par le chlorpyrifos et l'endosulfan respectivement.

Tableau 14 : Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4mg/kg/j pendant 1 mois.

	Témoin	Chlorpyrifos (4mg/kg/j)	Endosulfan (4mg/kg/j)	Association (4mg/kg/j)
[GSH] Mm/ g de tissus	1.62 ± 0.21	1.18 ± 0.20 **	1.27 ± 0.18 **	0.52 ± 0.08 ***

Les résultats sont exprimés en moyennes écart-type, n = 8 dans chaque groupe. Test de 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 ( $p < 0.001$ ).

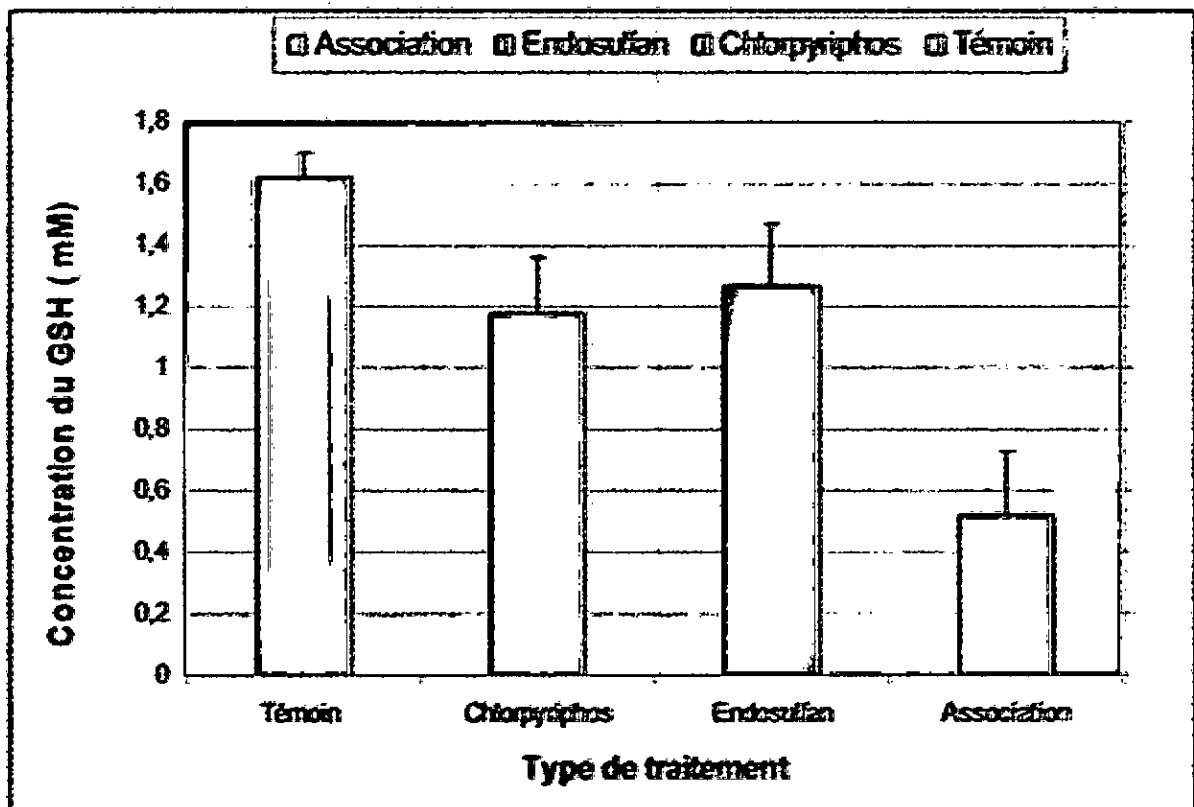


Figure 37 : Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4mg/kg/j pendant 1 mois.



### V.2.2.3. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

#### V.2.2.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale

Le tableau 15 représente les valeurs de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique et mitochondriale, après 1 mois de traitement par le chlorpyriphos, l'endosulfan ainsi que leur association.

Le traitement par l'endosulfan et le chlorpyriphos à 4mg/kg/j conduit à une augmentation significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale qui atteint  $601.92 \pm 41.51$  UI/ g de protéines chez les rats traités par l'organophosphoré et  $798.57 \pm 45.13$  UI/ g de protéines chez ceux recevant l'organochloré, contre  $513.95 \pm 38.92$  UI/ g de protéines chez les témoins, soit une augmentation de l'ordre de + 14.61 % et + 35.64 % respectivement. L'activité enzymatique de la SOD mitochondriale se trouve toutefois largement altérée chez les rats recevant l'association de deux pesticides. Une diminution de significative de l'activité sodique est, en effet, enregistrée par rapport aux témoins.

L'administration concomitante de deux pesticides conduit à une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique qui atteint  $413.23 \pm 30.21$  UI/ g de protéines. Une augmentation statistiquement supérieure à celle des témoins ( $p < 0.001$ ) est, toutefois, induite par l'administration de deux pesticides séparément (endosulfan :  $813.33 \pm 50.32$  UI/ g de protéines, chlorpyriphos :  $792.75 \pm 40.21$  UI/ g de protéines, témoins :  $527.13 \pm 33.76$  UI/ g de protéines).

Tableau 15: Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale et cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

	Témoins	Chlorpyrifos (4mg/kg/j)	Endosulfan (4mg/kg/j)	Association (4mg/kg/j)
SOD cytosolique (UI/g de protéines)	527.13 ± 33.76	792.75 ± 40.21 ***	813.33 ± 50.32 ***	413.23 ± 30.21 ***
SOD mitochondriale ( UI/g de protéines)	513.95 ± 38.92	601.92 ± 41.51 **	798.57 ± 45.13 ***	433.23 ± 31.23 ***

Les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type, n = 8 dans chaque groupe. Test de 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 ( $p < 0.001$ ).

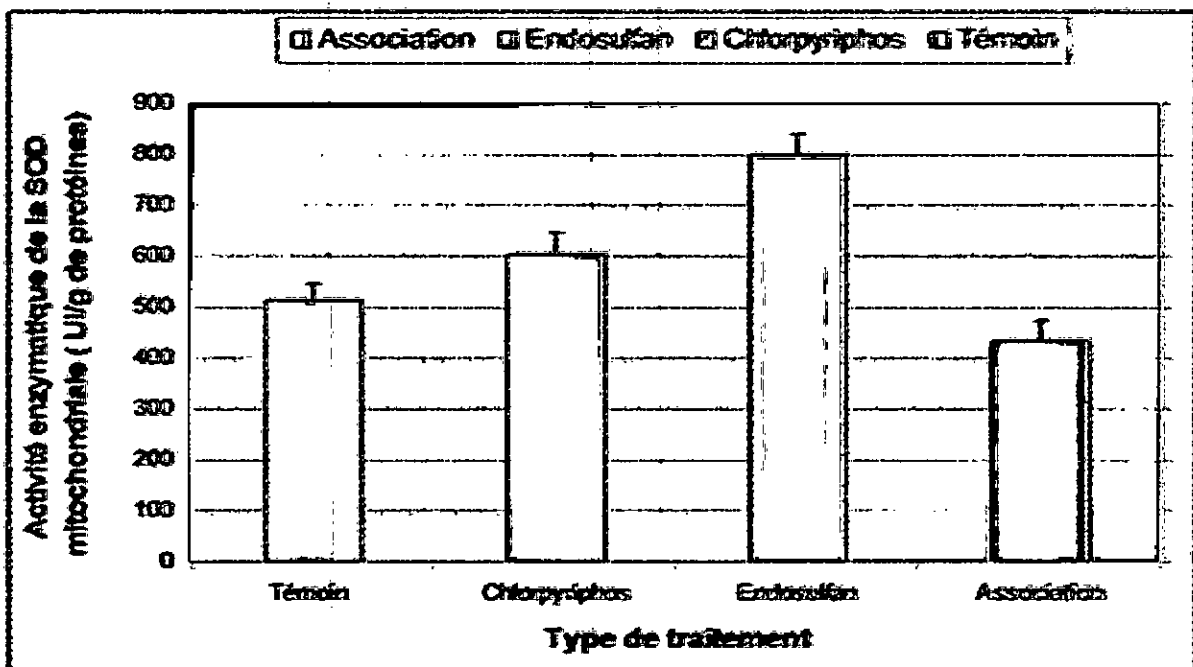


Figure 38 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

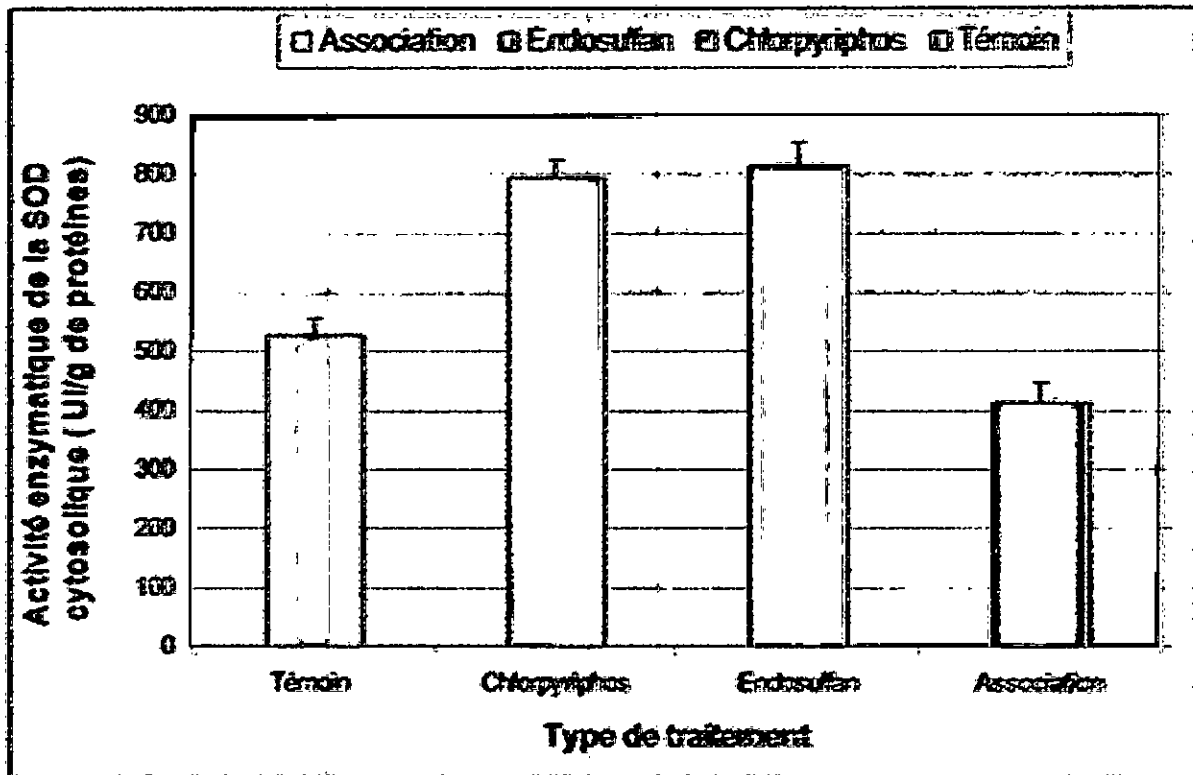


Figure 39 : Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, de chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

#### V.2.2.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique :

Les variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatiques après administration d'une dose de 4 mg/kg/j de l'endosulfan et de chlorpyrifos seuls ou en association pendant 1 mois sont illustrées dans les figures 40 et 41 respectivement. L'activité catalytique mitochondriale se trouve augmentée de façon significative ( $p < 0.01$ ) dans les groupes d'animaux recevant 4 mg/kg/j de chlorpyrifos et de l'endosulfan pendant 1 mois. Cette activité est toutefois altérée suite à l'administration des deux pesticides en association, une diminution significative a, en effet, été enregistrée par rapports aux témoins.

Pour la catalase cytosolique, le chlorpyrifos et l'endosulfan administrés à une dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois engendrent une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité de cette enzyme, par contre leur association est responsable d'une déplétion de cette activité. Une diminution de l'ordre de -36,25 % est constatée par rapport aux témoins.

Tableau 16 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale et cytosolique hépatique après administration de l'Endosulfan, du Chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

	Témoin	Chlorpyrifos (4mg/kg/j)	Endosulfan (4mg/kg/j)	Association (4mg/kg/j)
<b>Catalase cytosolique (UI/g de protéines)</b>	506.95 ± 60.11	625.71 ± 50.12 **	605.61 ± 55.61 **	322.98 ± 49.65 ***
<b>Catalase mitochondriale (UI/g de protéines)</b>	465.63 ± 53.45	575.35 ± 58.62 **	622.32 ± 61.32 ***	385.42 ± 43.36 **

Les résultats sont exprimés en moyennes écart-type, n = 8 dans chaque groupe. Test de 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).

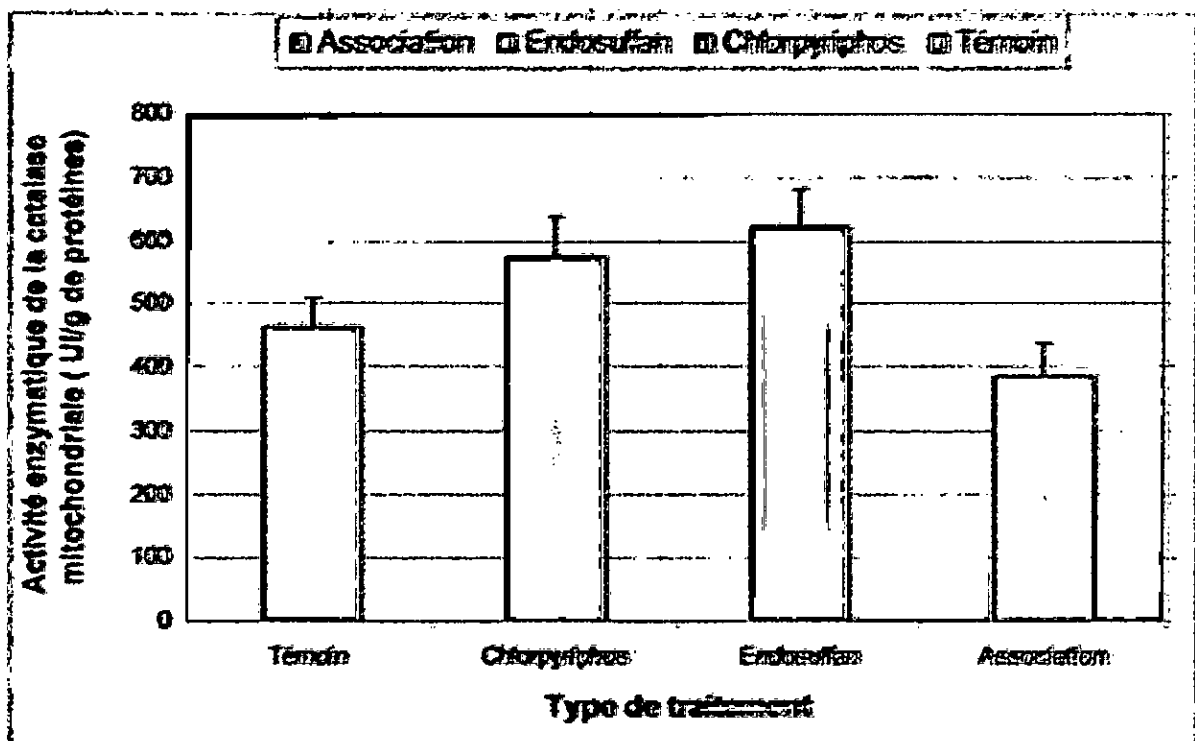


Figure 40 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale hépatique après administration de l'Endosulfan, du Chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

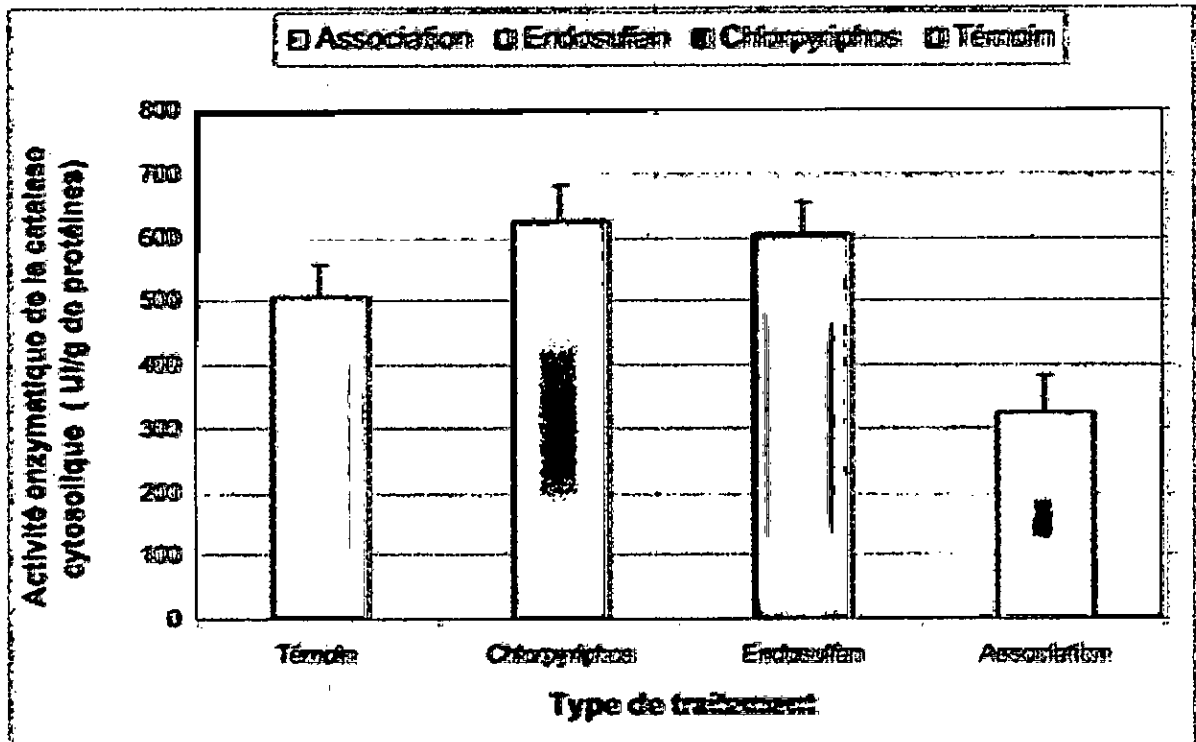


Figure 41 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration de l'endosulfan, du chlorpyrifos et de leur association à la dose de 4 mg/kg/j pendant 1 mois.

