

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieure de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى- جيجل

Université Med-Seddik Benyahia- Jijel

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2.3.86

Faculté des sciences de la nature et de le vie

Département des Sciences de l'Environnement

Et des Science Agronomiques



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم علوم المحيط والعلوم الفلاحية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Toxicologie de l'Environnement

Thème

Contribution à l'étude du stress oxydant provoqué par les pesticides chez les souris et exploration de l'effet protecteur de l'extrait brut de *Cladonia foliacea*.

Membres de jury :

Présidente : M^{lle} Khaled khouja S.

Examineur : M^{lle} Benterrouche I.

Encadreur : M^{me} Lemzeri H.

Préparer par :

M^{lle} Boussayoud Kenza

M^{lle} Henieche Nadjat

Session : (Juin2016)

Numéro d'ordre....

Laboratoire ou entreprise ou le travail a été réalisé: laboratoire d'ecotoxicologie, Faculté S.N.V.

Remerciements

Avant de présenter ce modeste travail, nous disons «louange à Allah l'éternel » qui nous a guidés toujours vers le chemin droit durant notre vie surtout dans nos années de formation universitaire.

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribuées à la réalisation de ce travail, particulièrement

*Nos remerciements les plus sincères vont à Mme **Lemzeri** notre encadreur, pour sa bienveillance, ces précieuses conseils et ces encouragements incessants, nous disons à elle merci beaucoup*

Nous tenons à remercier les membres de jury d'avoir consacré du temps pour examiner ce travail

Mlle Benterrouche et Mlle Khaled khouja

Nous exprimons, notre profonde gratitude à nos enseignants, sans oublier de remercier toute l'équipe du laboratoire.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont participé de près et de loin à la réalisation de ce modeste mémoire de fin d'études

Dédicace

A l'aide d'Allah tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A ma chère et regrettée maman, c'est pour toi que j'ai fait ce parcours et je regrette que tu ne sois pas parmi nous en ce moment tant attendu. Tu es dans mon cœur et mon esprit en toute circonstance.

A mon chère père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

A mes sœurs et à mes frères.

A tous mes proches, mes amis, mes camarades.

A tous qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

Nadjat

Dédicace

Je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir donnée la santé, la puissance et la volonté pour, réaliser ce mémoire.

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents qui ont fait de moi ce que je suis

Maintenant :

Pour leurs amoures et leurs sacrifices

A ma grande mère et mon grand père

A mes frères Samir, Hussam, Yasser

A mes sœurs Ibtissam, Houria, Ahlam

A tous la famille Boussayoud surtout Nawal et la famille Boussayad

A mes amis :

Nawal, Nadjet, Lamia, Sabrina, Asma, Karima, Zakja, Siham,

Leyla.

Ainsi que tout les Collègues de ma promotion toxicologie de l'environnement année 2016.

Kenza

Sommaire

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	1

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : Potentielle pharmacologique des lichens

Introduction.....	3
I-1- Généralité sur les lichens.....	3
I-1-1-Constituants des lichens.....	3
I-1-2-Utilisations traditionnelles biomédicales des lichens	4
I-2-Les métabolites lichéniques	4
I-2-1-Les métabolites secondaires.....	4
I-3-Activités biologiques de métabolites secondaires lichénique.....	6
I-3-1-L'activité antioxydante.....	6
I-3-2- L'activité Anti herbivore et anti-Insecticide.....	7
I-3-3- Les activités antibactériennes	7
I-3-4- Activité anticancéreuse.....	8
I-3-5- L'Activité antivirales et antimicrobiennes.....	8

Chapitre II : généralité sur des pesticides

Introduction.....	9
II-1-Définition	9
II-2- Classification des pesticides.....	10
II-2-1-Selon le type d'organisme ciblé.....	10
II-2-1-1- Les insecticides.....	10

II-2-1-2- Les herbicides.....	10
II-2-1-3- Les fongicides.....	10
II-2-2- Selon la structure chimique de la substance majoritaire.....	11
II-2-2-1- Les organophosphoré.....	11
II-2-2-2- Les organochlorés.....	11
II-2-2-3- Les carbamates.....	11

Chapitre III: Impact d'exposition à des mélanges des pesticides

Introduction.....	12
III-1- Dispersion des pesticides dans l'environnement.....	13
III-1-1- Contamination de l'eau.....	14
III-1-2- Contamination du sol.....	14
III-1-3- Contamination de l'Air.....	14
III-2- Voies d'exposition.....	15
III-3- Les possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides.....	15
III-3-1-Exposition professionnelle.....	15
III-3-2- Exposition non professionnelle.....	15

Chapitre IV: l'impact sanitaire des pesticides

IV-1-Toxicologie des pesticides.....	17
IV-2-Les impacts des pesticides sur l'environnement.....	17
IV-3- Impact des pesticides sur la santé.....	17
IV-3-1- Neurotoxicité.....	18
IV-3-2-Effets sur l'immunité.....	18
IV-3-3- Effets sur le système endocrinien.....	19
IV-3-4-Cancer.....	19
IV-3-5-Problèmes respiratoires.....	19
IV-3-6-Impact sur le foie.....	19
IV-4- Mécanisme d'action des pesticides chez les souris et l'homme.....	20

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre V : matériel et méthode

V-1-Matériel.....	22
V-1-1-Matériel biologique.....	22
V-1-2-matérielle végétal.....	22
V-1-3-matériel chimique.....	23
V-1-3-1-choix des pesticides.....	23
V-1-3-2 Fiche toxicologique des pesticides étudiés.....	24
V-2- Méthodes.....	26
V-2-1- préparation de l'extrait méthanolique de <i>Cladonia foliacea</i>	26
V-2-2-Préparation de l'extrait méthanolique de <i>cétrelia olivetorum</i>	28
V-2-3- Etude phytochimique d'activité biologique.....	28
V-2-3-1- Dosage des polyphénols totaux.....	28
V-3-3- Dosage des flavonoïdes.....	29
V-2-3-3- Dosage des polyphénols polaire.....	30
V-2.3.4. Détermination des polyphénols apolaires.....	31
V-2-3-5- Dosage des tannins.....	32
V-2-3-6- Test d'activité antioxydante.....	33
V-2-3-7-Le pouvoir réducteur des composés phénoliques (Reducing Power Assay).....	33
V-3. Etude in vivo : Essais de toxicité aigüe	33
V-3-1-Protocol expérimental des souris.....	33
V-3-2-Préparation des solutions.....	35
V-3-3-Les solutions de l'extrait de <i>Cladonia foliacea</i>	35
V-3-4-Solutions de la mixture des pesticides.....	35
V-3-2- Sacrifice et prélèvements des échantillons.....	36
V-4-Dosage des protéines.....	37
V-5-Dosage des paramètres du stress oxydant	38

V-5.1.Préparation de l'homogénat	38
V-5.2. Dosage du glutathion.....	38
V-5.3.Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	39
V-5.4.Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	40
V-5.5.Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px).....	40
V-6 .Evaluation statistique	42

Chapitre VI : résultat et discussions

VI-I- Etude phytochimique et activité biologique.....	43
VI-I.1-Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins.....	43
VI-I-2- Evaluation des Activités biologiques.....	44
VI-I-2-1- Activité antioxydante.....	44
VI-I-2-1-Effet de piégeage du radical DPPH•.....	44
VI-2.2-Test Evaluation le pouvoir réducteur.....	47
VI-III-Etude toxicologique.....	49
VI-II-1 Influence du traitement sur les paramètres du stress oxydant au niveau du foie.....	49
VI--Discussions de la partie phytochimique.....	53
VI—Discussions de la partie étude toxicologique.....	55
Conclusion.....	58

Références bibliographiques.

Annexes.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes de métabolites secondaires dans lichens.....	5
Tableau 2 : Quelques classes des polyphénols.....	6
Tableau 3 : Les pesticides les plus utilisés dans la wilaya de Jijel.....	24
Tableau 4 : caractéristique et effets toxicologique des pesticides.....	24
Tableau 5 : Protocole expérimental (test Folin-Ciocalteu).....	29
Tableau 6 : Protocole expérimental (test chlorure d'aluminium).....	30
Tableau 7 : Protocole expérimental (test carbonate sodium).....	31
Tableau 8 : Protocole expérimentale (test de BSA).....	32
Tableau 9 : différentes concentration des pesticides solubilisés dans l'eau saline 0,9%.....	35
Tableaux 10 : Protocole expérimental (test H ₂ O ₂).....	39
Tableau 11 : les composé phénolique de <i>Cladonia Foliacea</i> et <i>Cétrélia olivetorum</i>	43
Tableau 12 : concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH des extraits bruts de <i>Cladonia Foliacea</i> et <i>Cétrilia Olivetorum</i> et de l'acide ascorbique.....	46
Tableau 13 : concentration réductrice CR _{0,5} des extraits bruts de <i>Cladonia Foliacea</i> et <i>Cétrilia Olivetorum</i>	48
Tableau14 : du taux de GSH, Catalase, GPX, MDA dans le foie des souris témoins et les souris traités après 7 jours de traitement.....	50

Liste des figures

Figure 1 : Coupe verticale à travers le corps d'un lichen	3
Figure 2 : Schéma simplifié reprenant les principaux types d'actions combinées utilisés pour l'étude des mélanges de composés chimiques.....	12
Figure 3 : Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement.....	14
Figure 4 : Interactions possibles lors de multi-expositions.....	16
Figure 5 : Processus de détoxification et de biotransformation des xénobiotiques.....	21
Figure 6 :Image satellitaire d'Oued Azarez.....	23
Figure 7 :Image satellitaire Boumlih.....	23
Figure 8 :Etapas de Préparation de l'extrait méthanolique de <i>Cladonia foliacea</i>	27
Figure 9 : Etape de préparation de l'extrait méthanolique de <i>Cétrelia olivetorum</i>	28
Figure10 : Organigramme des différentes étapes du Protocole expérimental utilisé.....	37
Figure 11 : teneur en polyphénols, des deux extraits lichénique.....	44
Figure 12 : réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	44
Figure 13 : Activité antiradicalaire des extraits méthanolique respectivement de deux empèse lichénique étudiées en comparaison avec l'acide ascorbique.....	45
Figure 14 : valeur de IC50 de nos extraits méthanolique avec l'acide ascorbique.....	46
Figure 15 : Activité antiradicalaire des pouvoir réducteur des extraits méthanolique respectivement de deux espèce lichénique étudiées en comparaison avec l'acide ascorbique	47
Figure 16 : valeur de CR50 de nos extraits méthanolique et de l'acide ascorbique.....	48
Figure 17 : Variation du taux de GSH (μ mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traités après 7 jours de traitement.....	51

Figure 18 : Variation du taux de la catalase (μ mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traités après 7 jours de traitement.....51

Figure 19 : Variation du taux de la GPX (μ mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traités après 7 jours de traitement.....52

Figure 20 : Variation du taux de MDA (n mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traités après 7 jours de traitement.....52

Liste des abréviations :

ACASC : Acide ascorbique

Ache : acétylcholinestérase

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

CE: cholestérol ester

CET : *Cétrelia sp.*

CF : *Cladonia foliacea*

CHLO : Chlorpyrifos

CL50 : concentration létale 50

CMI : concentration Minimale Inhibitrice

[] : Concentration

CuSO₄ : sulfate de cuivre

DJA : dose journalière administré

DL50 : dose létale 50

DO : densité optique

DPPH : radical 2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl

DSE : dose sans effet

EB : extrait Brut

FeCl₃ : Trichloro acétique

Flavo : flavonoïde

GPx : la glutathion peroxydase

GSH : glutathion

GST : la catalase

IC₅₀ : concentration inhibitrice.

K₃Fe(CN)₆ : ferricyanure de potassium

LS100 : lichen sans mixture de dose 100 milligramme par millilitre.

LS200 : lichen sans mixture de dose 200 milligramme par millilitre.

LS5 : lichen sans mixture de dose 5 milligramme par millilitre.

LS50 : lichen sans mixture de dose 50 milligramme par millilitre.

L+MIX 5 : lichen+ mixture de dose 5 milligramme par millilitre.

L+MIX50 : lichen+ mixture de dose 50 milligramme par millilitre.

L+MIX100 : lichen+ mixture de dose 100 milligramme par millilitre.

L+MIX200 : lichen+ mixture de dose 200 milligramme par millilitre.

MANCOS : mancozèbe

MDA : Malondialdéhyde

mgEAG/g : milligramme équivalent acide gallique par gramme

mgEAQ/g : milligramme équivalent Quercétine par gramme

mgEAT/g : milligramme équivalent acide tannique Par gramme

MIXT: mixture

Na₂CO₃: carbonate sodium

PAP : polyphénol apolaire

PP : polyphénol polaire

PT : polyphénol totaux

T : témoin

Introduction

C'est dans les années 40 que les premiers pesticides de synthèse sont apparus sur le marché, avec des résultats très positifs quant à l'augmentation des rendements agricoles. Vingt ans plus tard, les premières accusations d'atteinte à la santé des gens et à l'environnement se firent entendre (**Carson, 1962**). Le débat sur les risques encourus et les bénéfices recueillis de la lutte chimique s'est prolongé depuis et de très nombreux travaux de recherche sont alors consacrés pour mieux connaître l'impact des pesticides sur l'environnement. Il est estimé que 2,5 millions de tonnes de pesticides sont appliqués chaque année sur les cultures de la planète. La part qui entre en contact avec les organismes indésirables cibles - ou qu'ils ingèrent - est minime. La plupart des chercheurs l'évaluent à moins de 0,3%, ce qui veut dire que 99,7% des substances déversées s'en vont «ailleurs» (**Pimentel, 1995**).

L'étude de l'action combinée des substances chimiques dans un mélange est un sujet complexe. Toutefois, la prise en compte du risque relatif aux mélanges chimiques n'est pas récente. En effet, les premières notions d'effets associés à plusieurs substances chimiques sont apparues à la fin du 19ème siècle -début du 20ème avec notamment les travaux de **Loewe et Muischnek (1926) ou Bliss (1939)** qui posent les premières théories sur les interactions toxicologiques. Les pesticides restent des substances à grand usage malgré leur danger énorme sur la santé humaine et environnementale. Pour cela plusieurs chercheurs pensent à trouver des solutions alternatives et d'autres est ayant à atténuer leur toxicité afin de préserver la santé humaine en utilisant des molécules bioactives.

Des études récentes indiquent que l'exposition aux pesticides, favorise la production des radicaux libres toxiques et expose l'organisme à un stress oxydatif évident (**Hamzaoui, 2009**). Malgré le grand nombre de produits naturels qui sont actuellement consommées comme agents anti - oxydants, les recherches de nouvelles entités chimiques à activité antioxydante reste encore un domaine en plein essor. Dans ce contexte, les lichens ont joué un rôle important en tant que source de nouveaux agents anti - oxydants. Les lichens ont été utilisés dans la médecine populaire pour de nombreuses fins : comme astringents, laxatifs, anticonvulsivants, antiémétiques, anti - asthmatiques, anti-inflammatoires, antibiotiques, pour le traitement des maladies cardiovasculaires, respiratoires et des troubles gastriques. (**Shukla, 2010**).

Notre problématique de recherche consiste à démontrer la toxicité d'un mélange de trois pesticides chez les souris avec des doses admissibles suivit d'une exploration d'un éventuel effet protecteur de l'extrait brut de *Cladonia foliacea*, un lichen terricole foliacé.

Pour répondre à cette problématique une étude bibliographique était consacrée à la démonstration de l'impact des pesticides et surtout leurs mélanges. Ainsi qu' une synthèse à concernant le potentiel pharmacologique des lichens.

Dans le même but une expérimentation était menée et des protocoles expérimentaux adoptés dans le souci de bien ciblé les biomarqueurs toxicologiques et biochimiques qui nous permettent de comprendre la réalité toxique des mélanges et la nature des molécules bioactives de *Cladonia foliacea* par comparaison à *Cétrelia olivetorum* un autre lichen épiphyte.

Introduction :

Les lichens sont l'une des rares espèces à survivre dans des milieux extrêmes. Dans l'espace, ils ont même réussi à se développer face à la pleine puissance du soleil pendant 18 mois. Le lichen résulte d'une symbiose entre un champignon et une algue (ou une cyanobactérie) qui en font un organisme très résistant. De cette remarquable résistance est née l'idée d'évaluer les capacités photoprotectrices des lichens. Ces propriétés ont été reliées aux molécules synthétisées par le thalle lichénique : les métabolites secondaires. L'étude de ces métabolites a conduit à la révélation de plusieurs activités : filtre solaire, antioxydant et pro pigmentant. Ces activités élargiraient le champ des possibilités d'utilisation des lichens. Ils sont en effet connus pour diverses applications comme pigment en teinturerie, fixateur en parfumerie, antimicrobien en médecine traditionnelle ou en encore marqueur biologique de la pollution atmosphérique. (Boustie, 2013)

1. Généralité sur les lichens

1.1 Constituants des lichens

Au sein du lichen, le champignon joue un rôle important dans la morphologie et assure la reproduction sexuée, par la production de spores. Près de 18 500 espèces de lichens sont décrites (Feuerer et Hawksworth, 2007) et dans 99 % des cas, le mycobionte fait partie des ascomycètes ; le lichen est alors appelé ascolichen. Les spores internes sont formées dans des asques et sont libérées par rupture du sommet de l'asque ou par désintégration de la paroi. Lorsqu'il s'agit d'un basidiomycète, le lichen est nommé basidiolichen et les spores sont formées à l'extérieur de - cellules fertiles appelées basides. Le photobionte apporte, par le biais de la photosynthèse, la matière organique. (Van Haluwyn et al., 2009).

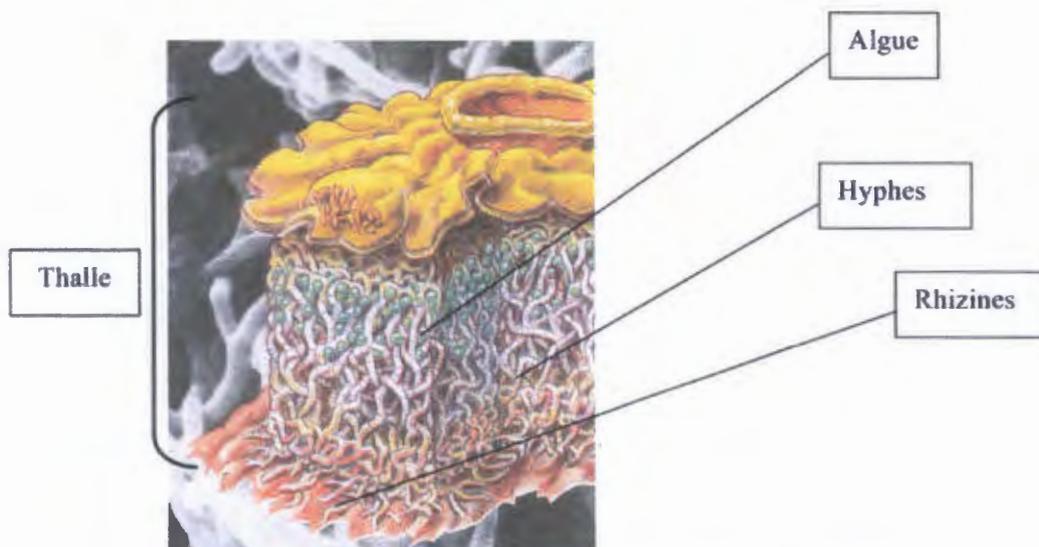


Figure 1 : Coupe verticale à travers le corps d'un lichen. (Anne., 2003)

1.2. Utilisations traditionnelles biomédicales des lichens :

Avec d'autres applications, l'utilisation la plus importante de substances de lichen dérivés est dans les médecines traditionnelles pour le traitement des maladies humaines et animales. Diverses espèces de lichens du genre *Usnea* sont largement utilisées comme analésique (Pour le soulagement de la douleur) dans différents pays d'Asie, en Europe et en Afrique. (Okuyama et al., 1995; Mitrovic et al., 2011) *Usnea densirostris* Taylor a été utilisé pour le traitement de nombreux troubles de santé médicaments folkloriques argentines (Correche et al., 1989). Espèces de lichen du genre *Parmelia* et *Umbilicaria* sont utilisés pour le traitement de nombreux troubles de la santé tels que les infections, diarrhée, maladies de la peau, l'épilepsie, les convulsions, les remèdes crâniens, et comme purgatif dans le système médical chilien. *Ramalina sp* (Ach.) (Nyl.) est utilisé en Finlande pour soigner les blessures dans le pied d'athlète, diverses maladies de la peau, maux de gorge et les maux de dents. *Cetraria islandica* (L.) Ach. Est connue en tant que remède de toux depuis les temps anciens. (Muller et al., 2001).