# Discussion

## **VI. Discussion**

Le développement de l'agriculture est accompagné par l'utilisation des produits phytosanitaires partout dans le monde. Cette utilisation a montré ses avantages notamment dans l'augmentation des rendements de production par l'élimination ou la réduction des déprédateurs des cultures. Toutefois, derrière ces bienfaits, peuvent se cacher des effets insidieux dont les méfaits sur l'environnement, sur la qualité des produits agricoles, et sur la santé des populations [149].

Les eaux souterraines figurent parmi les milieux susceptibles d'être altérés par les pesticides. Or, ces eaux représentent une importante source exploitée pour la consommation humaine et pour l'utilisation dans le domaine agricole [150].

Les mécanismes impliqués dans la présence de pesticides dans les eaux souterraines sont nombreux, complexes ( de nature physique, chimique et biologique), interagissent les uns avec les autres, et pour la plupart, jouent un rôle de filtre protecteur à l'égard des ces eaux.

Ainsi, depuis l'application ( où la dérive, la volatilisation et la photolyse vont diminuer la dose atteignant ou restant dans le sol), en passant par le transfert au travers des sols ( où les phénomènes de sorption, dégradation, prélèvement par les plantes, entraînement par ruissellement vont minimiser les flux au-delà de la zone racinaire), puis la traversée de la zone non saturée (où persiste un potentiel de sorption et de dégradation ) et enfin le milieu saturé (avec des phénomènes de dilution, sorption et dégradation ), toute une série de mécanismes vont contribuer à la concentration finale observée dans les eaux souterraines. Toutefois, même si les quantités exportées sont faibles et ne représentent que quelques pourcents des quantités appliquées, elles sont suffisantes dans la majorité des cas, pour provoquer des contaminations significatives de l'eau au regard des seuils maximums autorisés pour les eaux potables [27,151].

A Jijel, une grande partie de la population est alimentée par les eaux souterraines de la région de Rhedjla à Taher distribuées par le biais des camions citernes. Le manque d'informations sur l'état de ces eaux, concernant leur contamination potentielle par des résidus pesticides largement employés dans la région, étant donné qu'elle est caractérisée par une forte production agricole est, en effet, préoccupant.

Visant à répondre à cette majeure préoccupation, la première partie de notre étude a été faite dans le but d'évaluer la qualité des eaux de cette région vis-à-vis d'une éventuelle contamination par les pesticides. Deux campagnes d'échantillonnage ont été alors menées, la première du 17 février au 5 mars 2007 et la deuxième pendant la première semaine du mois de janvier 2008.

L'analyse des profils spectraux des échantillons prélevés lors de la première campagne n'a permis de mettre en évidence ni des molécules de pesticides, ni, en effet, de leurs métabolites. Toutefois, certaines substances employées comme des adjuvants dans la formulation commerciale de certains pesticides ont été identifiées. Certaines réserves peuvent, cependant, être émises concernant ces adjuvants, car ils peuvent avoir comme origine d'autres sources autre que les pesticides.

Le facteur primordial pouvant expliquer la non-détection de produits phytosanitaires dans la totalité des échantillons prélevés sont les conditions climatiques particulières ayant précédé l'étape de l'échantillonnage des eaux souterraines. En effet, les conditions climatiques notamment la pluviométrie sont considérées par plusieurs auteurs comme étant les plus impliquées dans le déterminisme du transfert des pesticides vers les eaux souterraines [152].

La pluviométrie doit, en effet, être considérée sous différents aspects, à la fois dans son intensité et sa distribution dans le temps. Les résultats de plusieurs travaux indiquent que le temps qui sépare l'application du pesticide de la première pluie efficace serait le facteur majeur qui contrôle les pertes par lessivage de pesticides. Ainsi, à mesure que le temps augmente entre l'application et la pluie, les auteurs observent une baisse des pertes totales de pesticides [152].

Notre première campagne d'échantillonnage a été réalisée entre le 17 février et le 5 mars, soit à la fin de la période d'infiltration hivernale. En ciblant cette période pour effectuer les prélèvements des eaux souterraines, nous avons supposé que le premier lessivage de la saison avait ainsi pu être pris en compte. Malheureusement, ce n'était pas le cas, étant donné que les pluies les plus efficaces n'ont eu lieu sur la région que plus tardivement, soit vers le mi-avril, il est alors fort possibles que nous soyons passé à coté des phénomènes de lessivage pouvant apporter des molécules de pesticides vers La nappe.



De l'autre côté, les données pluviométriques durant la période hivernale étaient des plus favorables pour réduire le transfert rapide et la contamination des eaux souterraines. La période ayant précédé l'échantillonnage a été peu pluvieuse, elle a été caractérisée par un déficit pluviométrique de l'ordre de 40% par rapport aux normales saisonnières [127].

En absence de pluie efficace, les pesticides appliqués auraient une plus faible tendance à transférer vers la nappe préférentiellement ainsi les échanges avec la matrice de sol [29]. Il se peut donc que les processus d'adsorption et de dégradation soient intervenus pour diminuer les quantités de produits disponibles au transfert vers la nappe souterraine.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la non-détection des pesticides dans les échantillons des eaux prélevées se trouve dans la méthodologie. D'abord, l'analyse des différents spectres a révélé une forte contamination par les composés phtalates. Cette contamination constitue, en effet, une contrainte analytique majeure dans l'analyse des résidus de pesticides dans les matrices environnementales. Ceci est due au fait que les pics de ces composés sont souvent d'une forte intensité pouvant ainsi recouvrir ceux des éléments présents à l'état de traces dans l'échantillon incluant ceux des pesticides recherchés, raison pour laquelle il est fortement recommandé dans ce type d'analyses d'éviter tout contact entre l'échantillon de l'eau et les matières en plastique renfermant des teneurs élevées en ces composés.

L'apparition d'une forte contamination par les composés phtalates dans nos échantillons peut, en effet, mettre en cause la technique d'échantillonnage. Cette dernière n'a pu, en effet, être faite suivant les préconisations des normes, étant donné que les dispositifs utilisés pour prélever l'eau dans certains ouvrages étaient en plastique. Le relargage éventuel des composés phtalates à partir de ce type de matériel aurait, éventuellement, favorisé une contamination plus accrue des échantillons prélevés.

L'analyse des résultats de la deuxième campagne d'échantillonnage ayant lieu le début du mois janvier, a révélé une contamination de trois sites par les résidus pesticides. Les molécules responsables de cette contamination sont l'organophosphoré chlorpyrifos détecté dans trois sites ainsi que les organochlorés  $\alpha$ -endosulfan et  $\beta$ -endosulfan détectés dans un seul site.

L'analyse du panel de produits phytosanitaires appliqués sur les cultures de la région de Rhedjla laisse apercevoir un fort recours à ces deux substances. Ainsi, l'endosulfan qui est un composé organochloré synthétique est abondamment utilisé comme insecticide agricole sur

les différentes cultures de la région. Ce dernier est homologué pour lutter contre cinq insectes ravageurs (pucerons, chrysomèles du concombre, altise de la pomme de terre, perceur de la courge, punaise terne) sur les concombres, les melons, les citrouilles et les courges.

Le chlorpyrifos, pour sa part, figure parmi les pesticides fortement sollicités pour lutter contre plusieurs insectes ravageurs des cultures dans la région étudiée, de nombreuses formulations commerciales en referment : Yamasban, Chlorpyrifos, Dursban, Pychlorex, Lorsban...etc.

Etant donné la forte application locale de ces deux molécules, nous attribuons ainsi cette contamination, avant tout, au fort potentiel d'utilisation de deux molécules en question sur les cultures de la région.

Contrairement à la précédente, la deuxième campagne d'échantillonnage a été effectuée suivant une période automnale bien arrosée (précipitations supérieures à la normale, + 23%) [127]. Nous proposons ainsi l'hypothèse que la contamination observée est, d'une part, liée aux fortes pluies qui ont précédé les échantillonnages. Cette hypothèse semblait corroborée par la présence des deux molécules persistantes  $\alpha$ -endosulfan et  $\beta$ -endosulfan, dont on pouvait suspecter une source terrigène liée à des effets de lessivage de milieux terrestres contaminés.

Un autre facteur revêtant une grande importance dans le transfert des pesticides vers la nappe d'eau souterraine au même titre que conditions climatiques, implique les propriétés physico-chimiques des molécules utilisés qui font que leur transfert vers les eaux soit favorisé ou au contraire retardé.

L'endosulfan, se caractérise, en effet, par une forte rémanence et un grand pouvoir de transfert longue distance, les demi-vies dans des sols acides à neutre vont de 1 à 2 mois pour l'endosulfan  $\alpha$  et de 3 à 9 mois pour l'endosulfan  $\beta$  dans des conditions aérobies. En conditions anaérobies, une étude de la dissipation au champ de ce pesticide, a montré que l'isomère  $\alpha$  se dissipait plutôt rapidement (50 % de pertes en 40 à 60 j), tandis que l'isomère  $\beta$  était plus persistant (50 % de pertes en 800 j). Dans ces conditions, l'isomère  $\alpha$  a été considéré modérément persistant, et l'isomère  $\beta$ , persistant. Etant donné cette persistance caractéristique, ces deux molécules peuvent donc être entraînées à répétition par les mouvements de l'eau après leur application [153].

Concernant les renseignements sur les coefficients d'adsorption sur le carbone organique ( $K_{oc}$ ), des études de laboratoire et des études sur le terrain montrent que les deux isomères  $\alpha$  et

$\beta$  de l'endosulfan sont fortement adsorbés et considérés généralement immobiles dans le sol. Il y a cependant certaines différences entre les deux isomères. Les recherches ont montré que l'isomère  $\beta$  demeurerait fortement adsorbé aux sédiments, tandis que l'isomère  $\alpha$  se désorbait, présentant ainsi une plus grande susceptibilité de se retrouver dans les eaux souterraines. Une récente étude effectuée par Environnement Canada [154], a, toutefois, révélé la présence de ces deux isomères dans l'eau souterraine, ainsi, les concentrations maximales en  $\alpha$  et  $\beta$  endosulfan détectées étaient de 37 ng m.a. /L et 32 ng m.a. /L, respectivement.

Quant au chlorpyrifos, les données disponibles, montrent que ce dernier semble se dégrader lentement dans les sols (conditions anaérobiques et/ou aérobiques). Son temps de demi-vie dans le sol est estimé à 35 jours [155,156].

Le chlorpyrifos se caractérise en outre par une faible solubilité dans l'eau (2 mg/l) limitant les risques de lessivage et de migration dans les couches profondes du sol [157]. Une forte application de ce pesticide peut toutefois engendrer sa présence dans les eaux souterraines.

Une analyse selon la technique multi-résidus des eaux souterraines a été effectuée par Traore et al [158] en régions agricoles en Côte d'Ivoire sur des puits situés en zone agricole (sites de maraîchage, plantations de café, de cacao, de banane et d'ananas). Les résultats de cette étude ont montré la présence de nombreuses matières actives, dont l'endosulfan et le chlorpyrifos. Ces deux substances ont été considérées selon les auteurs comme étant les plus incriminées dans la détérioration de la qualité des eaux analysées. Ainsi l'endosulfan a été détecté dans 85 % de l'ensemble des puits contaminés se présentant sous ses deux formes isomères : l' $\alpha$ -endosulfan et le  $\beta$ -endosulfan et le chlorpyrifos dans 53 % des puits contaminés. Cette étude a révélé aussi que les zones de cultures maraîchères et de cultures intensives, présentent la plus grande altération de la qualité de l'eau des puits situant à leur proximité.

Enfin, il faut noter que notre étude qui a pu révéler la présence de trois molécules de pesticides dans certains puits échantillonnés, ne garantit, en effet, pas que les eaux analysées soient indemnes des autres matières actives employées dans la région, cela est attribué au fait que les techniques d'extraction et d'analyse mises en œuvre, axées plus particulièrement sur une recherche multirésiduelle, peuvent contribuer à rendre l'analyse moins performante en terme de sensibilité, car il est difficile dans ce type d'analyses de pouvoir prendre en considération les conditions optimales d'extraction et de détection de tous les pesticides pouvant être présents dans les échantillons analysés. De plus, l'analyse qualitative par CG/MS pouvant ne pas permettre de détecter l'ensemble des composés organiques susceptibles d'être

présents dans les échantillons, soit par impossibilité technique de mise en évidence, soit en raison de l'absence de référence dans la bibliothèque de l'appareil, car, en se référant uniquement à la bibliothèque NIST pour identifier les composés présents dans les échantillons, cela restreint les possibilités d'identification aux seuls composés dont les spectres de référence sont contenus dans la bibliothèque.

Au vu de nos résultats, la contamination des eaux de la région de Rhedjla par les résidus pesticides est un fait établi dont il faut se préoccuper notamment lorsqu'on connaît que l'exposition à ces substances même à l'état de traces pourrait avoir de nombreuses incidences sur la santé des populations. En effet, les études notamment épidémiologiques en terme de santé concernant l'exposition à ces substances ont très bien démontré jusqu'à présent leurs effets néfastes sur la santé humaine. La toxicité qui leur est liée est, selon plusieurs études, suffisamment importante pour qu'il soit impératif de chercher le mécanisme précis par le quel elle s'exerce [159].

Pour ce faire, un regain d'intérêt est actuellement accordé à l'étude du stress oxydant comme étant le mécanisme le plus probable de cette toxicité. Un grand volet d'investigations dans le domaine de la toxicité des pesticides se penche, par conséquent, sur la capacité de ces molécules à faire apparaître les radicaux libres, leurs effets sur les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques du corps, ainsi que leur répercussion sur l'intégrité cellulaire [105].

Dans ce contexte, la deuxième partie de notre travail a été entreprise dans le but de vérifier si l'exposition aux pesticides détectés dans les eaux analysées puisse être à l'origine d'un stress oxydant. On a ainsi évalué l'activité des systèmes de défense antioxydante enzymatique : l'activité de la super oxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT), et non enzymatique : activité du glutathion (GSH), ainsi que le niveau de peroxydation lipidique cellulaire et mitochondriale suite à une exposition *in vitro* et *in vivo* aux chlorpyriphos et l'endosulfan commercial qui est un mélange de deux isomères d'endosulfan (80% d'isomère  $\alpha$  -/20% d'isomère  $\beta$ -).

Nos résultats indiquent que l'exposition *in vitro* des homogénats et des mitochondries de foie, même à des faibles concentrations de l'endosulfan ou du chlorpyriphos engendre l'induction de l'activité de la SOD mitochondriale et cytosolique. Une augmentation de l'activité sodique de l'ordre de (+ 43.56 %) et (+ 45.64 %) par rapport aux mitochondries non exposées a, en

effet, été enregistrée consécutive à l'exposition mitochondriale à une dose de  $10^{-6}$  M du chlorpyrifos et d'endosulfan respectivement.

Les SOD constituent, en effet, un des systèmes majeurs de défense pour les cellules combattant les effets toxiques de l'oxygène. Elles figurent comme la première ligne de défense catalysant la dismutation de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Leur activité doit toutefois être couplée à une activité suffisante de la catalase ou de la GPx, sinon il s'en suivra une production nette d' $H_2O_2$  qui, en présence de métaux de transition, pourra donner naissance au puissant oxydant qui est le radical hydroxyle responsable de nombreux dommages oxydatifs et pour lequel il n'y a aucun mécanisme de détoxification enzymatique [90,160,161,162,163].

L'induction de l'activité sodique par l'exposition aux deux pesticides : chlorpyrifos et endosulfan pourrait s'expliquer par le fait que ces derniers ont engendré l'apparition de l'anion superoxyde nécessitant l'intervention de la SOD pour le faire disparaître. Cette intervention qui s'avère plus importante avec l'endosulfan, laisse supposer que ce dernier induit une production plus importante de l'anion superoxyde que le chlorpyrifos.

Sohn et al [164], ont montré que le traitement de *S.cerevisiae* par l'endosulfan engendre des dégâts oxydatifs attribuables à la génération des ROS induite par ce pesticide. Ainsi, en exposant les cellules à 250  $\mu$ M d'endosulfan pendant 5 heures, la génération des ROS est augmentée de 41% par rapport aux cultures témoins démontrant un stress oxydatif sévère.

De même, en testant des concentrations croissantes (0-100 $\mu$ l) de l'endosulfan sur la lignée humaine lymphoblastique T Jurkat, Kannan et al [165], ont pu mettre en évidence une production importante et dose dépendante du radical superoxyde.