2. les métabolites lichéniques :

Les lichens produisent une large variété de composés organiques divisés en deux groupes principaux : les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Les métabolites primaires regroupent les protéines, les lipides, les polyols, les polysaccharides, les pigments (chlorophylles, xanthophylles, carotènes...) et autres composés organiques intervenant dans le métabolisme et la structure des lichens (Podterob, 2008 ; Mitrovic et al., 2011) ; ils sont produits par le champignon et le photobionte (algue verte ou cyanobactérie). Ils ne sont pas spécifiques aux lichens et sont également retrouvés chez les champignons, les algues et plantes supérieures. Les polysaccharides, en particulier, ont fait l'objet d'études démontrant leurs activités biologiques, notamment antitumorale, immunostimulante et antivirale (Olafsdottir et Ingólfssdóttir, 2001 ; Omarsdottir et al., 2007) Ils sont produits en grande quantité dans les lichens et sont principalement des α - ou β -glucanes linéaires ou peu substitués, des galactomannanes, des galactoglucomannanes, et des hétéroglycane complexes (Stocker-Wörgötter et al., 2013)

2.1 les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés non structuraux localisés dans certaines parties des végétaux. Généralement de faibles poids moléculaires, leurs structures très variables dérivent des métabolites primaires. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant leur rôle

(Whittaker et al.,1971 ; Muller,1980). Ils ne semblent pas essentiels à la croissance végétale, mais peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes de défense contre les agressions extérieures (Fahselt, 1994 ; Stead et al., 1998) Notamment, certains métabolites tels que les anthraquinones, pourraient agir comme pigments accessoires, permettant en condition de faible luminosité de capter l'énergie solaire ou à l'opposé, de protéger l'organisme contre les effets nocifs induits par les radiations solaires (Fahselt, 1994). Outre leur rôle comme agents protecteurs contre les stress physiques, les métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes de défense dirigés contre divers organismes, par exemple, les terpènes et les dibenzofuranes possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques. (Ouzilleau et al.,1975).

Les composés phénolique de ce groupe important de métabolites secondaires végétaux se reconnaissent à la présence d'un ou de plusieurs groupe hydroxyle, modifiés ou non, attaché à une structure aromatique. Souvent, les composés phénoliques se présentent liés à des glucosides, surtout lorsqu'ils sont en solution dans le suc vacuolaire. Les organismes disposent de plusieurs voies réactionnelles pour synthétiser les cycles aromatiques des composés phénoliques.(Gerhard, 1988).

Les principales classes de métabolites secondaires lichéniques sont énumérées dans le (tableau 1) selon leur origine biosynthétique avec un nombre approximatif des composés connus.

Tableau 1: Classes de métabolites secondaires chez les lichens (Huneck et al., 1996)

Voie de biosynthèse	Type de composé	Nombre de composés
Voie des acétates polymalonates	Acide aliphatiques, esters et dérivés	56
	Monoaromatique phénoliques	32
	Depsides, tridepsides et benzyl esters	207
	Depsidones et diphényléthers	131
	Depsones	8
	Dibenzofuranes, acide usnique et dérivés	29
	Anthraquinones et dérivés	52
	Chromones et Chromanes	13
	Naphthaquinones et bis-Naphthaquinones	10
	Xanthones et bis-Xanthones	78
Voie des mévalonates	Di-, sesquiter-, et tri-terpènes	88
	Stéroïdes	33
Voie de l'acide shikimique	Terphénylquinones	2
	Dérivés de l'acide pulvinique	13

❖ Structure et catégories des composés phénoliques :

Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plus de substituant hydroxylé. Ce dernier conduit les composés phénoliques simples à se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés ; malgré la grande diversité structurale, ce groupe est connu sous le nom : Polyphénols. La plupart des composés phénoliques

sont présents conjugués avec un mono ou polysaccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénols, ça peut être aussi des dérivations fonctionnelles comme des esters et des méthyles esters.

Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes comme le montre le (tableau 2).

Tableau 2 : Quelques classes des polyphénols. (Macheix,2006)

Classe	Structure
Phénols simples, benzoquinones	C_6
acide hydroxybenzoïque	C_6-C_1
acéthophénones, acide phénylacétique	C_6-C_2
acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones)	C_6-C_3
flavonoïdes, isoflavonoïdes	$C_6-C_3-C_6$
lignanes, néolignanes	$(C_6-C_3)_2$
biflavonoïdes	$(C_6-C_3-C_6)_2$
tannins condensés (proanthocyanidines, ou flavolans)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

4. activités biologiques de métabolites secondaires lichénique:

4.1.L'activité antioxydante

Les antioxydants sont l'ensemble de molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dis mutant ces espèces, en les piégeant pour former des composés stables, en séquestrant le fer libre, ou en générant du glutathion (Favier, 2003 ; Dan, 2008).

Les radicaux libres jouent un rôle important dans de nombreux processus chimiques dans les cellules, mais ils sont également associés à des effets secondaires indésirables, ce qui provoque des dommages cellulaires. Comme antioxydants synthétiques sont souvent cancérigènes, trouver des substituts naturels est d'un grand intérêt. Les lichens se sont révélés contenir une variété de substances secondaires, qui sont des composés antioxydants forts. Les conditions extrêmes de l'Antarctique augmentent le stress oxydatif, par conséquent, les lichens antarctiques contiennent de plus grandes quantités de substances antioxydantes et ont une activité antioxydante plus élevée que les lichens tropicaux ou tempérées. (Katalin et al., 2010).

L'activité antioxydante regroupe différents modes d'action tels que la capacité à piéger les radicaux libres pouvant être engagés dans la peroxydation lipidique, et l'aptitude à réduire des métaux impliqués dans des réactions générant des radicaux. Les résultats reportés dans la littérature concernant l'acide usnique sont contradictoires. Selon certaines études, il est actif en termes de piégeage des radicaux libres et d'inhibition de la peroxydation lipidique (Susithra et al., 2011 ;

Behera et al, 2012 ; Verma et al, 2012). L'activité antioxydante l'acide usnique serait en partie responsable de son effet gastroprotecteur chez le rat et limiterait les dommages oxydatifs liés aux désordres neurodégénératifs associés aux maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Amo de Paz et al, 2010). Selon une autre étude, son activité sur la peroxydation lipidique et vis-à-vis des radicaux DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et hydroxyle serait faible (Kumar et Müller, 1999). D'autres travaux ont mis en évidence une activité sur les radicaux oxyde nitrique et superoxyde mais une absence d'activité sur le DPPH (Thadhani et al, 2011 ; Brisdelli et al, 2013).

4.2. L'activité Anti herbivore et anti-Insecticide:

De manière générale, les lichens sont peu consommés par les herbivores, certainement du fait de leur faible valeur nutritionnelle et de la rareté de cette ressource. Néanmoins, dans plusieurs situations écologiques, les lichens constituent une ressource considérable pour les herbivores. Par exemple, dans les régions boréales de l'Hémisphère Nord, le lichen *Cladonia rangiferina* est la nourriture principale des rennes en hiver. Bien que les lichens soient peu nourrissants car pauvres en protéines, ils représentent une source de glucides facilement accessible lorsque le feuillage des plantes supérieures n'est pas disponible. Les rennes ne consomment généralement pas les lichens contenant les acides fumarprotocétrarique, diffractaique, physodique, physodalique et salazinique (Rundel, 1978) ; cependant, des études récentes ont mis en évidence la présence, dans leur rumen, de souches bactériennes résistantes aux acides fumarprotocétrarique, lobarique et usnique. Ces microorganismes seraient capables de croître en présence de concentrations importantes en acide usnique (Jusqu'à 40 mg/ml) et cette tolérance est considérée comme une adaptation aux interactions entre rennes et lichens pendant des millions d'années (Sunds et al, 2010 ; Glad et al, 2014)

4.3. Les activités antibactériennes

Face au développement de formes résistantes de bactéries vis-à-vis des traitements antibactériens conventionnels, les métabolites lichéniques sont étudiés comme alternatives. En effet, plus de 50 % des lichens possèderaient une activité antibiotique et représenteraient donc une source importante de nouveaux composés bioactifs (Zambare et Christopher, 2012).

Historiquement, l'activité antibactérienne d'extraits lichéniques est reportée pour la première fois par Burkholder ; sur 42 espèces de lichens testées, en particulier des *Cladonia*, 27 se sont révélées actives contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Burkholder et al, 1944). Plus généralement dans la littérature, les activités antibactériennes des extraits de lichens varient en

fonction des solvants utilisés pour les extractions ainsi que des bactéries testées et notamment de la composition de leur membrane, différente chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les premières sont généralement plus sensibles à l'activité antibiotique des métabolites lichéniques que les secondes (Rowe et al., 1989). Les bactéries à Gram positif des genres *Bacillus* et *Staphylococcus*, et les bactéries à Gram négatif des genres *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Klebsiella* sont les plus couramment étudiées. Des tests sont également réalisés sur les bactéries du genre *Mycobacterium*. L'acide usnique est le composé lichénique le plus largement étudié et, de manière générale, l'activité antibactérienne de ses deux isomères (+) et (-) sont similaires sur les bactéries à Gram positif et sur les mycobactéries. (Lauterwein et al., 1995).

4.3. Activité anticancéreuse

Certains métabolites présentent une activité antiproliférative et cytotoxique vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines et murines. De manière générale, les mécanismes d'action sur les cellules cancéreuses incluent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la nécrose et l'inhibition de l'angiogénèse (Shrestha et St Clair, 2013). L'acide (+)-usnique possède une activité antiproliférative sur de nombreuses lignées de cellules cancéreuses, telles que des cellules leucémiques, de mélanomes, d'adénocarcinomes, d'hépatoblastomes (Cardarelli et al., 1997 ; Koparal et al., 2006 ; Bazin et al., 2008 ; Burlando et al., 2009 ; Bessadottir et al., 2012 ; Brisdelli et al., 2013 ; Gardini et al., 2013). L'activité de l'acide (-)-usnique sur différents types de cellules cancéreuses est également décrite dans la littérature. (Kupchan et Kopperman, 1975 ; Bézin et al., 2004). Selon une étude effectuée sur des cellules de carcinome de poumons humains, l'administration de nanocapsules contenant de l'acide usnique permettrait d'améliorer la biodisponibilité de ce composé et de diminuer son hépatotoxicité (Santos et al., 2005).