La même tendance à augmenter caractérise l'activité de la deuxième enzyme étudiée, la CAT, qui marque elle aussi une augmentation avec des maximums enregistrés avec la dose de  $10^{-4}$  M pour les deux pesticides. Toutefois, contrairement à la SOD, inductible même par les plus faibles concentrations de deux pesticides, l'induction de la CAT ne se produit qu'à partir de la concentration  $10^{-6}$  M de deux pesticides.

La CAT marque, en effet, un grand intérêt, puisqu'elle contribue à faire disparaître toute activité toxique liée à l' $H_2O_2$  préalablement produit en dismutant l' $O_2^{\cdot -}$  par la SOD [166].

L'absence de l'activité de la CAT suite à une exposition à des faibles concentrations de pesticides pourrait trouver une explication dans le fait que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit en dismutant l' $\text{O}_2^-$  par la SOD était en quantité insuffisante pour induire l'activité de cette enzyme.

Il est, en effet, bien établi, que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit en faible quantité va être pris en charge par une enzyme autre que la catalase, laquelle est la GPx.

La CAT et la GPx ont des rôles protecteurs similaires, mais leur contribution relative est assez variable. La GPx est, en effet, responsable de la détoxification de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , quand il est présent en faible quantité, à l'opposé de la CAT qui ne semble jouer un rôle qu'en présence de fortes concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  [52,57].

L'activité de ces deux enzymes antioxydantes ( SOD et CAT ) qui est augmentée suite à une exposition à des concentrations faibles, voire modérées de deux pesticides, se trouve toutefois largement réduite en s'exposant à des concentrations élevées. Ainsi, en présence de  $10^{-2}$  M de chlorpyrifos (CPF) ou de l'endosulfan, l'activité de la SOD mitochondriale se trouve largement altérée comparant à celle des témoins ( $p < 0.01$ ). Ce même constat marque l'activité catalytique mitochondriale et cytosolique avec la plus forte concentration de deux pesticides étudiés.

Le déclin de l'activité de la SOD peut être attribué au fait que lorsque la concentration des deux substances devient importante, la quantité de l' $\text{O}_2^-$  produit le sera également, ce qui rend l'enzyme incapable d'assurer son disparition. En d'autres termes, en s'exposant à des concentrations élevées de deux pesticides, la quantité de l' $\text{O}_2^-$  généré dépasse la capacité de dismutation de la SOD. Il en résulte une accumulation de l' $\text{O}_2^-$  dans le milieu, laquelle n'est pas sans danger car elle met en péril l'activité de la CAT et de la GPx ce qui engendre à son tour une accumulation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui ne se transforme plus en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ .

Kano et al [167], ont, en effet, montré que l'anion superoxyde inhibe l'action de la CAT, tandis que le peroxyde d'hydrogène bloque celle de la SOD.

D'une façon générale, suite à une exposition à des xénobiotiques, l'activité des enzymes antioxydantes est d'abord augmentée pour faire face à la production des radicaux libres, toutefois, la génération continue ou en grande quantité de ces radicaux se traduit par la déplétion de l'activité de ces enzymes [168]. Cette diminution de l'activité enzymatique antioxydante constatée avec les fortes concentrations de deux pesticides testés dans notre étude est, en accord avec les résultats de nombreux travaux menés sur des modèles *in vitro* qui

ont révélé qu'une exposition aux pesticides appartenant à différentes classes chimiques pourrait altérer profondément les systèmes de défense antioxydante [169,170,171].

Ainsi, une diminution de presque 50 % de l'activité des enzymes antioxydantes et plus particulièrement la SOD et la CAT a pu être constatée par Mahaboob Khan et al [160] suite à l'exposition des cellules hépatiques à des pesticides.

Aussi, Gultekin et al [172], ont montré que l'exposition *in vitro* des cellules au organophosphoré chlorpyrifos affecte l'activité des enzymes antioxydantes dont la SOD et la CAT. De même, l'endosulfan a été identifié en tant qu'un agent chimique induisant l'altération de l'activité des enzymes impliquées dans le stress oxydant [173,174,175].

En conclusion, face à un stress oxydant modéré, l'organisme réagit en surexprimant la SOD et la CAT, si le stress oxydant perdure et produit de façon massive des ERO, la SOD et la CAT seront détruites.

Une fois que le système antioxydant est submergé par une production excessive des ERO, les dommages cellulaires peuvent s'ensuivre. La toxicité cellulaire des ROS se manifeste par la survenue progressive de processus lésionnels sur les différents éléments constitutifs de la cellule : lipides, protéines, acides nucléiques [176]. Les lipides et notamment les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires sont, toutefois, la cible privilégiée de l'attaque des ROS. Cette attaque est appelée peroxydation lipidique. Il s'agit d'une réaction en chaîne aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information et entraîne la cellule vers la voie nécrotique. Pour estimer le degré de cette peroxydation, le MDA se révèle être un excellent marqueur, l'exposition à des xénobiotiques engendrent généralement une élévation des taux de ce dernier [69, 82, 177, 178,179].

Nos résultats montrent, en effet, une augmentation des taux du MDA proportionnelle aux concentrations de deux pesticides notamment suite à la déplétion du système de défense antioxydante témoignant ainsi la survenue des dommages au niveau des membranes cellulaires. Une augmentation hautement significative ( $p < 0.001$ ) des taux du MDA a été enregistrée en présence des concentrations de  $10^{-4}$  M et  $10^{-2}$  M des deux pesticides.

La peroxydation lipidique a été, en effet, largement évoquée pour être un mécanisme central dans la toxicité due à l'exposition aux pesticides [180,181]. Outre leur capacité à générer les espèces réactives de l'oxygène, les pesticides et plus particulièrement les organochlorés se

caractérisent par un degré d'hydrophobicité accru, privilégiant ainsi leur interaction avec les constituants membranaires menant à leur désordonnement [182].

De nombreux pesticides ont été identifiés en tant qu'agents pouvant porter atteinte à l'intégrité membranaire des cellules de foie menant aux dommages hépatiques. Yamano et Morita [183], ont montré qu'aux concentrations de  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  M, les pesticides : chlorothalonil, pretilachlor, ethoprofos et metribuzin stimulent la peroxydation lipidiques *in vitro* sur des hépatocytes ainsi que des mitochondries et des microsomes isolés du foie des rats mâles. Bagchi et al [184], ont montré que l'incubation des homogénats de foie ou de cerveau avec le chlorpyriphos engendre l'augmentation des niveaux du MDA témoignant des niveaux de peroxydation lipidique accrus induits par cet organophosphoré.

Les études *in vitro*, démontrent ainsi l'implication de deux pesticides étudiés dans le processus oxydatif en altérant l'activité antioxydante enzymatique et en induisant des processus lésionnels aux niveau des membranes cellulaires. Ces études, bien qu'intéressantes, ont toutefois des limites qui tiennent de l'impossibilité de rendre compte de la biodisponibilité, de la toxicocinétique des substances étudiées et du contexte physiologique, paramètres qui influencent considérablement la réponse d'un organisme à une substance toxique. Les modèles *in vitro* doivent de ce fait, être complétés par des études *in vivo*, afin de confirmer les présomptions de toxicité qu'il auraient permis d'identifier [185].

Pour ce faire, les deux pesticides : chlorpyriphos et endosulfan ont été administrés à des lots d'animaux séparément, mais aussi en association.

Chez les rats traités par l'insecticide organophosphoré : chlorpyriphos, nos résultats indiquent une augmentation significative de l'activité de la SOD et de la CAT, mais aussi des niveaux élevés d'MDA.

Le chlorpyriphos, et comme tous les autres organophosphorés, exerce son action notamment par une inhibition de l'activité des acétylcholinestérases, des enzymes clés impliquées dans la neurotransmission [186,187]. Toutefois, en dépit de ce mode d'action spécifique, les effets toxiques de chlorpyriphos se manifestent également par des dysfonctionnements hépatiques sévères. Il a, par ailleurs, été montré que l'exposition aiguë ou chronique à cet insecticide induisait une élévation importante des transaminases AST et ALT [188]. Une atrophie hépatique, mais aussi une destruction de l'architecture hépatique normale ont été constatées suite à l'exposition des rats à ce pesticide [189,190].



Les dommages hépatiques engendrés par l'exposition au chlorpyrifos sont souvent accompagnés par une remarquable altération de la défense antioxydante dans le foie, ce qui laisse supposer que ces derniers sont en rapport avec une production massive des ROS induite par ce pesticide *in vivo*.

C'est ainsi que plusieurs auteurs proposent le stress oxydant comme le mécanisme clé de la toxicité du chlorpyrifos [189, 190, 191, 192].

Nos résultats confirment, en effet, cette hypothèse, étant donné que l'activité des deux enzymes antioxydantes SOD et CAT est significativement augmentée ( $p < 0.01$ ), ce qui pourrait être expliqué par une production importante des ROS. D'autre part, le taux d'MDA significativement plus élevé chez les rats traités par le chlorpyrifos, comparés à ceux non traités atteste d'une peroxydation lipidique importante induite par ce pesticide.

Le chlorpyrifos est, en effet, métabolisé dans le foie par l'intervention de multiples et spécifiques cytochromes P450. Sa biotransformation joue un rôle crucial dans sa toxicité, il est bioactif pour générer l'intermédiaire chlorpyrifos-oxon, hautement réactif pouvant porter atteinte aux molécules environnantes dont les lipides membranaires, d'où une augmentation des taux du MDA [193].

Administré à la même dose que le chlorpyrifos, l'endosulfan provoque lui aussi, une augmentation significative de l'activité de la SOD, de la CAT et des taux d'MDA comparés à celles des rats témoins. Ces effets sont en effet plus accrus comparés à ceux induits par le chlorpyrifos. Ceci atteste d'une toxicité plus importante de l'endosulfan par rapport au chlorpyrifos à dose de 4mg/kg.

Plusieurs études récentes ont prouvé la capacité des organochlorés (endrine, HCH, lindane et autre) à induire le stress oxydant dans les différents organes [194, 195, 196, 197]. Hincal et al [198], ont pu mettre en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique dans les tissus cérébrales et hépatiques suite à une exposition à l'endosulfan. Dans le même contexte, Jalili et al [199], ont, de leur part, constaté que l'endosulfan influence les enzymes antioxydantes dans le cœur et ont attribué les dommages constatés à des dégâts oxydatifs. Selon plusieurs auteurs La toxicité engendrée par ce pesticide s'exerce notamment via sa biotransformation dans le foie par les monooxygénases à cytochrome P450 en des dérivées hautement réactifs causant un stress oxydant [200, 201, 202].

Parallèlement à l'évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes, les concentrations en glutathion hépatique ont été aussi mesurées. Nous constatons une diminution significative des taux de cette molécule antioxydante chez les animaux traités par les deux pesticides testés. Cette déplétion du glutathion consécutive à l'administration des pesticides a, en effet, été constaté dans de nombreuses études. Ainsi, l'exposition aiguë à une forte dose de chlorpyrifos (CPF) (100 mg/kg) a engendré une nette diminution des taux de GSH associée d'une augmentation de niveaux de GSSG dans le foie, les reins et le cerveau des animaux recevant cette substance [192]. De même, le traitement par le malathion (20 ppm) pendant 4 semaines a engendré un déclin du taux de glutathion dans le sang des rats traités [182]. Grâce à la fonction thiol de la cystéine, le glutathion est un composé important pour le maintien de l'état réduit de la cellule. Selon plusieurs auteurs, la conjugaison du GSH à des pesticides ou leurs métabolites *in vivo* pourrait être la voie majeure de leur détoxification [203, 204, 205]. On suppose donc que le glutathion a été utilisé pour la détoxification des pesticides administrés ce qui a engendré une baisse des taux de ce dernier.

L'évaluation de l'effet de deux pesticides administrés indépendamment a, en effet, été complétée par l'évaluation de celui de leur association. A propos, nos résultats indiquent que l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT qui a marqué une hausse considérable suite à l'exposition aux deux pesticides administrés séparément se trouve toutefois, significativement en diminution par rapport à celle des témoins ( $p < 0.01$ ). Ce déclin de l'activité enzymatique antioxydante est, en effet, corroboré par une augmentation drastique des taux d'MDA cytosolique et mitochondrial et une déplétion très remarquée du glutathion hépatique ( $p < 0.001$ ). Ces signes de toxicité beaucoup plus importants que ceux engendrés par les deux pesticides administrés séparément, nous laisse supposer une éventuelle synergie entre les deux pesticides agissant en simultanéité. Cette hypothèse ne peut, toutefois, être discutée faute de travaux qui ont étudié cette combinaison.

En effet, si les effets des molécules séparées sont couramment étudiés, les risques associés aux mixtures des pesticides sont loin d'être estimés, par manque d'études évaluant les effets de combinaisons de pesticides, malgré une multi-exposition constante de l'homme et des autres espèces vivantes à ces substances [206].

Jolas [207], estime qu'il est extrêmement difficile de prédire les effets synergiques des microquantités de pesticides présents dans notre environnement.

En effet, la toxicité de certains pesticides peut, dans notre organisme, s'additionner à celles de certains de leurs congénères. Certains pesticides peuvent même voir leur potentiel toxique multiplié grâce à la présence simultanée d'autres pesticides.

Selon plusieurs auteurs, les effets produits par la combinaison de plusieurs matières actives sont supérieurs aux effets individuels additionnés à cause de l'interaction entre les molécules simultanément présentes [208]. A titre d'exemple, le penconazole (fongicide) stimule la toxicité des organophosphorés envers les mammifères. Ceci résulterait d'une induction du cytochrome P450 responsable de la réaction d'activation des organophosphorés en leur métabolites toxiques : oxons. Pareillement, la propiconazole augmente l'action toxique du parathion en activant la formation du paraoxon. La toxicité des pesticides organophosphorés envers les organismes non ciblés serait donc induite par une exposition antérieure au propiconazole [208]. Aussi, le mélange diméthoate, azinphos-méthyl, diazinon, pyrimiphos-méthyle et bénomyl exerce une toxicité très élevée par rapport aux substances testées individuellement sur des cellules humaines [209].

Au vu de ces constatations et de nos résultats, il s'avère, en effet, que l'étude des combinaisons de différents pesticides est d'une importance primordiale. Dans notre étude, il semble qu'il est loin d'être vérifié que l'effet de chlorpyrifos et de l'endosulfan soit additif. En effet, la toxicité élevée que nous avons constaté suite à l'administration concomitante des deux pesticides, nous laisse supposer qu'il puisse exister une synergie entre ces deux molécules agissant en simultanéité.

# Conclusion

## VII. Conclusion

Les pesticides forment un groupe important de substances chimiques qui peuvent contaminer l'écosystème aboutissant à l'exposition humaine. Malgré les efforts pour développer des méthodes alternatives, les pesticides sont toujours le moyen de lutte prédominant et leurs résidus constituent une menace potentielle.

La dégradation de la qualité des eaux de surface et souterraines constitue l'un des principaux impacts environnementaux causés par l'emploi des pesticides. Ces substances soulèvent ainsi davantage d'inquiétude puisqu'elles sont à l'origine d'une perte continue des ressources hydriques.

La qualité des eaux de la région de Rhedjla qui sont fortement sollicitées par la population jijelienne pour s'alimenter en eau potable est souvent appréciée sous l'angle physico-chimique qui fait abstraction des pesticides utilisés dans cette région caractérisée par une forte production agricole à recours systématique aux traitements phytosanitaires. Ainsi donné, le premier volet de notre travail avait pour objectif d'évaluer la qualité des eaux de cette région vis-à-vis une éventuelle contamination par les résidus pesticides.

Pour ce faire, une méthodologie allant de la collecte des échantillons en passant par l'extraction et l'analyse par CG / SM a été appliquée. Deux campagnes d'échantillonnage ont été menés la première du 17 février au 5 mars 2007 et la deuxième pendant la première semaine du mois janvier 2008. Durant chaque campagne nous avons analysé 12 échantillons prélevés de 6 points différents.

L'analyse des résultats des échantillons prélevés lors de la première campagne, n'a pas permis de mettre en évidence une contamination des puits échantillonnés par les résidus pesticides, ce qui est très certainement due en partie aux conditions climatiques particulières qui ont précédé l'étape d'échantillonnage des ces eaux.

Pendant la deuxième campagne, nous avons pu mettre en évidence une contamination par trois molécules de pesticides, il s'agit du chlorpyrifos détecté dans trois sites analysés ainsi que les organochlorés  $\alpha$ -endosulfan et  $\beta$ -endosulfan apparaissant dans un seul site. La détection de ces molécules trouve une explication notamment dans le fort potentiel de leur emploi dans la région comme cela a d'ailleurs été confirmé par notre enquête conduite auprès des agriculteurs et des distributeurs des produits phytosanitaires dans la wilaya de Jijel, à cela

s'ajoutera les fortes pluies ayant précédé l'étape d'échantillonnage et qui ont certainement contribué à augmenter le potentiel du lessivage aidant à déplacer ces molécules vers la nappe.

La deuxième partie de notre travail est focalisée sur la détermination de l'effet éventuellement prooxydant des molécules de pesticides responsables de la contamination des eaux en question. Les molécules testées sont alors le chlorpyrifos ainsi que l'endosulfan dont la formulation commerciale renferme les deux isomères détectés dans l'eau analysée.