4.4. L'Activité antivirales et antimicrobiennes :

De nombreuses espèces de lichens ont des activités antivirales et microbiennes. Ces activités sont attribuées à des substances lichéniques, dont la plupart ont un caractère acide. Des études ont révélé la structure de plus de 300 métabolites lichéniques et de ceux-ci, l'acide protolichesterinique, pulvinique, l'acide physodique, l'acide lobarique, fumarprotocetrarique et l'acide usnique se sont révélés être les substances antimicrobiennes les plus puissantes. (Ingolfssdottir et al., 1992 ; Huneck, 1999).

Introduction

Avant l'avènement des produits phytosanitaires, les systèmes de culture étaient conçus pour assurer le meilleur compromis entre risque phytosanitaire et potentiel de production de la culture. Progressivement, l'acquisition des connaissances sur les besoins d'une culture en éléments minéraux et la maîtrise de la fertilisation, le développement après la seconde guerre mondiale « des herbicides qui permettaient de supprimer la concurrence des adventices, et des insecticides qui permettaient », de s'affranchir des dégâts d'insectes puis, à partir de 1970, le développement des premiers fongicides de synthèse utilisés en végétation pour protéger les plantes contre les maladies ont profondément modifié les systèmes de culture. (Aubertot et al., 2005)

Durant le 19^{ème} siècle, l'utilisation de composés organiques et de composés soufrés, comme les polysulfures de calcium sont cités. Avant même 1900, des pesticides organiques étaient synthétisés et certains sont même encore utilisés aujourd'hui comme le 4,6-dinitro-o-crésol (Bliefert et Perraud, 2001). A l'heure actuelle, la France est le 3^{ème} consommateur mondial de pesticides (à plus de 90% pour l'agriculture) et le 1^{er} utilisateur en Europe en volume total (34% des consommations de l'Europe). Trois pays, la France, l'Italie et l'Espagne, représentent à eux seuls près des deux tiers des utilisations. (Habib el azzouzi, 2013)

1. Définition :

Le terme de pesticide dérive de "Pest", mot anglais désignant tout organisme vivant (virus, bactéries, champignons, herbes, vers, mollusques, insectes, rongeurs, mammifères, oiseaux) susceptible d'être nuisible à l'homme et/ou à son environnement. Les pesticides, dont la traduction étymologique est "tueurs de fléaux" sont des molécules dont les propriétés toxiques permettent de lutter contre les organismes nuisibles.

Selon la définition de la FAO, un pesticide est "une substance utilisée pour neutraliser ou détruire un ravageur, un vecteur de maladie humaine ou animale, une espèce végétale ou animale nocive ou gênante au cours de la production ou de l'entreposage de produits agricoles. Les pesticides, encore appelés produits phytopharmaceutiques sont donc toutes les substances chimiques naturelles ou de synthèse utilisées en agriculture pour contrôler les différentes sortes de nuisibles (pestes)(maladies, ravageurs et mauvaises herbes). (Alain, 2000).

Les pesticides sont, par définition, des produits dangereux. En effet, ce terme désigne l'ensemble des produits chimiques, naturels ou de synthèse, ayant pour but de repousser ou détruire les nuisibles, qu'il s'agisse de microbes, d'animaux ou de végétaux, durant la production, le stockage ou la commercialisation de produits agricoles, de denrées alimentaires, ou de bois. Ils

servent également à combattre les différents vecteurs de maladies humaines ou animales. (Nicole, 2013)

2. Classification des pesticides :

Les pesticides peuvent être classés selon plusieurs critères : la cible, la structure chimique, le mode de pénétration dans le ravageur, le degré de toxicité ... etc

2.1. Selon le type d'organisme ciblé :

2.1.1. Les insecticides :

Les insecticides sont des produits phytosanitaires destinés à détruire les insectes (tel que les moustiques et les mouches piqueuses), leurs larves ou leurs œufs. La plus part de ces substances sont des neurotoxiques qui agissent principalement par perturbation de la transmission de l'influx nerveux des insectes, comme ils peuvent agir aussi en empêchant leur mue. (Boseret, 2000)

Les insecticides sont des substances qui permettent l'élimination des arthropodes. Ils peuvent être utilisés contre les larves et/ou les œufs (larvicides) ou encore contre les adultes. Ils doivent être nocifs vis à vis des insectes ravageurs mais aussi relativement inoffensifs pour les organismes non cibles. (Fanny, 2013)

2.1.2. Les herbicides :

Un produit herbicide ou dés herbant est une substance active ou ayant la propriété de tuer ou de limiter la croissance des mauvaises herbes. Ils contrôlent les plantes :

- ❖ En inhibant leur photosynthèse,
- ❖ En inhibant la synthèse des acides aminés,
- ❖ En dérégulant les pH entre les différents compartiments cellulaires. (Frank, 1992 ; Boseret, 2000).

2.1.3. Les fongicides :

Les fongicides sont des substances phytopharmaceutiques ayant la capacité de tuer ou d'inhiber le développement parasites des végétaux. Ils peuvent être utilisés à titre préventif en empêchant le développement des spores à la surface de la plante ou à titre curatif en stoppant le développement du champignon déjà installé dans la plante (Frank, 1992).

2.2. Selon la structure chimique de la substance majoritaire :

2.2.1. Les organophosphoré :

Les organochlorés sont des pesticides organiques de synthèse à base de chlore. Ils ont connu une forte utilisation en agriculture des années 1940 aux années 1960. A cette période, les conséquences sanitaires et environnementales de leur caractère particulièrement persistant et de leurs propriétés de bioaccumulation ont été mises en évidence, conduisant à leur interdiction et leur retrait progressif. Cette classe de pesticides comprend le DDT, premier insecticide moderne utilisé aussi bien en agriculture que dans la lutte contre certaines épidémies (paludisme, typhus).

(Bonnefoy, 2013).

2.2.2. Les organochlorés :

Sont des organismes préparés par chloration d'hydrocarbure aromatique. Ces molécule sont caractérisé par une forte rémanence temporelle et une faible spécificité. La pus part des organochlorés sont de très haute toxicité ne sont en théorie plus employés, ces produits provoquent une hépatomégalie avec induction adaptative des enzymes du réticulum lisse hépatique et sont transformés en époxydes très réactifs vis-à-vis des molécules protéiques et des acides nucléiques.

(Descotes et al., 1992)

2.2.3. Les carbamates :

Ce sont des esters de l'acide N-méthyl carbamique. Ils agissent aussi en inhibant l'Ache, mais leurs effets sur l'enzyme sont beaucoup plus facilement réversibles que ceux des organophosphorés. Parmi les insecticides de cette famille, on peut citer le carbaryle, l'aldicarbe, le carbofuran, le méthomyle et le propoxur, les signes de toxicité apparaissent plus rapidement et il y a un écart plus grand entre les doses fatales et celles qui causent des effets mineurs pour les carbamates que pour les organophosphorés ; pour cette raison, en termes de toxicité aiguë, les carbamates sont des produits plus sûrs que les organophosphorés.**(Frank, 1992)**

Introduction

L'Homme est continuellement exposé à des mélanges de substances chimiques. Cependant, historiquement les risques ne sont évalués que pour des composés seuls. Si la réglementation exige parfois que les effets des mélanges soient caractérisés, ce n'est pas le cas général. Pourtant, cela reste un sujet majeur de préoccupation pour les réglementaires ou la population générale. La présente étude fait un état de l'art sur les effets sanitaires et environnementaux des mélanges. Elle présente également les différentes méthodologies d'évaluation des risques sanitaires et écologiques. **(Ribera, et al ;2011)**

L'exposition aux pesticides peut se produire directement dans le cadre de leur fabrication ou de leurs utilisations professionnelles ou domestiques, mais aussi indirectement par l'air, le contact de surfaces contaminées ou la consommation des eaux et denrées alimentaires. Selon les circonstances, ce sont soit des populations professionnellement exposées, soit la population générale qui sera concernées. **(Isabelle, 2013)**

Dès le milieu du 20^{ème} siècle, découlant des premières études sur les actions combinées de mélanges chimiques, la communauté scientifique s'accorde sur l'existence de deux mécanismes distincts : l'interaction et la non-interaction.

Le concept de non-interaction a été défini comme l'additivité, pour laquelle deux modèles fondamentaux différents coexistent. Le premier prédit que la réponse à un mélange de composés peut être modélisée par l'addition des concentrations de chaque substance du mélange qui sont alors considérées comme des concentrations ou des dilutions d'un même composé **(Loewe et Muischnek ,1926; Berenbaum ,1981)**.

Ce concept est généralement appelé «additivité des concentrations». Ce type d'action a servi de base pour l'élaboration des facteurs d'équivalence toxique (TEF) **(Mumtaz et al, 1994)**. Le second modèle, appelé « additivité des réponses », est basé sur l'indépendance des composés du mélange telle que la toxicité d'une substance (et la courbe dose-effet correspondante) n'est pas affectée par les autres composés du mélange **(Bliss, 1939)**.

L'addition des concentrations a été associée à des mélanges de composés chimiques ayant le même mécanisme d'action tandis que l'addition des réponses a été quant à elle associée à des composés ayant des mécanismes d'action différents. Le concept d'interaction comprend tous les autres cas où les effets d'un mélange chimique est différent des deux premiers types d'action. Il en résulte soit un effet supérieur (synergisme), soit un effet inférieur (antagonisme) comparé à celui que l'on attendait sur la base de l'additivité simple **(Casse et al, 1998)**.