Les résultats de cette partie ont montré que tant *in vitro* qu'*in vivo*, les deux pesticides sont fortement impliqués dans la génération du stress oxydant, étant donné qu'ils sont responsables :

- d'une déplétion des systèmes de défense antioxydante enzymatique (SOD, Catalase) par les fortes concentrations dans l'étude *in vitro* et chez les rats recevant l'association des deux pesticides *in vivo*.
- d'une altération des mécanismes de la défense non enzymatique du corps mise en évidence par la diminution significative des niveaux du glutathion réduit GSH.
- d'une atteinte très sévère des membranes biologiques objectivée par des taux élevés du MDA générés suite à l'exposition à ces deux substances même en faibles concentration *in vitro* et dans les trois lots traités par les pesticides *in vivo*.

Etant donné l'implication prouvée de ces deux pesticides dans la génération d'un état de stress oxydatif cellulaire, il devient, en effet, impératif de prendre en compte la pollution enregistrée, cette contamination ayant inévitablement des répercussions sur la santé du consommateur de ces eaux.

La question qui se pose toutefois est de savoir si on est devant une pollution persistante ou si cette contamination a été observée à cause seulement des fortes pluies qui ont précédé les échantillonnages donc épisodique et non étalée dans le temps.

Ce travail fait ainsi apparaître l'importance d'un prolongement par des études complémentaires, permettant de mieux comprendre dans quelle catégorie cette contamination pourrait elle être classée. De nombreuses perspectives sont alors envisageables à l'issue de ce travail, nous proposons de :

- ❖ effectuer des prélèvements plus étalés dans le temps avec un nombre plus important des échantillons permettant d'augmenter la reproductibilité des résultats et d'assurer la représentabilité temporelle des échantillons prélevés ;
- ❖ procéder à la quantification des molécules de pesticides contaminant cette eau pour déceler la présence ou non d'un dépassement des concentrations maximales recommandées pour les pesticides dans les eaux potables ;
- ❖ cibler des molécules bien déterminées à rechercher dans l'eau analysée afin de garantir des niveaux de précision élevés ne pouvant être fournis par la recherche multirésiduelle ;
- ❖ prendre en compte les métabolites des pesticides qui sont souvent plus toxiques que les composés précurseurs.

Enfin, étant donné la toxicité très élevée engendrée par l'administration concomitante des deux pesticides testés, nous proposons de concerner par un plus grand nombre d'études l'effet des associations des différentes matières actives utilisées dans la région, notamment devant le manque de données toxicologiques dans la littérature scientifique des effets des mélanges de différents pesticides.

4

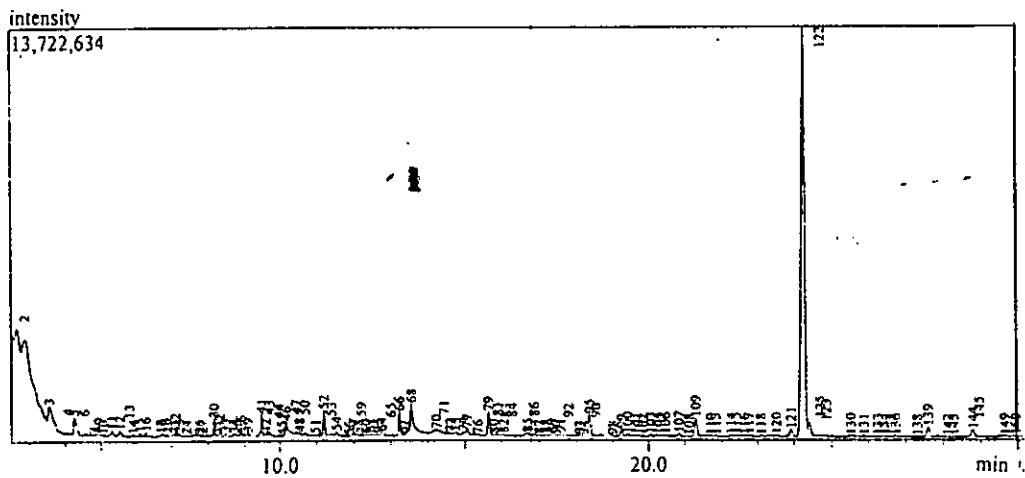
# Annexes

4

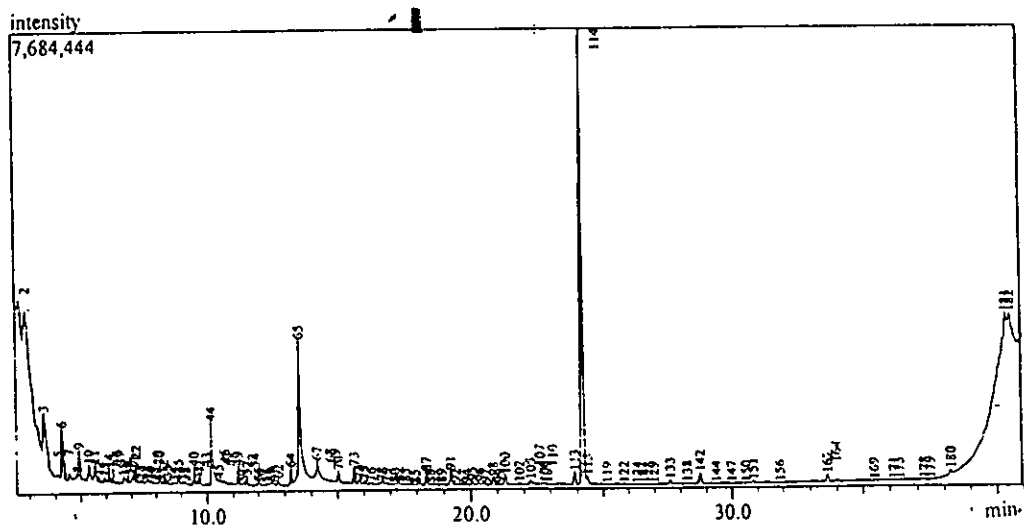


## VIII. Annexes

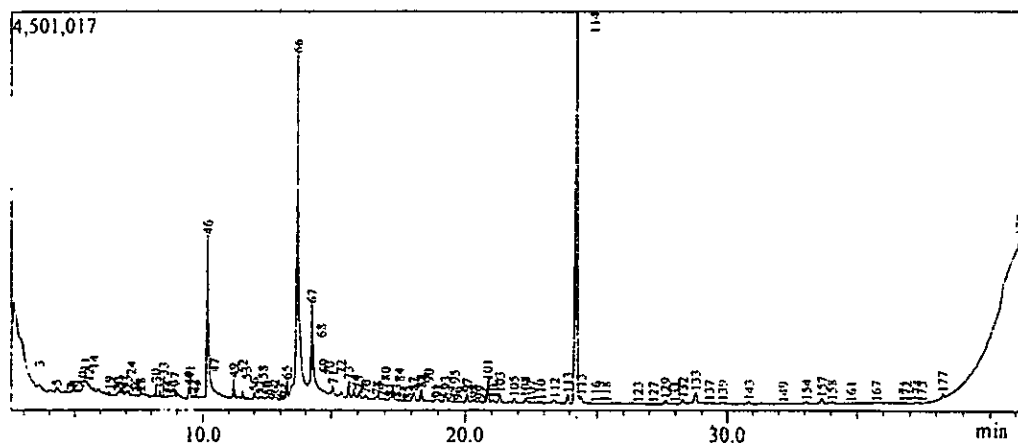
## Annexe 1



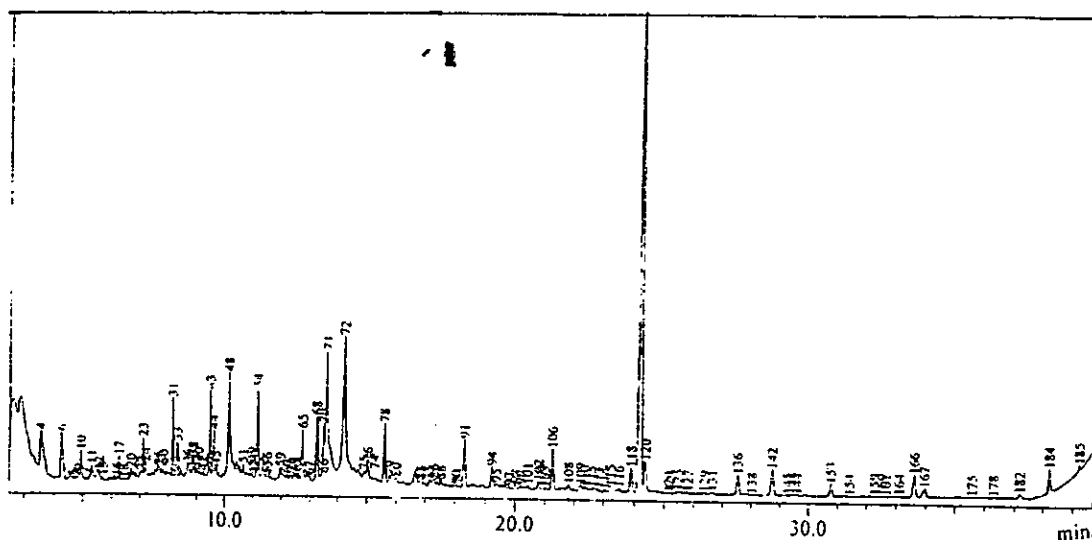
**Figure 42: Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°1 (première campagne d'échantillonnage)**



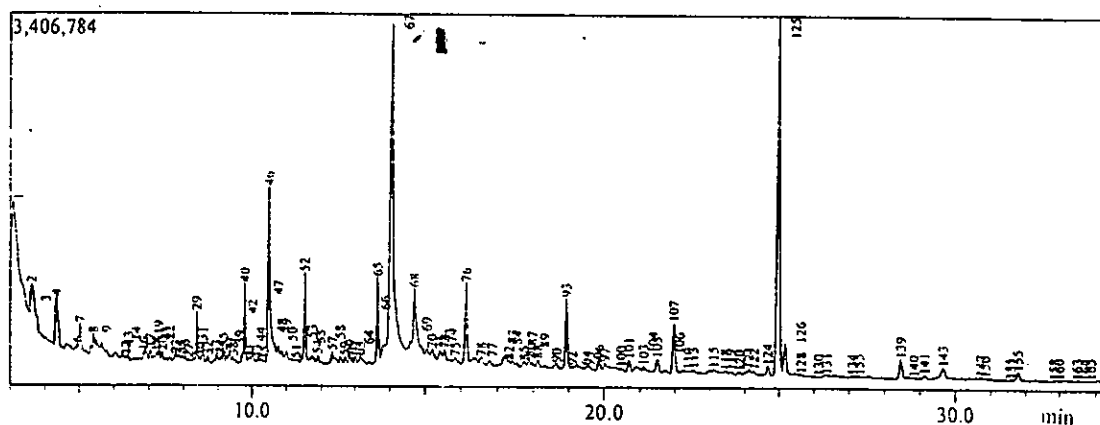
**Figure 43 : Profil chromatographique du premier échantillon du site N°2 (première campagne d'échantillonnage)**



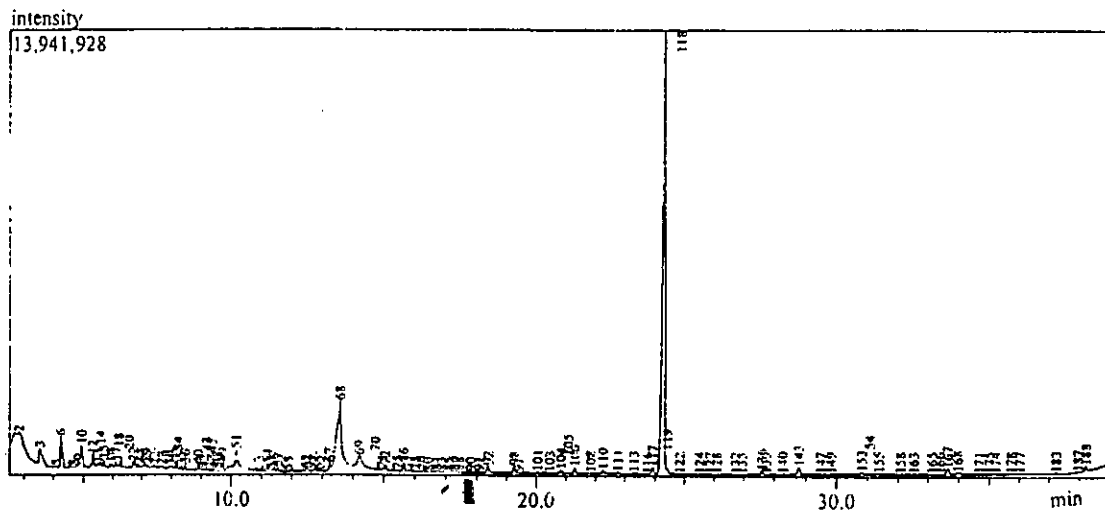
**Figure 44: Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°2 (première campagne d'échantillonnage)**



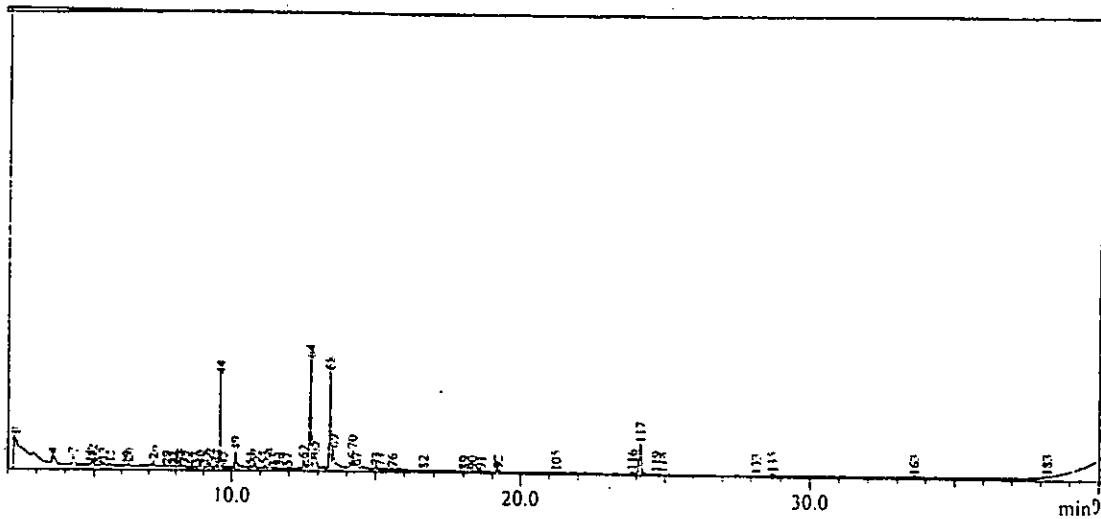
**Figure 45 : Profil chromatographique du premier échantillon du site N°3 (première campagne d'échantillonnage)**



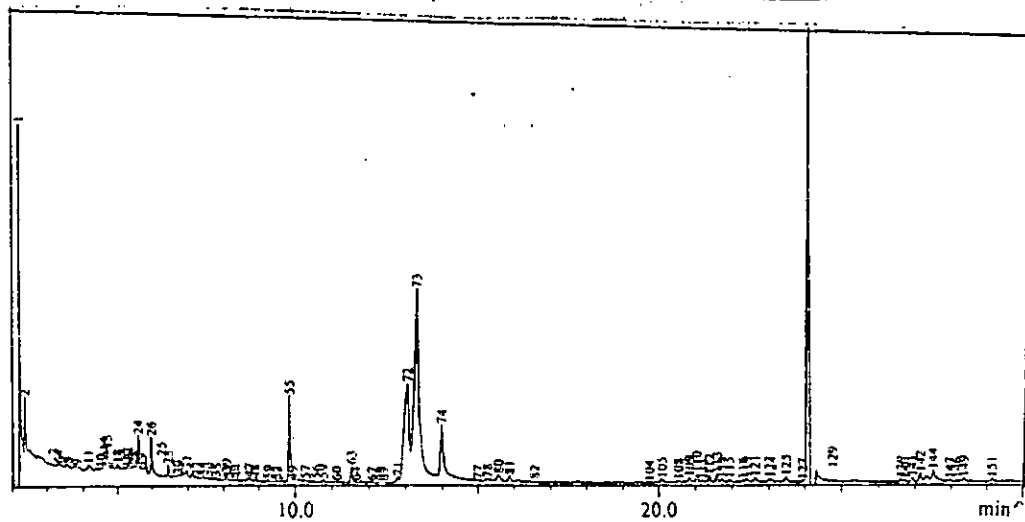
**Figure 46 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°3 (première campagne d'échantillonnage)**



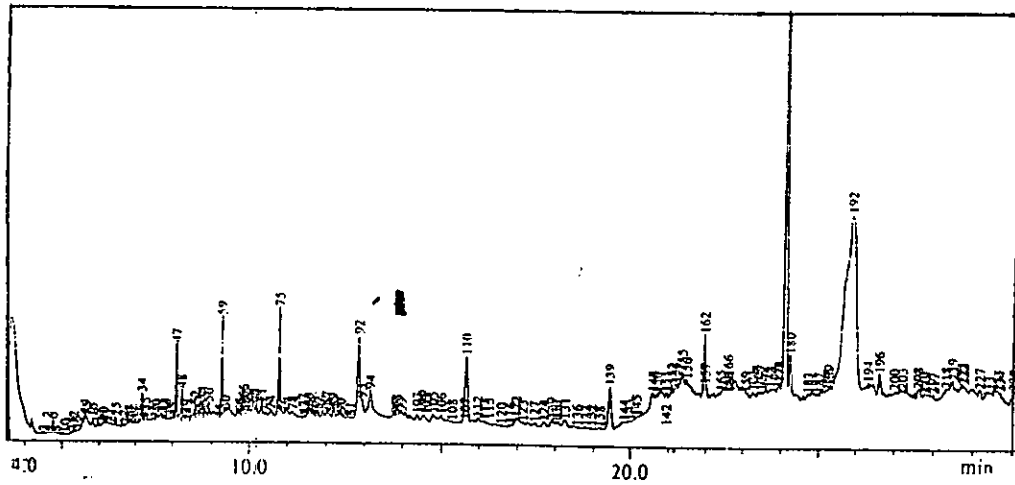
**Figure 47 : Profil chromatographique du premier échantillon du site N°4 (première campagne d'échantillonnage)**



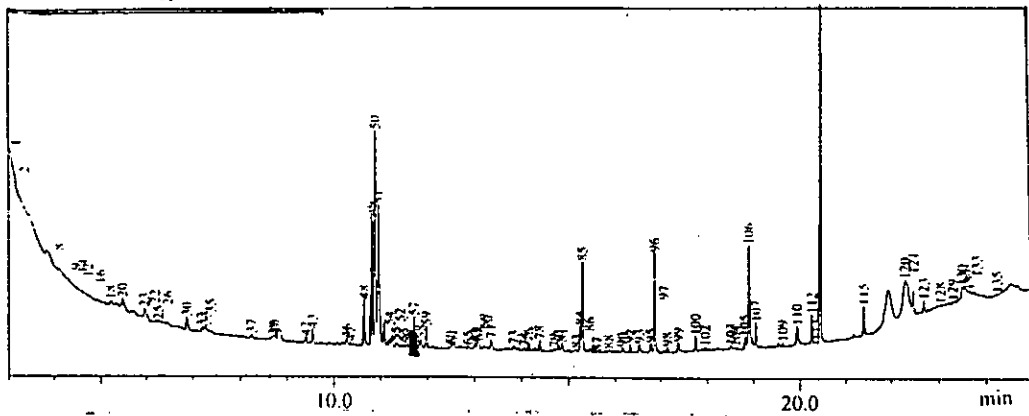
**Figure 48: Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°4 (première campagne d'échantillonnage)**



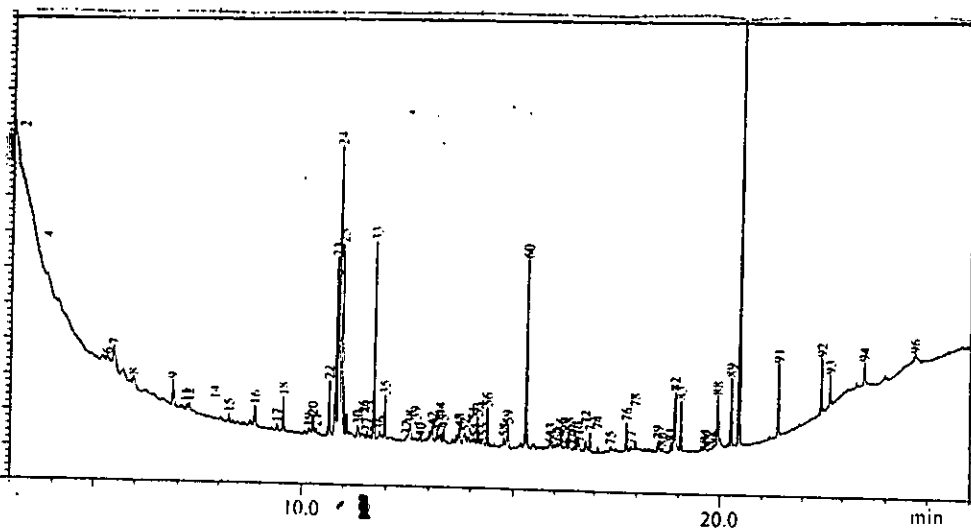
**Figure 49 : Profil chromatographique du premier échantillon du site N°5 (première campagne d'échantillonnage)**



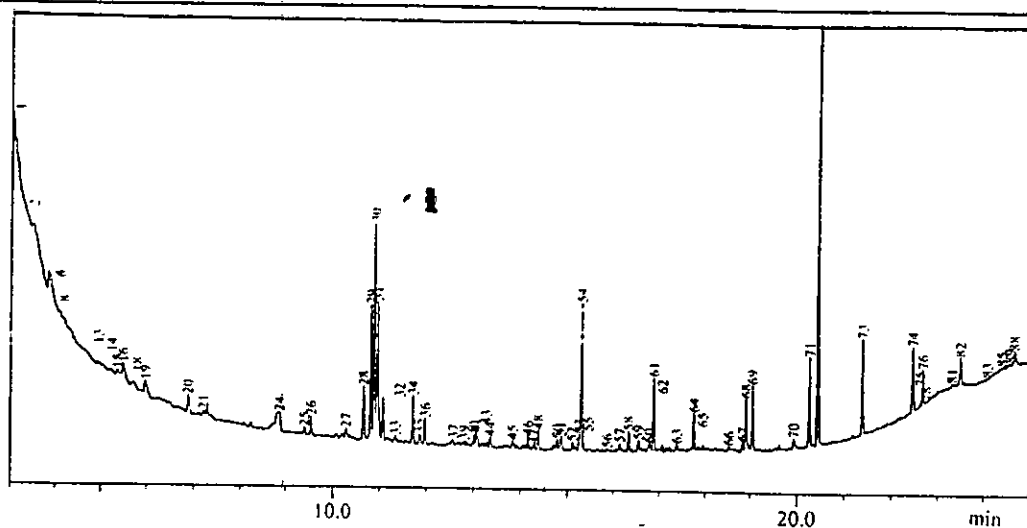
**Figure 50 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°5  
(première campagne d'échantillonnage)**



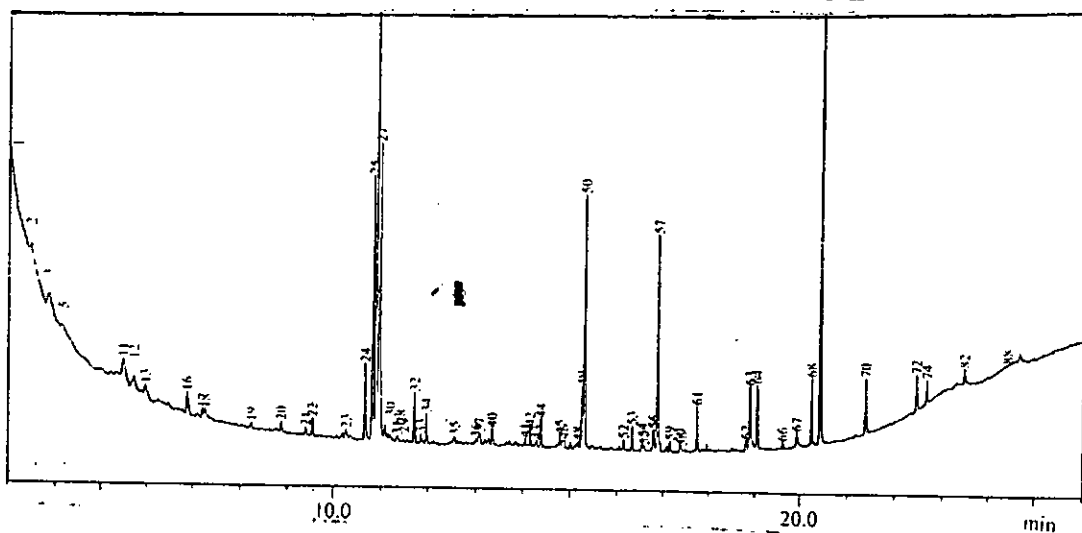
**Figure 51 : Profil chromatographique du premier échantillon du site N°6  
(première campagne d'échantillonnage)**



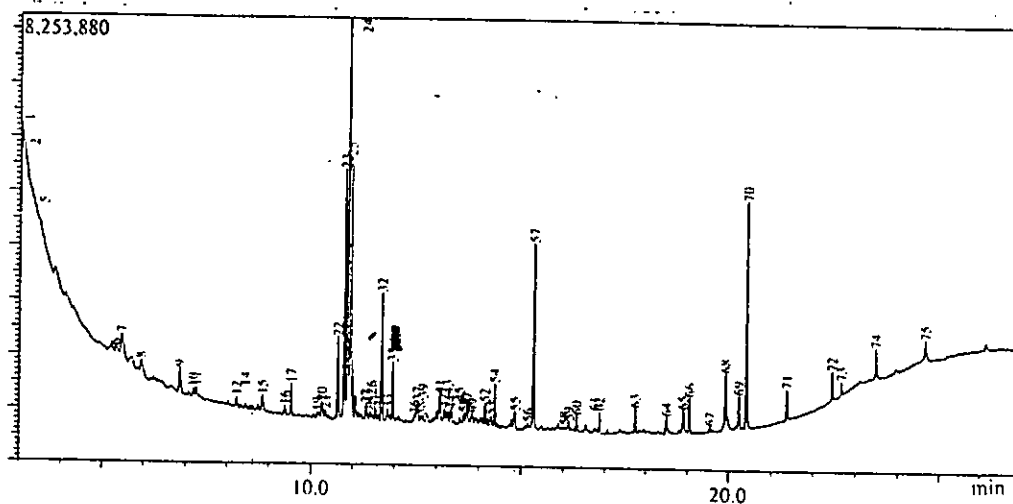
**Figure 52 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°6  
(première campagne d'échantillonnage)**



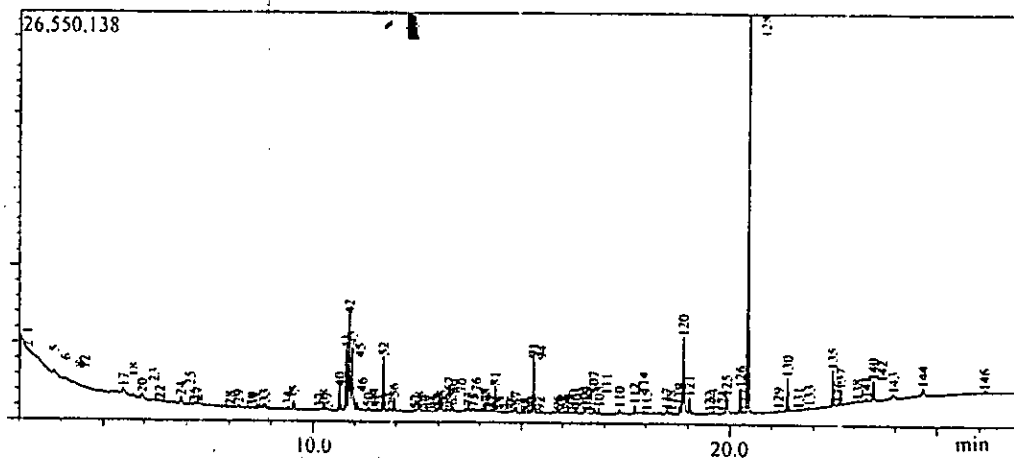
**Figure 53: Profil chromatographique du premier échantillon du site N°1 (deuxième campagne d'échantillonnage)**



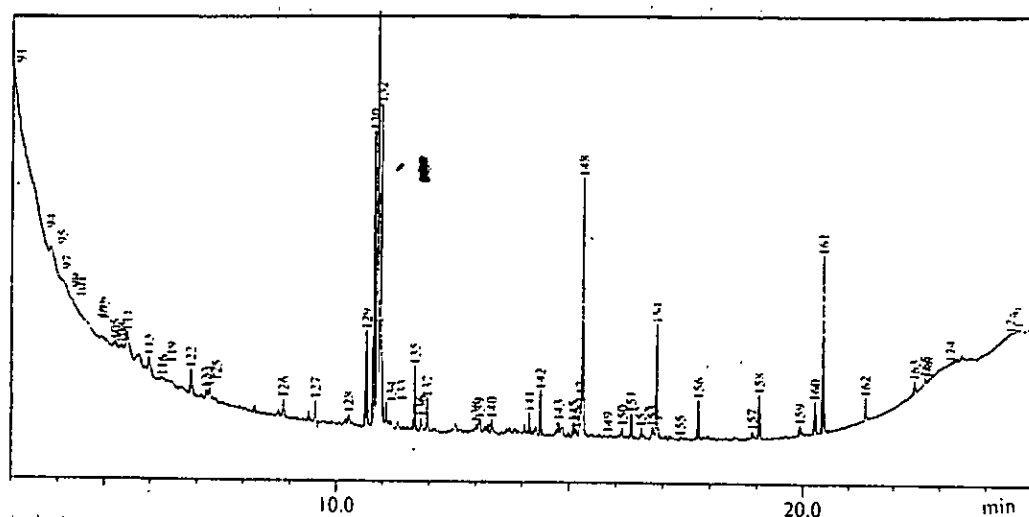
**Figure 54 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°1 (deuxième campagne d'échantillonnage)**



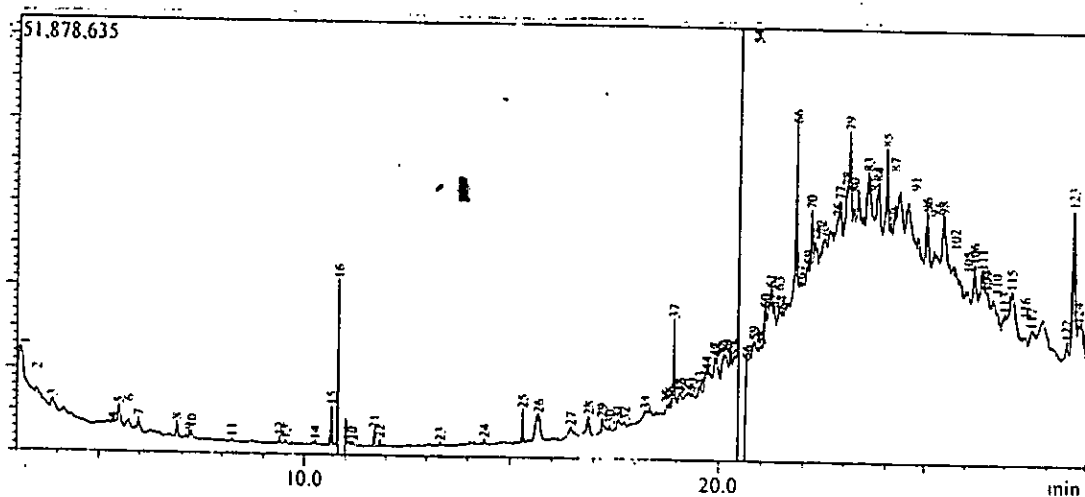
**Figure 55: Profil chromatographique du premier échantillon du site N°4 (deuxième campagne d'échantillonnage)**



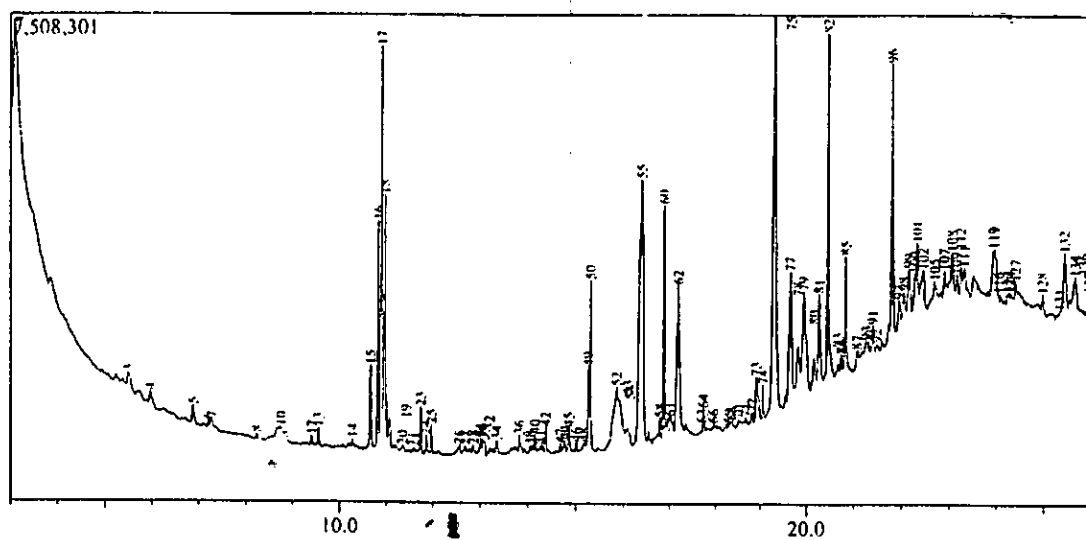
**Figure 56 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°4  
(deuxième campagne d'échantillonnage)**