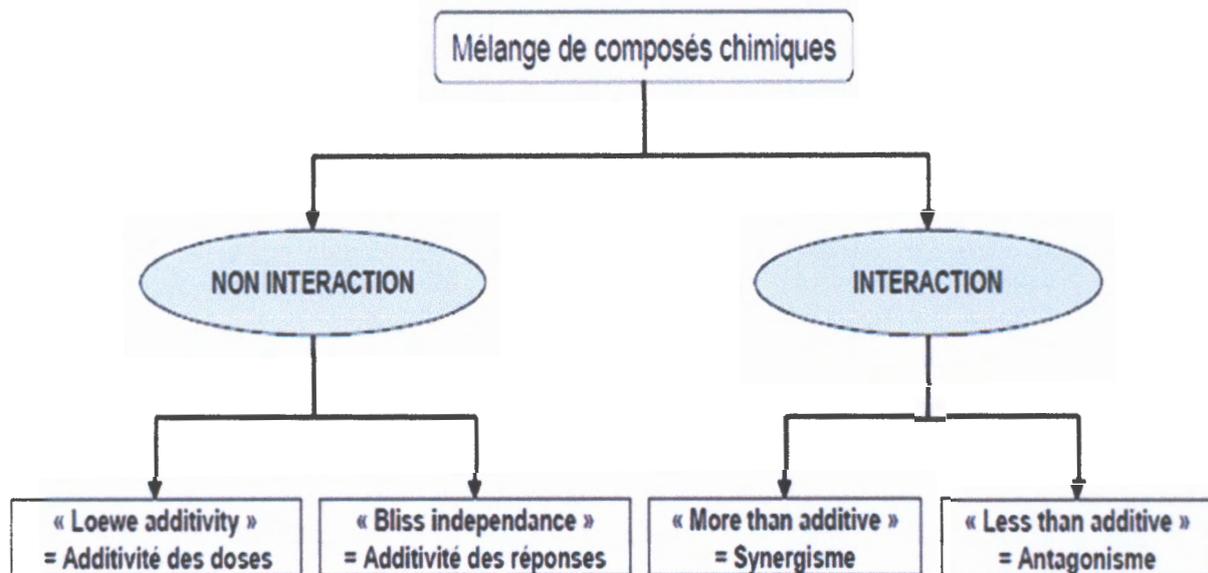


Figure 2 : Schéma simplifié reprenant les principaux types d'actions combinées utilisés pour l'étude des mélanges de composés chimiques.(Loewe et Muischnek ,1926 ; Bliss, 1939)

1. Dispersion des pesticides dans l'environnement :

Les substances actives phytosanitaires sont appliquées le plus souvent sous la forme de liquides pulvérisés sur les plantes et/ou sur le sol. Dans certains cas, elles sont incorporées au sol, déposées sous forme de granulés, ou encore par le biais des graines qui en sont enrobées.

Dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides peuvent être absorbés par les plantes ou les organismes du sol, les substances actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées, voire même rester dans le sol. Ainsi, l'ensemble des compartiments environnementaux peuvent être potentiellement touché et impacté par les pesticides, en plus des cibles contre lesquelles ils sont théoriquement dirigés. Les effets toxiques indésirables pour les espèces non cibles des trois compartiments environnementaux sont liés et il est illusoire de vouloir les distinguer. En effet une même substance active pourra avoir des répercussions sur l'ensemble des espèces constitutives des différents compartiments de l'environnement.(Alain ;2000)

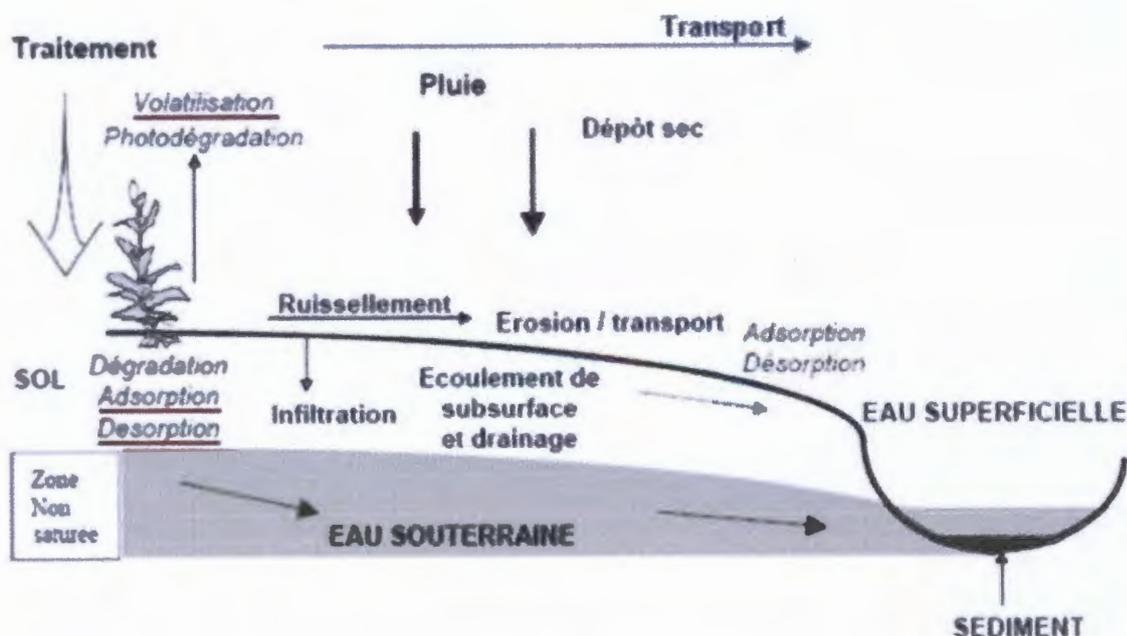


Figure 3: Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux de l'environnement. (D'après le schéma conceptuel du CORPEN, INERIS 2005).

1.1. Contamination de l'eau :

L'utilisation de pesticides a pour conséquence une contamination de l'environnement et en particulier les eaux souterraines et superficielles. La présence de pesticides dans les eaux est observée longtemps après la fin de leur utilisation. L'étude de parcelles récemment converties à l'agriculture biologique permet d'évaluer la rémanence des produits phytosanitaires dans les eaux et d'évaluer les effets de la conversion sur l'amélioration des qualités des ressources en eau. (Schrack et al.)

1.2. Contamination du sol

La contamination des sols par différentes substances, dont les pesticides, a été reconnue comme l'une des principales menaces qui pèsent sur les sols. (CEC, 2002). Les pesticides dans les sols peuvent provenir des activités agricoles mais également des activités d'entretien des espaces verts et jardins ou de désherbage des réseaux routiers et ferrés. La vitesse d'infiltration des pesticides dans le sol dépend du sol (humidité, taux de matière organique, pH) et du pesticide. (Swarcewicz et Gregorczyk, 2012)

1.3. Contamination de l'Air

Un certain nombre d'études a été réalisé sur la contamination de l'air par les pesticides, et cette contamination est généralisée. Les pesticides pulvérisés sur les cultures sont dispersés dans

l'air et dans l'atmosphère. On estime que lors de la pulvérisation, 25 à 75% des quantités de pesticides partent dans l'atmosphère, entraînant la contamination de l'air, des brouillards et de l'eau de pluie : ce phénomène est appelé « dérive ». Une partie de la dérive se dépose sur le sol à proximité du site traité, mais une partie est susceptible d'être transportée par le vent sur de longues distances (Luce ; 2011)

2. Voies d'exposition

Qu'il s'agisse d'expositions professionnelles ou environnementales, les substances pénètrent dans l'organisme selon trois voies : la voie digestive (ou orale), la voie respiratoire et la voie cutané. (Isabelle ; 2013)

3. Les possibles modes d'expositions de l'homme aux pesticides

3.1. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle concerne essentiellement les personnes manipulant les produits, au moment de la préparation, de l'application et du nettoyage des appareils de traitement. Les agriculteurs constituent une population particulièrement exposée qui forme un groupe sentine pour l'observation d'éventuels effets des pesticides. Cependant, les données des bilans de surveillance systématique (par les mutuelles agricoles par exemple) ne portent souvent que sur des manifestations toxiques aiguës ou subaiguës. Dès lors, d'une part, une partie non négligeable de la population exposée (exploitants non-salariés, saisonniers, bûcherons, floriculteurs, etc.) n'est pas prise en compte et, d'autre part, les effets chroniques ne peuvent être relevés systématiquement. De plus, l'exposition professionnelle aux pesticides des agriculteurs est très variable et complexe selon les exploitations agricoles. Elle est le plus souvent saisonnière et correspond à une succession de journées d'utilisation de produits chimiquement différents au cours de la saison et souvent également au cours d'une même journée. (CPP,2002)

Les dermatoses professionnelles aux produits phytosanitaires sont essentiellement des dermatites de contact d'irritation, parfois sévères, et, plus rarement, des dermatites de contact allergiques. Les professions les plus exposées à ces maladies de peau sont les agriculteurs utilisant des phytosanitaires ou travaillant sur des cultures traitées. (Bonney, 2013).

3.2. Exposition non professionnelle

L'ensemble de la population peut être exposé aux pesticides lors des usages domestiques ou d'entretien des jardins mais surtout à des résidus de ces pesticides au travers de son environnement (eau, air, particules en suspension, poussières) et de son alimentation. Les chiffres de l'OMS

indiquent que la contamination des aliments par les pesticides est la voie d'exposition de loin la plus importante. Les évaluations de risque attribuent 90% de l'exposition à l'alimentation contre 10% à l'eau. Le dernier rapport de la commission des communautés européennes concernant le suivi des résidus des pesticides dans les produits végétaux (**Commission of the European Communities, 2007**) donne un aperçu de l'état de contamination par ces produits dans les 25 Etats membres (Norvège, Islande)

Toutefois, la prise en compte du risque relatif aux mélanges chimiques n'est pas récente. En effet, les premières notions d'effets associés à plusieurs substances chimiques sont apparues à la fin du 19ème siècle - début du 20ème avec notamment les travaux de (**Loewe et Muischnek ,1926 ou Bliss, 1939**) qui posent les premières théories sur les interactions toxicologiques.

Dès le milieu du 20ème siècle, découlant des premières études sur les actions combinées de mélanges chimiques, la communauté scientifique s'accorde sur l'existence de deux mécanismes distincts : l'interaction et la non-interaction.