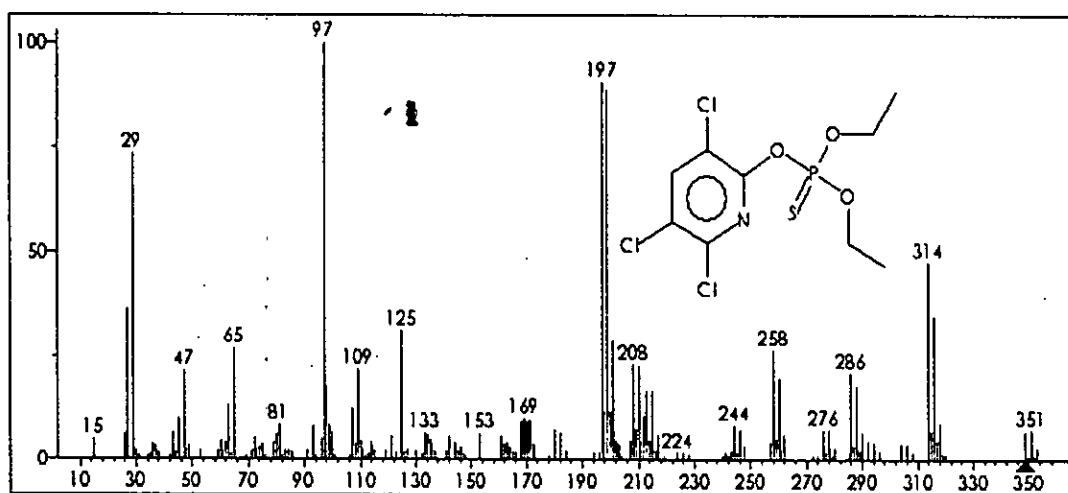
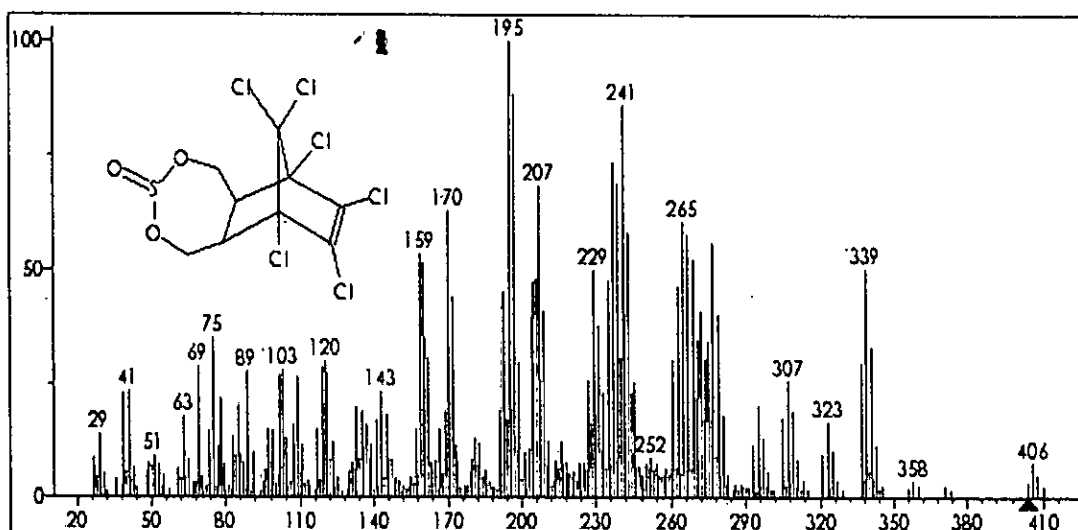
**Figure 57: Profil chromatographique du premier échantillon du site N°5  
(deuxième campagne d'échantillonnage)**



**Figure 58: Profil chromatographique du premier échantillon du site N°6  
(deuxième campagne d'échantillonnage)**



**Figure 59 : Profil chromatographique du deuxième échantillon du site N°6  
(deuxième campagne d'échantillonnage)**

**Annexe 2****Figure 59: Spectre de masse de référence du chlorpyrifos.****Figure 60 : Spectre de masse de référence de l' $\alpha$ -endosulfan**



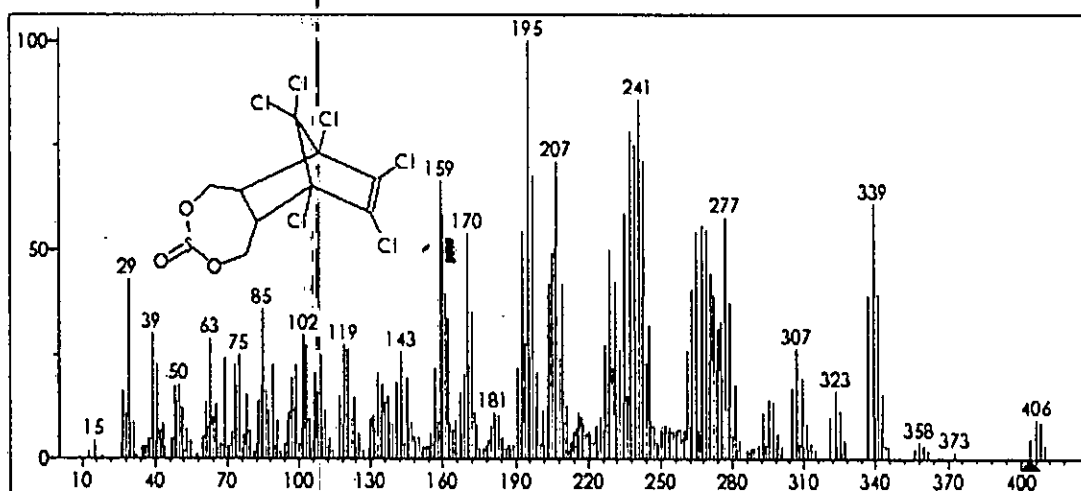


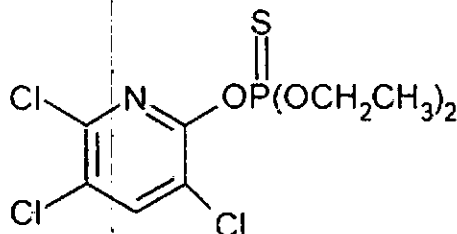
Figure 61 : Spectre de masse de référence du  $\beta$ -endosulfan.

## Annexe 3

### Chlorpyrifos

**Classification chimique :** insecticide organophosphoré

**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS



**Synonyme :** Dursban, trichlorméthylfos

**Dénominations :**

- **C.A.S :** phosphorothioic acid,O,O-diéthyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)  
Ester
- **I.U.P.A.C. :** Phosphorothioate de O-3, 5,6-trichloro-2-pyridyle) et de  
O,Odiethyle

**Propriétés Physico-Chimiques :**

- **Masse Moléculaire :** 350.62 g/mol
- **Etat Physique :** solide cristallisé
- **Solubilité dans l'eau :** 2 mg/l
- **Pression de Vapeur :** 2,5\*10<sup>-3</sup> Pa
- **Constante de Henry :** 1,75 Pa\*m<sup>3</sup>/mole
- **Hydrolyse à pH 7 :** très stable
- **Coefficient de partage octanol /eau (log Kow) :** 4,7
- **Coefficient de partage avec le carbone organique (Koc) :** 6070 cm<sup>3</sup>/g

**Toxicité de la matière active :**

- **DT 50** : 35 jours
- **DL 50 pour le rat par ingestion** : 163 mg/kg
- **DJA** : 0,001 mg/kg/jour
- **Classement toxicologique** : nature (N), toxique (T), R53 peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique, R24/25 toxique par contact avec la peau et par ingestion, R50 très toxique pour les organismes aquatiques.

**Utilisation :**

- **Maïs**: Pyrale (375 g/ha)
- **Vigne** : Tordeuses (285 g/ha), Cochenilles (342 g/ha)
- **Pêcher** : Cochenille du mûrier (50 g/hl)

**Condition d'emploi** : délai d'emploi avant récolte : 21 jours sur vigne, 30 jours sur Pêcher.

Limite maximale en résidus sur et dans (LMR):

- agrumes : 0,3 mg/kg
- fruits à pépins, raisins : 0,5 mg/kg
- kiwi : 2mg/kg
- autres fruits et légumes, céréales, graines oléagineuses, pommes de terre : 0.05 mg/kg
- fraises, fruits à noyau : 0,2 mg/kg
- thé, carotte : 0,1 mg/kg

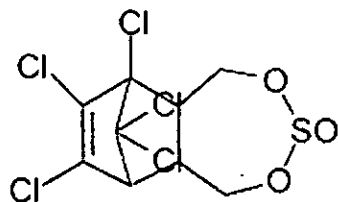
**Formulations commercialisées** : concentré émulsionnable, granulé, appât prêts à l'emploi.

**En associations avec** : cyperméthrine, diméthoate, lindane.

## Endosulfan

**Classification chimique :** insecticide organochloré

**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S



**Synonyme :** thiodan

**Dénominations :**

- C.A.S : 6,9-METHANO-2,4,3-BENZODIOXATHIEPIN,6,7,8,9,10,10-  
HEXACHLORO-1, 5,5a, 6, 9,9a-HEXAHYDRO-3-OXIDE
- I.U.P.A.C. : 3-Oxyde de 6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9ahexahydro-  
6,9-methano-2, 4,3-benzodioxathiepine

**Propriétés Physico-Chimiques :**

- **Masse Moléculaire :** 406,96 g/mol
- **Etat Physique :** solide cristallise
- **Solubilité dans l'eau :** 0,32 mg/l
- **Pression de Vapeur :**  $2,30 \cdot 10^{-5}$  Pa
- **Constante de Henry :**  $2,90 \cdot 10^{-2}$  Pa\*m<sup>3</sup>/mole
- **Hydrolyse à pH 7 :** très stable
- **Coefficient de partage octanol/eau (log Kow) :** 3,6
- **Coefficient de partage avec le carbone organique (Koc) :** 12400 cm<sup>3</sup>/g

**Toxicité de la matière active :**

- DT 50 : 120 jours
- DL 50 pour le rat par ingestion: 43-110 mg/kg
- DJA : 0,015 mg/kg/jour
- Classement toxicologique : nature (N), toxique (T), R36 irritant pour les

yeux, R53 peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique, R24/25 toxique par contact avec la peau et par ingestion, R50 très toxique pour les organismes Aquatiques.

**Utilisation :**

- GRANDE CULTURE : céréales : *pucerons sur épis*(525 g/ha), crucifères oléagineuses : *charançon* (612,5 g/ha), pois protéagineux : *puceron* (612,5 g/ha).
- ARBRES FRUITIERS : abricotier, cassissier, framboisier, noisetier, noyer, pêcher, poirier-cognassier-nashi, pommier.
- CULTURES LEGUMIERES : acariens, artichaut, asperge, laitue, chou, fraisier, melon.
- CULTURES TROPICALES : ananas, bananier, canne à sucre : 2000g/ha.

**Condition d'emploi :** délai d'emploi avant récolte : 15 jours sur artichaut, asperge, chou, fraisier, pois de conserve ; 3 jours sur concombre, melon.

**Limite maximale en résidus sur et dans (LMR):**

- Les fruits et autres légumes : 1 mg/kg.
- Légumes-racines, maïs : 0,2 mg/kg.

**Formulations commercialisées :** concentré émulsionnable, suspension concentrée pour le traitement des semences, poudre mouillable pour traitement humide.

**En associations avec :** deltaméthrine, lindane, parathion éthyl, thiométhon, anthraquinone, thiabendazole, triacétate de guazatine.

## Annexe 4

### A. Préparation des solutions tampons

#### ❖ Préparation de la solution TSE (QSP 1000 ml)

Sucrose ultrapur : 85.5 g  
Tris : 1.21 g  
EGTA : 0.38 g

pH= 7.2 à 4 C°

#### ❖ Préparation de la solution TS (QS 1000 ml)

Sucrose ultrapur : 85.6 g  
Tris : 1.2 g

pH= 7.2 à 4 C°

### B. Préparation de la solution hypotonique : QSP 100 ml

KH<sub>2</sub>PO : 0.49 g  
MgCL<sub>2</sub> : 0.47 g

pH= 7.2

# Références bibliographiques

**IX. Références bibliographiques**

- [1] **Passos C J S., 2006.** Exposition humaine aux pesticides : un facteur de risque pour le suicide au Brésil?. *La Revue en sciences de l'environnement VertigO*, 7(1) : 1-18.
- [2] **Aaron J J., Pernet P., Quisefit J P., Tessier D., Pinart J., 2005.** Mise en évidence du transfert de pesticides d'origine agricole dans l'atmosphère sur deux sites urbain et rural en région Ile de France. *Cemagref, France*, pp : 8.
- [3] **Ahrens C., Cramerh H H., 1985.** Improvement of agricultural production by pesticides. *Environment and chemicals in agriculture*, pp : 12.
- [4] **Tawil G., 2007.** Etude bibliographique sur l'effet des pesticides sur la santé chez l'homme. *Master 2 Recherche « Elaboration de la qualité et sécurité alimentaire », Ecole nationale vétérinaire, Toulouse, France*, pp : 14.
- [5] **Philogène B J R., 1991.** La lutte anti-acridienne. *Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, France*, pp : 269.
- [6] **WHO. UNEP., 1989.** Public Health Impact of Pesticides used in Agriculture. *OMS et PNUE, Genève, Suisse*.
- [7] **Sanborn M., Cole D., Kerr K., Vakil C., Sanin L H., Bassil K., 2004.** Pesticides Literature Review. *Ontario College of Family Physicians*, pp : 186.
- [8] **Solomon G., Ogunseitán O A., Kirsch J., 2000.** Pesticides and human health : a resource for health care professionals. *Université de California, San Francisco*, pp:39.
- [9] **Boutry F., Delvaux L., 2007.** Pesticides, début d'une réduction. *La Libre Belgique*, pp : 8.
- [10] **Ould Kankou M., 2004.** Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie : étude en laboratoire du comportement de deux pesticides. *Thèse de doctorat, Université de Limoges, France*, pp : 154.
- [11] **Loi algérienne N° 87-17 relative à la protection phytosanitaire., 1987.** *Journal officiel de la république algérienne N°32 du 05-08-1987*.
- [12] **Domange N., 2005.** Etude des transferts de produits phytosanitaires à l'échelle de la parcelle et du bassin versant viticole ( Rouffach, Haut- Rhin ). *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg I, France*, pp : 285.
- [13] **Marc J., 2004.** Effets toxiques d'herbicides à base de glyphosate sur la régulation du cycle cellulaire et le développement précoce en utilisant l'embryon d'oursin. *Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, France*, pp : 127.



- [14] **Even I., Berta J L., Volatier J L., 2002.** Evaluation de l'exposition théorique des nourrissons et des enfants en bas âge aux résidus de pesticides apportés par les aliments courants et infantiles. *Agence française de sécurité sanitaire des aliments.*
- [15] **Chafik N., 2002.** Contribution à l'étude du comportement de l'herbicide triflusaluron méthyle dans le sol et dans les milieux aquatiques. *Thèse de doctorat, Université Hassan II Ain- Chock, Casablanca, Maroc, pp : 117.*
- [16] **Garon-Boucher Margoum C., 2003.** Contribution à l'étude du devenir des produits phytosanitaires lors d'écoulements dans les fosses : caractérisation physico- chimique et hydrodynamique. *Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier- Grenoble I, France, pp : 244.*
- [17] **Guigon E., 2003.** Répartition des pesticides dans les phases gazeuses, dissoute et particulaire du compartiment atmosphérique : influence sur le transport à longue distance. *DEA hydrologie, géostatistique et géochimie. Université Pierre et Marie Curie, France, pp : 53.*
- [18] **Darriet F., 1998.** La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies. *Edition KARTHALA. Paris, France.*
- [19] **Bouchon C., Lemoine S., 2003.** Niveau de contamination par les pesticides des chaînes trophiques des milieux marins côtiers de la Guadeloupe et recherche de biomarqueurs de génotoxicité. *Université des Antilles et de la Guyane, Guadeloupe, France, pp : 30.*
- [20] **Thiollet- Scholtus M., 2004.** Construction d'un indicateur de qualité des eaux de surface vis-à-vis des produits phytosanitaires à l'échelle du bassin versant viticole. *Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, France, pp : 180.*
- [21] **Gendrault Derveaux S., 2004** Etude d'un traitement combiné bio-physico- chimique pour la décontamination des eaux polluées en atrazine. *Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées de Lyon, Lyon, France, pp : 234.*
- [22] **Colin F., 2000.** Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires : cas de l'atrazine dans le bassin versant du Sousson ( Gers, France). *Thèse de doctorat, Unité de recherche mixte Cemagref- ENGREF « Structures et Systèmes Spatiaux », Montpellier, France, pp : 233.*
- [23] **Vigouroux-Villard A., 2006.** Niveau d'imprégnation de la pollution générale aux pesticides : sélection des substances à mesurer en priorité. *Master professionnel, Université Paris 5, France, pp : 46.*
- [24] **Marlière F., 2001.** Pesticides dans l'air ambiant. *INERIS –Unité qualité de l'air- Direction des risques chroniques, France, pp : 23.*
- [25] **Grosclaude G., 1999.** L'eau. Tome II : usage et polluants. *Institut national de la recherche agronomique, Paris, France, pp : 201.*

- [26] **Madrigal-Monarrez I., 2004.** Rétention de pesticides dans les sols des dispositifs tampon, enherbés et boisés : rôle des matières organiques. *Thèse de doctorat, Institut agronomique Paris- Grignon, France, pp : 218.*
- [27] **Aubertot J N., Barbier J M., Carpentier A., Gril J J., Guichard L., Lucas P., Savary S., Savini I., Voltz M., 2005.** Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. *Rapport d'Expertise scientifique collective, INRA et Cemagref, France, pp : 64.*
- [28] **Guimont S., 2005.** Devenir des pesticides dans les sols en fonction de l'état d'humidité et du mode de circulation de l'eau dans le sol. *Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, France, pp : 223.*
- [29] **Guigon-Moreau E., 2006.** Transfert des pesticides vers les eaux superficielles et l'atmosphère : caractérisation et modélisation sur le bassin versant de la Vesle. *Thèse de doctorat, Université Paris VI- Pierre et Marie Curie, Paris, France, pp : 187.*
- [30] **López-Blanco C., Gómez-Álvarez S., Rey-Garrote M., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J., 2005.** Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME-GC in natural water. *Analytical and bioanalytical chemistry, 383( 4) : 557-561.*
- [31] **Calvet R., Charnay M P., 2002.** Le devenir dans le sol des substances phytopharmaceutiques : pesticide et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement. *Ed ACTA, Paris, France, pp : 28.*
- [32] **Feigenbrugel V., 2005.** Devenir atmosphérique des pesticides: distribution entre les différentes phases de l'atmosphère et oxydation photochimique. *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France, pp : 205.*
- [33] **Kersanté A., 2003.** Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré. *Thèse de doctorat, Université de Rennes I, France, pp : 189.*
- [34] **Corpen., 1999.** Désherbage-éléments de raisonnement pour une maîtrise des adventices limitant les risques de pollution des eaux par les produits phytosanitaires, *pp : 161.*
- [35] **Pollock D W., Kookana R S., Correll R L., 2005.** Integration of the pesticide impact rating index with a geographic information system for the assessment of pesticide impact on water quality. *Water Air and Pollution, 5: 67-88.*
- [36] **Claver, Ormad P., Rodríguez L., Ovelleiro J L., 2006.** Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain), *Chemosphere, 64(9) : 1437-1443.*
- [37] **Mouvet C., Baran N., 2004.** Pesticides dans les eaux souterraines. *Centre scientifique et technique, France, pp : 18.*

- [38] **Organisation Mondiale de la Santé., 1993.** Lignes directrices relatives à la qualité de l'eau potable.
- [39] **Barrette E., 2006.** Pesticides et eau souterraine : prévenir la contamination en milieu agricole. *Direction des politiques en milieu terrestre, ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs, Québec, pp : 15.*
- [40] **Ballerini D., Gatelier C., Vogel T., 1998.** Techniques de traitement par voies biologiques des sols pollués. *ADEME, pp : 546.*
- [41] **Hildebrandt A., Lacorte S., Barceló D., 2007.** Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Anal Bioanal Chem, 387: 1459-1468.*
- [42] **Giroux I., 2004.** La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. *Québec, ministère de l'environnement, direction du suivi de l'état de l'environnement, Envirodoq n° ENV/2004/0309, collection n° QE/151, pp : 40.*
- [43] **Samuel O., Saint-Laurent L., 2001.** Guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraîchère. *Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec, pp : 86.*
- [44] **El Bakouri H., 2005.** Etat d'intoxication par les pesticides au Maroc. *L'Opinion N°14530.*
- [45] **Costa C., Silva S., Coelho P., Roma-Torres J., Teixeira J P., Mayan O., 2007.** Micronucleus analysis in a Portuguese population exposed to pesticides: Preliminary survey. *Int J Hyg Environ Health, 210 (3-4): 415-418.*
- [46] **Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D., 2001.** Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology, 165 (2-3): 153-162.*
- [47] **Scheyer A., 2004.** Développement d'une méthode d'analyse par CPG/MS/MS de 27 pesticides identifiés dans les phases gazeuses, particulaire et liquide de l'atmosphère. Application à l'étude des variations spatio-temporelles des concentrations dans l'air et dans les eaux de pluie. *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France, pp : 209.*
- [48] **INRS., 2002.** Perturbateurs endocriniens et risques professionnels : dossier médico-technique. *INRS, Paris, France, pp : 16.*
- [49] **Sadia A., Jyotsna V., Nibhrati D., 2003.** Effect of endosulfan and malathion on lipid peroxidation, nitrite and TNF- $\alpha$  release by rat peritoneal macrophages. *Int. immunopharmacol, 3 (13-14) : 1819-1828.*
- [50] **Videira R A., Antunes-Madeira M C., Lopes V I C F., Madeira V M C., 2001.** Changes induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes, 1511 (2): 360-368.*

- [51] Muto M A., Lobelle F., Bidanset J H., Wurpel J N., 1992. Embryotoxicity and neurotoxicity in rats associated with prenatal exposure to dursban. *Vet.Hum.Toxicol*, 34: 498-501.
- [52] Altuntas I., Delibas N., Doguc D. K., Ozmen S et Gultekin F., 2002. Role of reactive oxygen species in organophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 17: 153-157.
- [53] Baldi I., Filleul L., Brahim M B., 2001. Neuropsychologic effects of long-term exposure to pesticides: result from the French Phytoner study. *Environ Health Perspect*, 109: 839-844.
- [54] Wang X F., Li S., Chou A P., Bronstein J M., 2006. Inhibitory of pesticides on proteasome activity: Implication in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 23: 198-205.
- [55] Shukla G., Kumar A., Bhanti M., Joseph P E., Taneja A., 2005. Organochlorine pesticide contamination of ground water in the city of Hyderabad. *Environment International*, 32: 244-247.
- [56] Brun A., Picarel J., Plouzane M., 2003. Les sous- produits de dégradation des produits phytosanitaire. *Office international de l'Eau. ISIM*.
- [57] Sabik H., 1991. Analyse de traces de pesticides organiques : intérêt, méthodologie, exemples. *Thèse de doctorat en Chimie, Université d'Angers, pp : 186*.
- [58] Januel C., 2003. Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète : étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. *Thèse de doctorat, Université Lyon I / INSA-Lyon, France, pp : 200*.
- [59] Garait B., 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. *Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier, France, pp : 159*.
- [60] Daum-Badouard C., 2006. Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. *Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier-Grenoble, France, pp : 167*.
- [61] Bourdon E., 2000. Stress oxydant et glycation : étude de l'albumine et des apolipoprotéines AL et B : biosynthèse par l'hépatocyte humain en culture et importance chez le diabétique. *Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, France, pp : 269*.
- [62] Delaunay A., 2002. Contrôle de l'homéostasie redox et détection des oxydants : régulation du facteur de transcription Yap1 chez *S. cerevisiae*. *Thèse de doctorat, Institut national agronomique Paris-Grignon, France, pp : 221*.

- [63] **Viot S., 2004.** Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire : étude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' $\alpha$ B - cristalline. *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard -Lyon I, France, pp : 225.*
- [64] **Aurousseau B., 2002.** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim, 15 (1) : 67-82.*
- [65] **Servais S., 2004.** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3. *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I, France, pp : 161.*
- [66] **Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *C.R. Biologies, 327: 649-662.*
- [67] **Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J O., 1999.** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons, 4(5).*
- [68] **Marfak A., 2003.** Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. *Thèse de doctorat, Université de Limoges, France, pp : 187.*
- [69] **Haton C., 2005.** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thèse de doctorat, Université Paris VI, Pierre et Marie Curie, France, pp : 147.*
- [70] **Fahn S., Cohen G., 1992.** The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease : evidence supporting it. *Ann Neurol, 32: 804-812.*
- [71] **Nouette-Gaulain K., Quinart A., Letellier T., Sztark F., 2007.** La mitochondrie : rôle et implications en anesthésie-réanimation. *Annale française d'anesthésie et de réanimation, 26 : 319-333.*
- [72] **Echaniz -Laguna A., 2006.** Etude de la fonction mitochondriale et de l'expression du gène Nogo dans le muscle squelettique dans la sclérose latérale amyotrophique sporadique chez l'homme. *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg I, France, pp : 71.*
- [73] **Guerrero K., 2005.** Organisation structurale et fonction métabolique des unités énergétiques intracellulaires (ICEU<sub>s</sub>) dans le muscle cardiaque et squelettique : conditions physiologiques et pathophysiologiques. *Thèse de doctorat, Université Grenoble I – Joseph Fourier. Ecole pratique des hautes études Paris, France, pp : 200.*
- [74] **Castronovo V., 2003.** Alimentation et cancer. *Rev Med Liege, 58 (4) : 231-239.*
- [75] **Oudot-Le Secq M P., 2000.** Organisation et structure des génomes mitochondriaux des algues brunes *Pylaiella littoralis* et *Laminaria digitata*. *Thèse de doctorat, Université de Rennes I, France, pp : 27.*

- [76] **Dumas J F., 2004.** Métabolisme énergétique mitochondrial dans des situations de perte de poids. *Thèse de doctorat, Université d'Angers, France, pp : 194.*
- [77] **Koechlin-Ramoatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme, 20 : 165-167.*
- [78] **Baughman J M., Mootha V., 2006.** Buffering mitochondrial DNA variation. *Nature Genetics, 38 : 1232-1233.*
- [79] **Halliwel B., 1994.** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet, 344: 721-724.*
- [80] **Bélangier M C., 2007.** Statut redox, inflammatoire et métabolique chez une population inuit: effets d'une alimentation traditionnelle riche en acides gras omega-3 et en sélénium, mais contaminée par du mercure et des biphényles polychlorés. *Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada, pp : 49.*
- [81] **Badeau M., 2006.** effets d'un antioxydant, le Tempol, sur les actions métaboliques et vasculaires de l'insuline chez le rat insulino-résistant avec un surplus de poids. *Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada, pp : 48.*
- [82] **De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J., Lekeux P., 2005.** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann. Méd. Vét, 149 : 1-9.*
- [83] **Olive G., 1998.** Synthèse de nouvelles nitrones du type Pyrroline-N-Oxyde et leur utilisation en Spin-Trapping. *Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille III, France, pp : 124.*
- [84] **Soares A F., 2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adipocytes et prostaglandines. *Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées de Lyon, France, pp : 200.*
- [85] **Gueye P M., 2007.** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur-Strasbourg I, France, pp : 64.*
- [86] **Hadi M., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg I, France, pp : 19.*
- [87] **Hancock J T., Desikan R., Neill S J., 2001.** Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical society transactions, 29 : 345-350.*
- [88] **Afonso V., Champy R., Mirovic D., Collin P., Lomri A., 2007.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme, 74 (7) : 636-643.*

- [89] **Goudable J., Favier A., 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr clin Métabol*, 11 : 115-120.
- [90] **Morel Y., Barouki R., 1998.** Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Médecine/science*, 14 : 713-721.
- [91] **Chabaud M., 2007.** Utilisation des antioxydants en hépatologie chez les carnivores domestiques. *Thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, France*, pp : 131.
- [92] **Coulon L., 2004.** Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique des phospholipides plaquettaires. *Thèse de doctorat, Institut national des sciences appliquées de Lyon, France*, pp : 22.
- [93] **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2000.** Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *Mécanismes biochimiques*.
- [94] **Pincemail J., Defraigne J., 2003.** Le coenzyme Q<sub>10</sub> ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Cardio*, 2 : 55-60.
- [95] **Cuvelier C., Dotreppe O., Istasse L., 2003.** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann Méd Vét*, 147 : 315-324.
- [96] **Curtay J., Robin J., 2000.** Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie info*.
- [97] **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne., 2002.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 233-239.
- [98] **Ré D B., Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L., Had-Aissouni L., 2005.** Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate?. Implication sur la survie neuronale. *Annale française d'anesthésie et de réanimation*, 24 : 502-509.
- [99] **Grange L., 2007.** Physiologie de l'arthrose : rôle de la NADPH oxydase NOX 4 dans l'expression de la collagénase, MP-1. *Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier-Grenoble I, France*, pp : 162.
- [100] **Lean M E J., Burns E T J., 2001.,** Tentatives pharmacologiques et nutritionnelles pour corriger le stress oxydatif. *Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu*, pp : 7.
- [101] **Pasquier C., 1995.** Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 276 : 87-92.
- [102] **Flourie F., Arab K., Rossary A., Steghens J P., 2006.** Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation in vitro initiée par le radical °OH. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21 : 229-233.

- [103] Rémita S., 2001. De la péroxydation lipidique radioinduite: les facteurs déterminant l'oxydabilité des lipides. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 79 (2) : 144-153.
- [104] Sarr M., 2004. Modulation de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) en physiopathologie vasculaire : intérêt des stocks mobilisables de NO des antioxydants naturels. *Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur-Strasbourg I, France*, pp : 37.
- [105] Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit*, 10 (6): 141-147.
- [106] Yarsan E., Cakir O., 2006. Effects of dichlorvos on lipid peroxidation in mice on subacute and subchronic periods. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 86: 106-109.
- [107] Shadnia S., Azzi E., Hosseini R., Khoei S., Fouladdel S., Pajaoumand A., Jalali N., Abdollahi M., 2005. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorous insecticide formulators. *Hum.Exp.Toxicol*, 24 : 439-445.
- [108] John S., Kale M., Rathore N., Bhatnagar D., 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12: 500-504.
- [109] Brocardo P S., Pandolfo P., Takahashi R N., Rodrigues A L S., Dafre A L., 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology*, 207: 283-291.
- [110] Lukaszewicz-Hussain A., 2001. Organophosphate insecticide chlorfenvinphos affects superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde in rat liver. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10 (4): 297-282.
- [111] Banerjee B D., Seth V., Bhattacharya A, Pasha S T., Chakraborty A K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107: 33-47.
- [112] Possamai F P., Fortunato J J., Feier G., Agosinho F R., Quevedo J., Wilhelm Filho D., Dal-Pizzol F., 2006. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 198-204.
- [113] Betouille S., 1998. Action du lindane sur l'activité sécrétrice (radicaux libres oxygénés et cytokines à activité « MAF ») des cellules phagocytaires de truites arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : implication du calcium intracellulaire. *Thèse de doctorat, Université de Limoges, France*, pp : 203.
- [114] Barros S B M., Simizu K., Junqueira V B C., 1991. Liver lipid peroxidation-related parameters after short-term administration of Hexachlorocyclohexane isomers to rats. *Toxicol Lett*, 56 : 137-144.



- [115] Gupta R K., Schuh R A., Fiskun G., Flaws J A., 2006. Methoxychlor causes mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the mouse ovary. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216 (3): 436-445.
- [116] Delgado E H B., Streck E L., Quevedo J L., Dal-Pizzol F., 2006. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure. *Neurochemical Research*, 31(8): 1021-1025.
- [117] Bagchi D., Kuszynski C., Balmoori J., Bagchi M., Stohs S., 1998. Hydrogen Peroxide-induced Modulation of Intracellular Oxidized States in cultured Macrophage J774A1 and Neuroactive PC-12 Cells, and Protection by a Novel Grape Seed Proanthocyanidin Extract. *Phytotherapy Research*, 12 : 568-571.
- [118] Hodgson E., Rose R L., Ryu D Y., Falls G., Blake B L., Levi P E., 1995. Pesticides-metabolizing enzymes. *Toxicology letters* 82 (83): 73-81.
- [119] Perret A., Pompon D., 1998. Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b5 rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry*, 37: 11412-11424.
- [120] Desmetz C., 2004. Effets de composés oestrogéniques (Apigénine, Kaempferol et Bisphénol A) sur la cancérogenèse mammaire chimiquement induite chez le rat. *Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Ecole Pratique des Hautes Etudes : Sciences de la vie et de la terre, France, pp : 15.*
- [121] Rico A., 2000. Pollution et pratiques agricoles. Deux concepts : dose journalière admissible et chimiodéfense. *Acad. Sci. Pari, sciences de la vie*, 323 : 435-440.
- [122] Tang J., Rose R Y., Chambers J E., 2006. Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds : 127-143.*
- [123] Timchalk C., 2006. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds : 103-125.*
- [124] Timchalk C., Poet T S., Kousba A A., Campbell J A., Lin Y., 2004. Noninvasive biomonitoring approaches to determine dosimetry and risk following acute chemical exposure: Analysis of lead or organophosphate insecticide in saliva. *J.Toxicol. Environ. Health A*, 67: 635-650.
- [125] Buratti F M., Leoni C., Testai E., 2006. The human metabolism of organophosphorothionate pesticides: consequences for toxicological risk assessment. *J.Verbr.Lebensm*, 2: 37-44.
- [126] Bonvallet N., Dor F., 2004. Insecticides organochlorés aux Antilles: identification des dangers et valeurs toxicologiques de références (VTR). *Institut de veille sanitaire, France, pp : 12,13.*

- [127] Office Nationale de la Météorologie (O.N.M).
- [128] Direction des services agricoles de la wilaya de Jijel.
- [129] Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec., 2005. Mode de prélèvement et de conservation des échantillons relatifs à l'application du règlement sur la qualité de l'eau potable. *Bibliothèque nationale du Québec, canada*, pp : 5.
- [130] Tahboub Y R., Zaater M F., Al-Talla Z A., 2005. Determination of limits of identification of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1098 : 150-155.
- [131] Brondi S H G., Lanças F M., 2005. Development and validation of a multi-residue methodology to determine the presence of selected pesticides in water through liquid chromatography. *J. Braz. Chem. Soc*, 16 (3B): 650-653.
- [132] Vagi M C., Petsas A S., Kostopoulou M N., Lekkas T D., 2001. Sample handling strategies for the trace-level determination of pesticides and their degradation products in environmental matrices: a review. *University of the Aegean, Greece*, pp: 56.
- [133] Granström M., Rosén I., 2004. Comparison of passive and active sampling of polar organic compounds in Nicaraguan water. *Université d'Umea, Swedem*.
- [134] Amalric L., Baran N., Jeannot R., Martin J C., Mouvet C., 2003. Les mécanismes de transfert des produits phytosanitaires du sol vers les nappes et les méthodes d'analyse des produits phytosanitaires dans les eaux. *BRGM/RP-51590-FR*, pp: 51.
- [135] Oufiroz S C N., Lazou K., Sandra P., Jardim I C S F., 2004. Determination of pesticides in water by Liquid Chromatography-(Electrospray Ionisation)-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS). *Pesticidas, R.Ecotoxicol, Melo Ambiente, Curitiba*, 14: 53-60.
- [136] Eickhoff A., Kreuzig R., 2002. The substitution of toxicologically critical solvents in the residue analysis of pesticides. *Royal Society of Chemistry*, pp : 14.
- [137] Kennedy I R., Ahmed N., Beasley H., Chapman J., Hobbs J., Simpson B., Woods N., 1998. Quality assurance in pesticide sampling and analysis. *Land and Water Resources Research and Development Corporation, Canberra*.
- [138] Pihlström T., 2003. Development of enhanced analytical methodology in pesticide chemistry. *Acta Universitatis Upsaliensis*.
- [139] Bouchonnet S., Libong D., 2007. Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Ecole polytechnique 91128 PALAISEAU*.
- [140] Skoog D A., Holler F J., Nieman T A., 1998. Principales of instrumental analysis. 5<sup>th</sup> edition, *Sounders College Publishing*.