La non-interaction correspond, en termes d'analyse de risque, à l'additivité. Cette méthode est utilisée dans le cas de mélanges relativement simples comprenant au plus une douzaine de composés. Il existe deux types d'additivité :

- additivité des concentrations (ou des doses)
- additivité des réponses

Le concept d'interaction comprend tous les autres cas où les effets d'un mélange chimique est différent des deux premiers types d'action. Il en résulte soit un effet supérieur (synergisme, supra-additivité), soit un effet inférieur (antagonisme, infra-additivité) comparé à celui que l'on attendait sur la base de l'additivité simple. (**Casseet al1998**)

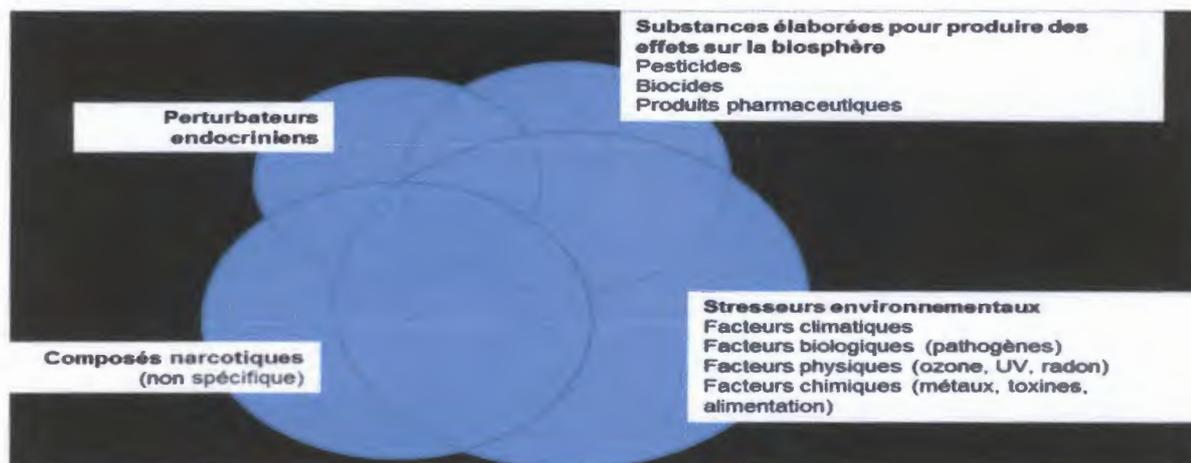


Figure 4 : Interactions possibles lors de multi-expositions (Løkke, 2010)

1. Toxicologie des pesticides

C'est le manque de sélectivité des pesticides vis-à-vis de leur cible qui provoque la plupart des effets nocifs pour l'environnement. Les animaux absorbent les pesticides via la nourriture ou l'eau d'alimentation, via l'air respiré ou au travers de leur peau ou de leur cuticule. Ayant franchi diverses barrières, le toxique atteint les sites du métabolisme ou est stocké. On utilise habituellement pour estimer la toxicité d'une substance chimique la dose (ou la concentration) qui provoque un effet particulier chez la moitié - statistiquement - de la population soumise au toxique (DE50 ou CE50). Si cet effet est la mort, on parle de dose (ou de concentration) létale 50 (DL50 ou CL50). La dose (ou la concentration) maximale sans effet (DMSE) est la dose immédiatement inférieure à celle qui provoque le moindre effet dans la même épreuve expérimentale. (Severn et Ballard, 1990).

Dans les cas où les vitesses d'excrétion ou de métabolisation de la molécule sont faibles, où elle est liposoluble, où elle est fortement liée à d'autres constituants de l'organisme, sa concentration finale dans l'organisme sera plus élevée que dans le milieu de cet organisme. (Madhun et Freed, 1990)

2. impacts des pesticides sur l'environnement

Le développement des connaissances en écotoxicologie et la croissance de la valeur accordée aux écosystèmes sonnent l'alarme quant aux impacts environnementaux des pesticides. Après des décennies d'utilisation, les évidences s'accroissent en effet sur leur implication dans la contamination des plans d'eau de surface et souterraine en plus de leurs effets néfastes sur la biodiversité faunique. (Ève, 2015)

3. Impact des pesticides sur la santé :

La toxicité des pesticides est à aborder selon deux aspects : la toxicité aiguë (effets immédiats) et la toxicité chronique (effets à long terme). Actuellement, il existe de nombreuses données concernant la toxicité aiguë ; les connaissances sur la toxicité chronique demeurent limitées.

Dans les cas où les vitesses d'excrétion ou de métabolisation de la molécule sont faibles, où elle est liposoluble, où elle est fortement liée à d'autres constituants de l'organisme, sa concentration finale dans l'organisme sera plus élevée que dans le milieu de cet organisme. (Madhun et Freed, 1990)

3.1. La Neurotoxicité :

L'existence d'effets neurologiques des pesticides sur la santé des personnes exposées a connu une reconnaissance officielle récente avec l'inscription de la maladie de Parkinson au tableau des maladies professionnelles dans le régime agricole de la sécurité sociale. Pour autant, la maladie de Parkinson n'est pas le seul trouble neurologique provoqué par les pesticides. (Bonnefoy , 2013)

Les insecticides organochlorés(OC) stimulent le système nerveux et induisent une paresthésie, une sensibilité à la stimulation, une irritabilité, un équilibre perturbé, des tremblements et des convulsions. Le mode d'action précis n'est pas connu ; cependant, certains de ces produits induisant une facilitation et une hyperexcitation aux jonctions synaptiques et, neuromusculaire, cause de décharges répétitive dans les neurones centraux, moteurs et sens oriels (Les insecticides organophosphorés(OP) et carbamate inhibent l'acétylcholinestérase). (Frank , 1992).

3.2. Effets sur l'immunité :

Les pesticides sont capables d'agir sur le système immunitaire selon différents mécanismes entraînant des pathologies immunitaires plus fréquentes chez l'enfant que chez l'adulte. Cependant, les résultats des études épidémiologiques sont contradictoires. Certaines études sont montrées que l'exposition chronique aux pesticides peut jouer un rôle dans le développement de certaines pathologies respiratoires comme l'asthme et la bronchite chronique .D'autre part, l'exposition de l'enfant aux pesticides organochlorés (en particulier DDE) a été associée à des altérations d'ordre immunologique, comme par exemple une augmentation des immunoglobulines IgE, et développement d'otites chroniques et d'asthmes bronchiques. Ces effets ont été observés essentiellement à la suite d'une exposition in utero ou via le lait maternel. De plus, certaines études ont montré des perturbations de la production des cytokines. (Merhi ; 2008)

3.3. Effets sur le système endocrinien

Certaines substances de synthèse, dont les pesticides, peuvent perturber le système hormonal ou endocrinien et provoquer un déséquilibre physiologique. Parmi les effets possibles chez l'humain, on peut noter l'obésité, la décalcification des os et le diabète. Les pesticides soupçonnés être des modulateurs endocriniens pourraient aussi être associés au développement du cancer du sein, à une réduction de la fertilité mâle, à des dommages aux glandes thyroïde et pituitaire, à la diminution du système immunitaire et à des problèmes liés au comportement. Certaines données laissent croire que l'enfant, particulièrement au stade fœtal, serait le membre le plus vulnérable de la population aux effets des pesticides. Les effets des modulateurs endocriniens sont encore peu

documentés mais la liste des pesticides possédant un tel potentiel s'allonge à mesure que les résultats de nouvelles recherches sont publiés. (Onil et al , 2001).

3.4. Cancer

Le Cancer associé à l'exposition aux pesticides est l'un des sujets les plus étudiés au cours de la dernière décennie. Parmi les études trouvées, 43 analysent la relation entre l'exposition directe aux pesticides et le risque de cancer. La plupart des études utilisent les données de l'Agricultural Heath Study (AHS). Aucun accord n'a été atteint: 12 des études ne rapportent aucune preuve significative de risque accru de cancer chez les agriculteurs exposés aux pesticides par rapport au risque du général population, tandis que le reste les études concluent que l'exposition à certains pesticides augmente significativement le risque de cancer. L'hétérogénéité des résultats est en relation avec le type de cancer analysé ainsi que la nature des pesticides. (Henrik ,2014).

3.5. Problèmes respiratoires

L'examen des pesticides et des problèmes de santé par le Collège des médecins de famille de l'Ontario conclut que: «Dans l'ensemble, il est prouvé que l'exposition aux pesticides et aux organophosphorés ou insecticides carbamates en particulier, est associée au développement de l'appareil respiratoire symptômes et un spectre de maladies obstructives et restrictives pulmonaires. Les études de l'asthme chez les enfants ont signalé une association entre l'exposition maternelle à organophosphorés et insecticides organochlorés.(Mariel,2012) .

3.5 Impact sur le foie

Le foie est une glande endocrine et exocrine qui est séparée en deux lobes. Cette partie n'est pas spécifique des palmipèdes, il est possible de retrouver les mêmes fonctions essentielles dans la plupart des êtres vivants. En effet, tous les aliments absorbés au niveau intestinal passent par le foie. Le foie filtre, transforme et répartit différents éléments au sein de l'organisme. Le foie joue un rôle essentiel dans l'apport d'énergie aux organes périphériques et le maintien de l'homéostasie en régulant la synthèse ou le stockage de diverses molécules. Le foie est groupé avec la vésicule biliaire pour agir dans la digestion et la production d'enzymes digestives. Il détruit les globules rouges, synthétise l'urée afin d'excréter les déchets azotés, intervient dans le métabolisme et dans le stockage des vitamines. Il produit entre autres des substances protectrices et anti-toxiques, qui vont capturer, transformer et rendre inoffensifs les toxiques ingérés ou inhalés. Le foie est le centre de synthèse et de dégradation du glycogène, il régule la glycémie. Le foie contrôle également le métabolisme des lipides : lors d'excès, il synthétise des lipoprotéines; en période de jeûne, il métabolise les réserves de graisses de l'organisme. Le foie synthétise les protéines de la coagulation et de la cicatrisation comme le fibrogène et une protéine du plasma, l'albumin. (Bowen ,2007 ;Vital,2007).

Les pesticides sont des poisons très dangereux et le foie ne peut pas se débarrasser d'eux. Des dommages sévères du foie peuvent survenir après une sérieuse intoxication ou après avoir travaillé avec les pesticides pendant plusieurs années Alan. (Liz et al. 2004).

Chez les mammifères, les insecticides organophosphorés (OP) sont rapidement métabolisés, principalement par le foie, même si une petite fraction reste stockée dans les tissus adipeux (Bakke et Price, 1976 ; Kamrin, 1997).