- [141] Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Gerard B., Rotig A., Saudubray G M., Munnich A., 1994. Biochemical and biomolecular investigation in the respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 228: 35-51.
- [142] Lowry O H., Rosebrough N J., Farr A L., Randall R J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- [143] Iqbal M., Som D S., Yasumasa O., Masayoshi F., Shigero O., 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in dy male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and Toxicology*, 92: 33-38.
- [144] Zini R., Morin C., Bertelli A A., Tillement J P., 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res*, 25: 87-97.
- [145] Okhawa H., Ohishi N., Yagi K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
- [146] Claiborne A., 1985. Catalase activity. In: CRC handbook of methods for oxygen radical research. Ed Greenwald RA, CRC Press, Boca Raton: 283-284.
- [147] Beauchamp C., Fridovich I., 1971. Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem*, 44: 276-287.
- [148] Ellman G L., 1959. Plasma antioxidants. *Arch Biochem Biophys*, 82: 70-77.
- [149] Cisse I., Fall S T., Badiane M., Diop Y M., Diouf A., 2006. Horticulture et usage des pesticides dans la zone périurbaine des Niayes au Sénégal. *Institut sénégalais de recherches agricoles (Isra)*, pp : 14.
- [150] Hamza M H., Added A., Ben Mammou A., Abdeljaoued S., Rodríguez C R., 2004. Evaluation de la vulnérabilité à la pollution potentielle par les pesticides, de la nappe côtière alluvionnaire de la plaine de Metline-Ras Jebel-Raf Raf, Nord-Est tunisien, selon la méthode DRASTIC appliquée par les systèmes d'information géographique. *Houille blanche*, 5 (4) : 86-94.
- [151] Mouvet C., Baran N., 2005. Contamination des eaux souterraines par les produits phytosanitaires : mécanismes impliqués et concentrations observées. *Géosciences*, 2 : 60-65.
- [152] Grébil G., Novak S., Perrin-Ganier C., Schiavon M., 2003. La dissipation des produits phytosanitaires appliqués au sol. *ENSAIA INRA*, pp : 10.
- [153] EPA, US Environmental Protection Agency., 2002. *EPA 738-R-02-013*.
- [154] Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de santé Canada., 2007. Evaluation préliminaire des risques et de la valeur de l'endosulfan, pp : 130.

- [155] **Gouzy A., Farret R., Le Gall A C., 2005.** Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien : approche par hiérarchisation, *Rapport INERIS n° DRC – 05 – 45936 –95 – AGo.*
- [156] **EPA,US Environmental Protection Agency., 2000.** Reregistration eligibility science chapter for chlorpyrifos. *Faté and environmental risk assessment chapter, pp : 94.*
- [157] **Edialux., 2002.** Fiche de données de sécurité : Nom du produit: EMPIRE 200 INSECTICIDE, *pp : 7.*
- [158] **Traore S K., Mamadou K., Dembele A., Lafrance P., Mazellier P., Houéno P., 2006.** Contamination de l'eau souterraine par les pesticides en régions agricoles en Côte d'Ivoire (centre, sud et sud ouest). *Journal Africain des Sciences de l'Environnement, 1 : 1-9.*
- [159] **Gagné C., 2007.** L'utilisation des pesticides en milieu agricole. *Université du Québec, Rimouski, Canada.*
- [160] **Mahaboob Khan S., Sobti R C., Kataria L., 2005.** Pesticide-induced alteration in mice hepato-oxidative status and protective effects of black tea extract. *Clinica Chimica Acta, 258 : 313-138.*
- [161] **Dwivedi P D., Das M., Khanna S K., 1998.** Role of cytochrome P-450 in Quinalphos toxicity : effects on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology, 36 : 437-444.*
- [162] **Chan P H., 2001.** Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab, 21 : 2-14.*
- [163] **Ho Y SH., Gargano M., Cao J., Bronson R T., Heimler I., Hutz R J., 1998.** Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem, 203 (13) : 7765.*
- [164] **Sohn H Y., Kwon C S., Kwon G S., Lee J B., Kim E., 2004.** Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicology Letters, 151 : 357-365.*
- [165] **Kannan K., Jain S K., 2003.** Oxygen radical generation and endosulfan toxicity in Jurkat T-cells. *Molecular and Cellular Biochemistry, 247 : 1-7.*
- [166] **Laszlo A., Matkovics B., Varge SZ I., Wittman T., Fazekas T., 1991.** Changes in lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of human red blood cells after myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta, 203 (413) : 1-7.*
- [167] **Kono Y., Fridovich I., 1982.** Superoxide radical inhibits catalase. *J.Biol.Chem, 257, 5751.*
- [168] **Paolicchi A., Tongiani R., Tonarelli P., Comforti M., Pompella A., 1997.** Gamma-glutamyl transpeptidase dependent lipid peroxidation in isolated hepatocytes and Hep G2 hepatoma cells. *Free Radic.Biol.Med, 22 : 253-860.*

- [169] Malik J K., Summer K M., 1982. Toxicity and metabolism of malathion and its impurities in isolated rat hepatocytes : role of glutathione. *Toxicol.Appl.Pharmacol*, 66 : 69-76.
- [170] Lechner W D., Rehman Abdel M S., 1986. The effect of carbaryl and malathion in combination of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione-S-alkyl transferase activity in vitro. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 15 : 647-651.
- [171] Kalra J., Mantha S V., Prasad K., 1994. Oxygen free radicals : key factors in clinical diseases. *Lab.Med.Int* : 13-19.
- [172] Gultekin F., Ozturk M., Akdogan M., 2000. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vitro. *Arch. Toxicol*, 74 : 533-538.
- [173] Dorval J., Leblond V S., Hontela A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aqua. Toxicol*, 63 : 229-241.
- [174] Frederick N B., Panemanqalore M., 2003. Exposure to low doses of endosulfan and chlorpyrifos endogenous antioxidant in tissues of rats. *J. Environ. Sci*, 38 : 349-363.
- [175] Dorval J., Hontela A., 2003. Role of glutathione redox cycle catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ). *Toxicol. Appl Pharmacol*, 192 : 191-200.
- [176] Karaoz E., Gultekin F., Akdogan M., Oncu M., Gokecimen A., 2002. Protective role of melatonin and combination of vitamin C and vitamin E on lung toxicity induced by hlorpyrifos-ethyl in rats. *Exp Toxic Pathol*, 54: 97-108.
- [177] Banerjee B D., Seth V., Pasha S T., Chakraborty A K., 1998. Malathion induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Immunologist (suppl.)*, 1 : 496.
- [178] Hazarika A., Sarkar S N., Hajare S., Kataria M., Malik J K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats : a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185 : 1-8.
- [179] Davies K J., 2000. Oxidative stress, antioxidant defense, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50 : 279-289.
- [180] Khrrer J P., 1993. Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Ctit. Rev. Toxicol*, 23 : 21-48.
- [181] Ahmed R S., Seth V., Pasha S T., Banerjee B D., 2000. Influence of dietary (Zingiber officinales Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38 : 443-450.

- [182] Lee A., East J., Balgaug P., 1991. Interactions of insecticides with biological membranes. *Pestic. Sci*, 32 : 317-327.
- [183] Yamano T., Morita S., 1995. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes II. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 28 : 1-7.
- [184] Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E A., 1995. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104 : 129-140.
- [185] Catala M., Cordier S., Delaforge M., Fenaux P., Garnier R., Multigner L., Rico-Lattes I., Vasseur P., 1999. Ethers de glycol : Quels risques pour la santé?. *Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm)*.
- [186] Richardson R J., Moore T B., Kayyali U S., Fowke J H., Randall J C., 1993. Inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase by chlorpyrifos in vivo and kinetics of inhibition by chlorpyrifos oxon in vitro : application to assessment of neuropathic risk. *Fundam. Appl. Toxicol*, 20 : 273-279.
- [187] Amitai G., Moorad D., Adani A., Doctor B P., 1998. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochem. Pharmacol*, 56 : 293-299.
- [188] Goel A., Chauhan D P., Dhawan D K., 2000. Protective effects of zinc in chlorpyrifos induced hepatotoxicity : a biochemical and trace elemental study. *Biol. Trace Elem. Res*, 74 : 171-183.
- [189] Miyazaki Z., Hodgson G C., 2001. Chronic toxicity of dursban and its metabolites, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in chickens. *Toxicol. App. Pharmacol*, 23 : 391-398.
- [190] Goel A., Dani V., Dhawan D K., 2005. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact*, 156 : 131-140.
- [191] Verma R S., Mehta A., Srivastava N., 2007. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress : attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide. Biochemistry and Physiology*, 88 : 191-196.
- [192] Mahaboob Khan S., Kour G., 2007. Subacute oral toxicity of chlorpyrifos and protective effect of green tea extract. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.
- [193] Mutch E., Williams F M., 2006. Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology*, 224 : 22-32.
- [194] Bagchi D., Hassoun E A., Bagch M., stohs S J., 1993. Protective effects of antioxidants against endrin-induced hepatic lipid peroxidation, DNA damage and excretion of urinary lipid metabolites. *Free Rad. Biol. Med*, 15 : 217-222.

- [195] Bagchi M., Hassoun E A., Akubue P., Bagchi D., Stohs S J., 1993. Comparative effects of endrin on hepatic lipid peroxidation and DNA damage, and nitric oxide production by peritoneal macrophage from C57BL/6J and DBA/2 mice. *Comp. Biochem. Physiol*, 105C : 525-529.
- [196] Hassoun E A., Stohs S J., 1996. TCDD, endrin and lindane oxidative stress in foetal and placental tissues of C57BL/6J and BDA/2J mice. *Comp. Biochem. Physiol*, 115C : 11-18.
- [197] Ananya R., Subeena S., Kumar A D., Kumar I D., Kumar S M., 2005. Oxidative stress and histopathological changes in heart following oral lindane (gamma hexachlorohexane) administration in rats. *Med. Sci. Monit*, 11 : 325-329.
- [198] Hincal F., Gurbay A., Giray B., 1995. Induction of lipid peroxidation and alteration of glutathione redox status by endosulfan. *Biol. Trace Elem. Res*, 47 : 321-326.
- [199] Jalili Sh., Ilkhanipour M., Heydari R., Farshid A A., Salehi S., 2007. The effects of vitamin E on endosulfan - induced oxidative stress in rat heart. *Pakistan Journal of Nutrition* 6 (4) : 375-380.
- [200] Kurutas E B., Doran F., Ciralik H., 2006. The effect of endosulfan on lactic dehydrogenase enzyme system in liver of mus musculus : a histochemical study. *Eur. J. Gen. Med*, 3(4) : 148-151.
- [201] Kilchin K T., 1984. An enzymatic approach of biotransformation. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol*, 6 : 303-310.
- [202] Maqvi S M., Vaishnai C., 1993. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp. Biochem. Physiol*, 105 : 347-361.
- [203] Agrawal D., Sultana P., Gupta G S D., 1991. Oxidative damage and changes in the glutathione redox system in erythrocytes from rats treated with hexachlorocyclohexane. *Food and Chemical Toxicology*, 29 : 459-462.
- [204] Almeida M G., Fanini F., Davino S C., Aznar A E., Koch O R., Barros S B M., 1997. Pro and antioxidant parameters in rat liver after short term exposure to hexachlorobenzene. *Human and Experimental Toxicology*, 16 : 257-261.
- [205] El-Sharkawy A M., Abdel Rahman S Z., Hassan A A., Gabr M H., El-Zoghby S M., El-Sewedy S M., 1994. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52 : 505-510.
- [206] Canistro D., Pozzetti L., Sapone A., Broccoli M., Affatato A A., Stradiotti A., Longo V., Menichini P., Barale R., Paolini M., 2007. Perturbation of murine liver cyp-superfamily of isoforms by different combinations of pesticide mixtures. *Food and Chemical Toxicology*.

- [207] Jolas J P., 2004. La question des pesticides. *Académie Lorraine des Sciences, Nancy, France, pp : 83.*
- [208] Jawich D., 2006. Etude de la toxicité de pesticides vis-à-vis de deux genres de levures : approche cinétique et moléculaire. *Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, pp : 165.*
- [209] Marinovich M., Ghilardi F., Galli C L., 1996. Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: Comparison with single pesticides. *Toxicology, 108 : 201-206.*



**Thème : Etude du stress oxydatif secondaire à la contamination potentielle des eaux d'alimentation de la ville de Jijel par les pesticides.**

**Résumé**

Les pesticides figurent parmi les agents chimiques pouvant altérer la qualité des eaux souterraines. A Jijel une forte proportion de la population s'alimente en eau potable de la nappe souterraine située dans la région de Rhedjla, laquelle est caractérisée par une forte production agricole fortement tributaire des produits phytosanitaires. Pour estimer le potentiel de contamination de ces eaux par les résidus pesticides, deux campagnes d'échantillonnage ont été menées, à chaque campagne 12 échantillons d'eau ont été prélevés puis analysés par GC / SM. Les résultats de la deuxième campagne d'échantillonnage ont permis de mettre en évidence une contamination par trois molécules de pesticides qui sont le chlorpyrifos, l' $\alpha$ -endosulfan et le  $\beta$ -endosulfan. Le chlorpyrifos ainsi que l'endosulfan commercial qui contient les deux isomères détectés dans l'eau analysée ont été testés *in vivo* et *in vitro* sur des homogénats et des mitochondries de foie. Les deux pesticides provoquent une peroxydation lipidique intense objectivée par l'augmentation du MDA de manière dose dépendante *in vitro* et *in vivo* dans les groupes traités par les pesticides. Parallèlement, on note une altération des activités catalase et superoxyde dismutase par les fortes concentrations des deux pesticides *in vitro* et chez les rats recevant l'association de deux pesticides *in vivo* associée d'une déplétion du glutathion hépatique.

**Mots clés :** Pesticides, Chlorpyrifos, Endosulfan, Eau potable, Eaux souterraines, Stress oxydant.

**Abstract**

The pesticides appear among the susceptible chemical agents to deteriorate the quality of groundwater. In Jijel a strong proportion of the population feeds out of drinking water from the underground layer located in the area from rhedjla characterized by a strong agricultural production strongly tributary of the pesticides. To estimate the levels of contamination of this water by the pesticides, two sampling campaign were carried out. During each companion 12 samples were collected then analyzed by GC/MS. Results of second companion show a contamination by three molecules of pesticides which are : chlorpyrifos,  $\alpha$ -endosulfan and  $\beta$ -endosulfan. The chlorpyrifos and the commercial endosulfan which contains the two isomers detected in water were tested *in vivo* and *in vitro* on homogenates and mitochondria of the liver. The two pesticides cause an intense lipidic peroxidation objectified by the increase in the MDA in manner dose dependent *in vitro* and *in vivo* in the groups treated by the pesticides. In parallel, a deterioration of the catalase and superoxyde dismutase activities by the strong concentrations of two pesticides *in vitro* and in the rats receiving the association of two pesticides *in vivo* associated by depletion of hepatic glutathion is noted.

**Keywords:** Pesticides, Chlorpyrifos, Endosulfan, Drinking Water, Groundwater, Oxydatif stress.

**الملخص**

تعتبر المبيدات من العوامل الكيميائية القادرة على إفساد نوعية المياه الجوفية. في ولاية جيجل نسبة كبيرة من السكان تتزود بالماء الشروب من الطبقة الجوفية لمنطقة الرجلة التي تتميز بإنتاج فلاحي معتبر و مرتبط باستعمال هذه المبيدات. من أجل تحديد درجة تلوث مياه هذه المنطقة بالمبيدات تم القيام بأخذ عدة عينات من هذه المياه على مرحلتين ثم دراستها بكمبيوتراتو جرافيا الغاز / مطيافية الكتلة. النتائج المحصل عليها لعينات السلسلة الثانية بينت وجود ثلاث مبيدات هي الكلوربيريفوس بالإضافة إلى الأندوسيلفان  $\alpha$  و  $\beta$ . الكلوربيريفوس و الأندوسيلفان التجاري الذي يحتوي على المتماكين الذين تم العثور عليهما في الماء المدروس تمت دراسة قدرتهما على إحداث إجهاد تأكسدي داخل و خارج خلوي على خلايا و ميتوكوندريا الكبد. المبيدين المدروسين سببا أكسدة ليبيدية معتبرة تترجمها ارتفاع نسبة الألدهيد المالوني طرديا مع تركيز المبيدين خارج خلوي و عند الجرذان المعالجة داخل خلوي. موازاة مع ذلك نلاحظ الإضرار بنشاط الكاتالاز و السيرراوكسيد ديسميثاز بالتركيز المرتفعة للمبيدين عند المعاملة خارج خلوي و عند الجرذان المعالجة بخليط المبيدين داخل خلوي بالإضافة إلى انخفاض معتبر في نسبة الغلوتاثيون الكبدي.

**الكلمات المفتاحية:** المبيدات، الكلوربيريفوس، الأندوسيلفان، الماء الشروب، المياه الجوفية، الإجهاد التأكسدي.