4. Mécanisme d'action des pesticides chez les souris et l'homme

Les produits phytosanitaires constituent une catégorie de substances très hétérogène regroupant un grand nombre de molécules (environ 800) qualifiées de matières ou substances actives (MA ou SA) qui peuvent être regroupées en familles chimiques et classées selon des critères très rigoureux permettant d'identifier jusqu'à la molécule ou l'isomère actif. C'est ainsi que sur ces critères, on distinguera par exemple les produits minéraux des produits organiques, parmi ces derniers les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates, eux-mêmes subdivisés en méthyle ou phényl-carbamates et ainsi de suite jusqu'à la molécule et ses isomères. (Alain, 2000)

Mécanisme d'action des pesticides :

Pour comprendre le mécanisme d'action des pesticides, il est nécessaire de tenir compte des voies métaboliques et de détoxification, qui paradoxalement peuvent parfois conduire à des métabolites plus toxiques que la molécule mère. La toxicité d'un pesticide dépende donc de son mode d'absorption, de ses propriétés chimiques de son métabolisme et de l'élimination des métabolites. Comme tous les xénobiotiques, les pesticides peuvent être absorbés par voie cutanée, orale ou pulmonaire et distribués dans les tissus de l'organisme de manière active ou passive. L'absorption dépende de la barrière à franchir (peau, poumon, paroi, intestinale...), des propriétés physicochimiques des molécules. Les petites molécules peuvent franchir une ou plusieurs barrières de manière passive. Les substances lipophiles (hydrophobes) semblent capables de traverser plus facilement les membranes cellulaires dont les constituants sont principalement des phospholipides alors que les substances ionisées (hydrophiles) seront arrêtées sauf au niveau des pores ou des transporteurs membranaires pour les plus petites molécules. La membrane des cellules constitue ainsi une barrière efficace protégeant les cellules contre des xénobiotiques hydrosolubles. Après pénétration dans une cellule, le xénobiotique est rapidement pris en charge par des transporteurs membranaires ou pompes d'efflux qui vont l'exporter à l'extérieur de la cellule. Il peut également être transformé par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques au cours de plusieurs réactions afin de faciliter son excrétion. (Jean et al, 2013)

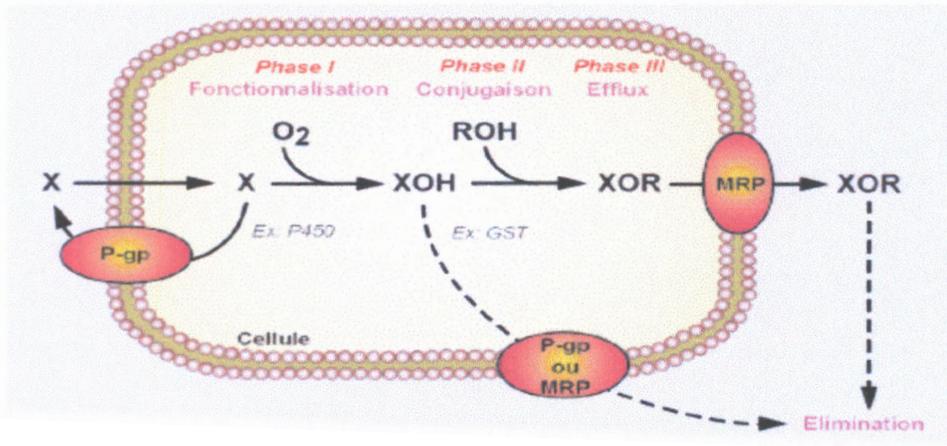


Figure 5: Processus de détoxification et de biotransformation des xénobiotiques. (Jean et al, 2013)

Objectif

Aujourd'hui, une des préoccupations majeures, concerne l'impact d'une exposition aux faibles doses de pesticides tels qu'ils peuvent être apportés au consommateur via l'alimentation. Afin d'apporter des éléments de réponse l'objectif de notre travail consiste à démontrer l'effet toxique d'un mélange de polluants de la catégorie de pesticides (le Chlorpyrifos, le Mancozèbe et le Sulfate de Cuivre) *in vivo* chez la souris et les propriétés biologiques des lichens à savoir (*Cladonia foliacea* et *Cétreliia olivetorum*) dans le but d'explorer son pouvoir hépatoprotecteur. Pour cela notre étude englobe deux aspects dont le premier est d'ordre phytochimique et le second aspect d'ordre toxicologique.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Nous avons utilisé dans notre étude 67 souris femelles et male, âgés de trois semaine, de poids corporel compris entre 20 et 30 g. Les souris ont été mis dans des cages placés dans une animalerie soumise à une température ambiante, et à un photopériodisme de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière. Les animaux reçoivent un régime alimentaire standard sous forme de bouchons en provenance du siège social, et de l'eau à satiété. La litière utilisée est la sciure renouvelée 01fois par jour pour assurer le bon état hygiénique. Les animaux se sont acclimatés aux conditions de l'animalerie de département de biologie de l'université de JIJEL pendant cinq jours avant l'expérimentation.

1.2. Matériel végétal

Cladonia foliacea est une espèce de lichen appartenant au genre *Cladonia* ordre Lécatorées, l'identification botanique de l'espèce a été faite en se basant sur la flore de (Brodo et al, 2001). Les lichens ont été collectés en mois de Mars 2016. Nous avons sélectionné une station de «Oued Azarez» situé à Chahna à la limite de la commune d'Ouled Asker (40 km au sud-est du chef-lieu de la wilaya de Jijel) (figure 6).

L'espèce de *Cétreliia Olivetorum* est prélevée au lieu-dit «Boumlih» situé à la limite de la commune de AsebteChakfa de la wilaya de Jijel (figure 07).

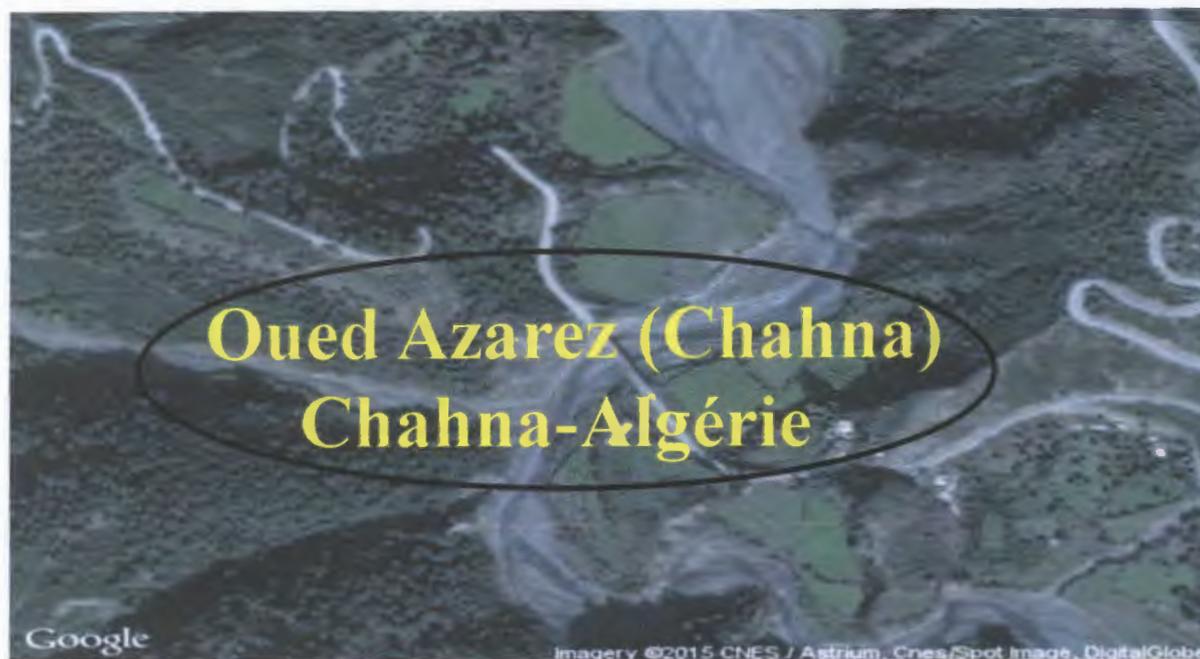


Figure 6: Image satellitaire d'Oued Azarez (Google – Earth).



Figure 07 : Image satellitaire Boumlih (Google - Earth).

1.3. Matériel chimique :

1.3.1. Choix des pesticides

Pour notre étude nous avons choisi de tester les pesticides les plus utilisés dans l'agriculture en Algérie et particulièrement dans la wilaya de Jijel (le sulfate de cuivre, le Mancozèbe, et le Chlorpyrifos) (Tableau 03) pour en faire une mixture de contamination chez les souris.

Tableaux 03 : Les pesticides les plus utilisés dans la wilaya de Jijel. (D'après la direction de l'agriculture de la wilaya de Jijel) .

Produits phytosanitaires	Nom commercial	Matière active
Fongicides	Manco c	Mancozeb* Cymoxaral
	Criptan 50	Captan
	Kazarmaneb	Mancozeb
Insecticides	Vertimec	Abamectine
	Deltacal 25 EC	Déltamétrine
	Fastac	Alpha-cypeméthrine
	Lannate	Méthomyl
	Sumicidin	Fenvalérate
	Dursban	Chlorpyriphoséthyl (480g/l)
	Karaté	Lambda-cyhalothrine
Herbicides	Kalach	Glyphosate

1.3. 2 Fiche toxicologique des pesticides étudiés

Dans le tableau04 une synthèse des caractéristiques et effets toxicologique des pesticides utilisés selon (Benziane .2014).

Tableau 04 : caractéristiques et effets toxicologiques des pesticides(Benziane.2014)

Pesticide	Toxicité
<p>Mancozèbe</p> <p>DL50 de mancozèbe par voies orales chez la souris est supérieures de 5000mg/kg.</p> <p>Le mancozèbe est un fongicide systémique appartenant à la famille des carbamates.</p> <p>C'est plus précisément, un dithiocarbamate, non inhibiteur des cholinestérases.</p> <p>Les spécialités commerciales phytopharmaceutiques, qui peuvent renfermer la mancozèbe en association avec d'autres fongicides, se présentent généralement sous formes de poudres mouillables, suspensions concentrées ou granulés.</p> <p>Le mancozèbe est un composé stable dans</p>	<p>Toxicité subaiguë, subchronique</p> <p>L'organe cible, chez l'animal, après l'administration répétée de mancozèbe dans l'alimentation et la thyroïde (inhibition de la thyroperoxydase, hypertrophie et hyperplasie folliculaire de l'organe).</p> <p>Une diminution de T3 et T4 sériques est observée chez la souris :</p> <p>Une augmentation de la thyroestimuline (TSH), du poids de la thyroïde ainsi qu'une hypertrophie/hyperplasie sont également notées.</p>

<p>un lieu de stockage sec.</p> <p>Ils se décomposent lentement sous l'effet de la chaleur, de l'humidité ou au contact d'acides.</p> <p>Par décomposition thermique, il libère des fumées/gaz toxiques renfermant notamment oxyde de soufre, oxyde d'azote, sulfure d'oxygène.</p> <p>Le mancozèbe est pratiquement insoluble dans l'eau, et dans la plupart des solvants organiques.</p>	
--	--

Pesticide	Toxicité
<p>Chlorpyrifos</p> <p>DL50 de Chlorpyrifos :>2000mg/kg chez la souris.</p> <p>Le Chlorpyrifos (C₉H₁₁Cl₃NO₃PS ou diethoxy-sulfanylidene-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl)oxyphosphorane) est un insecticide de la famille chimique des organophosphorés</p> <p>Cette substance se présente sous forme de cristaux blancs et très peu solubles dans l'eau : 2 mg/l.</p>	<p>Aiguë</p> <p>Légers: Céphalées, étourdissements, transpiration, larmoiements, salivation, vision trouble, fasciculations des muscles.</p> <p>Modérés: Douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhée, hypersécrétions, bradycardie tachycardie, fasciculations des musculaires tremblements, faiblesse et fatigue.</p> <p>Sévères: Myosis intense, transpiration, incontinence, confusion, œdème pulmonaire, respiration difficile, cyanose.</p> <p>Chronique L'exposition chronique aux OP a été associée à des atteintes du système nerveux central ou à des effets sur les fonctions neurophysiologiques périphériques.</p> <p>La possibilité de problèmes hépatiques, rénaux, immunologiques, cardiovasculaires, endocriniens, respiratoires, hématologiques, oculaires.</p>

Pesticide	Toxicité
<p>Sulfate de cuivre</p> <p>Utilisations : Pour usage de laboratoire seulement.</p> <p>Valeurs de toxicité des ingrédients dangereux :</p> <p>ORALE (DL50): Aiguë: 300 mg/kg (Souris).</p> <p>CUTANÉE (DL50): Aiguë:>2000 mg/kg(Souris).</p> <p>INTRAPÉRITONÉAL (DL50): Aiguë:33 mg/kg (Souris).</p>	<p>Effets chroniques d'une surexposition</p> <p>Peut causer: dermatite de contact allergique, conjonctivite, ulcération de la cornée, ulcération et perforation de la cloison nasale, goût métallique, irritation des membranes muqueuses, anémie hémolytique, jaunisse et enfllement du foie, décoloration possible de la peau et des cheveux, cirrhose, accélérer artériosclérose, dommages aux reins, au foie, au cerveau, aux poumons, au rate. Maladie de Wilson. Embryotoxique chez l'animal. Effets cancérogènes: Non disponible.</p> <p>Effets mutagènes: Non disponible. Effets tératogènes: Non disponible. Toxicité de ce produit pour le système reproducteur: Non disponible. Au meilleur de nos connaissances, la chimie, la physique, et la toxicité de cette substance n'est pas parfaitement connue. Conditions médicales pouvant s'aggraver: Les personnes atteintes au préalable de maladies des yeux, de la peau, des reins, du foie, maladie de Wilson, des hématopoïétiques, ou du système respiratoire peuvent manifester une sensibilité accrue au produit en cas de fortes expositions</p>

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait méthanolique de *Cladonia foliacea*

Pour apprécier le contenu en métabolites secondaires d'espèce de lichen, une extraction par macération dans le méthanol a été réalisée selon la méthode de (Fokou, 2011) en respectant un rapport de 1 : 5 (w : v). Après évaporation sous vide au rotavapeur, le résidu a été récupéré et stocké au

congélateur pour une utilisation ultérieure. La figure 08ci-dessous représente le protocole de préparation de l'extrait lichénique.

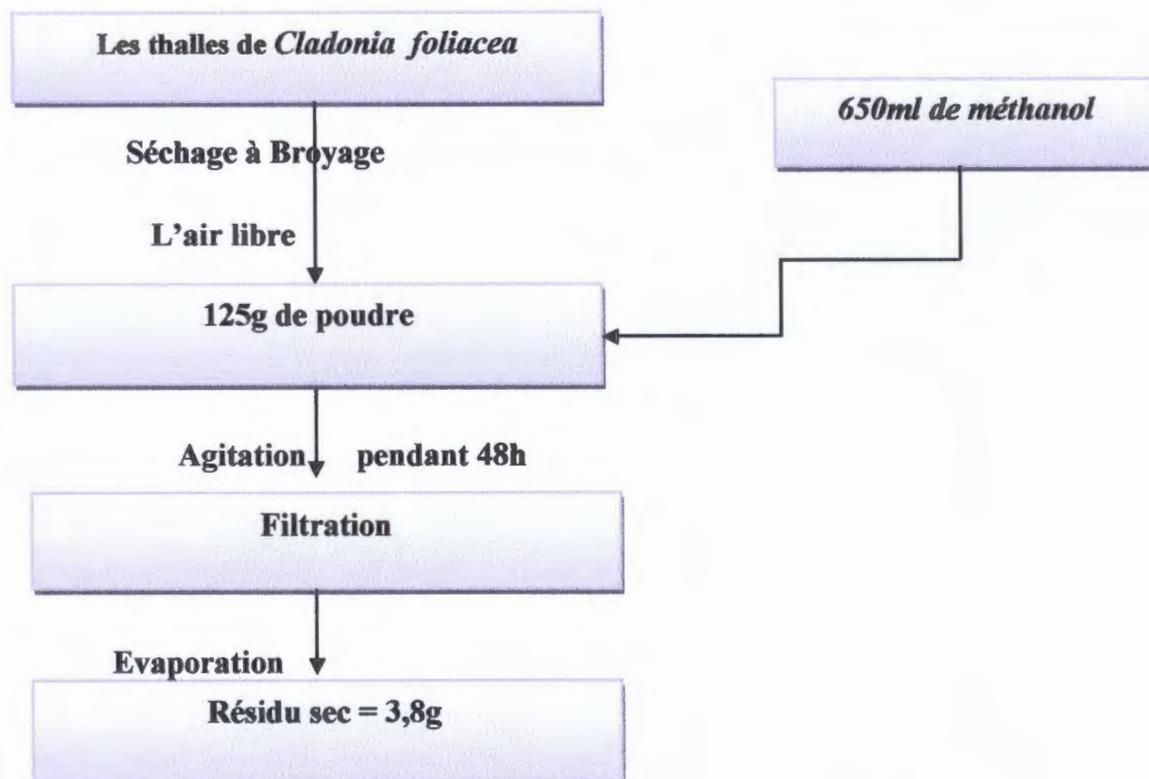


Figure 8: Etapes de Préparation de l'extrait méthanolique de *Cladonia foliacea* (Fokou, 2011).

Le rendement d'extraction est calculé selon l'équation suivante :

$$R = \frac{Pr}{Pi} \times 100$$

Ou : R = Le rendement d'extraction en % = 3,05

Pr = le poids du résidu.

Pi = le poids initial de la prise d'essai (Fokou, 2011).

2.2. Préparation de l'extrait méthanolique de *Cétrelia olivetorum*.

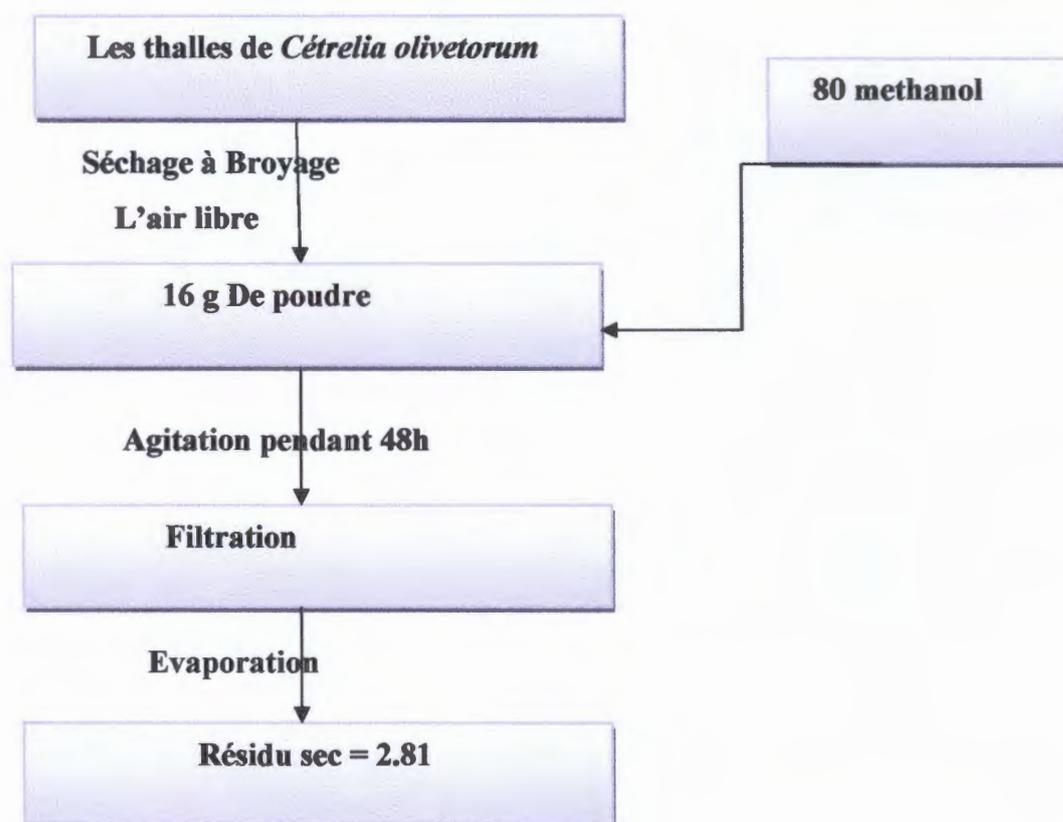


Figure 9: Etape de préparation de l'extrait méthanolique de *Cétrelia olivetorum*

Le rendement d'extraction est calculé selon l'équation suivante :

$$R = \frac{Pr}{Pi} \times 100$$

Ou : R = Le rendement d'extraction en % = 17,56

Pr = le poids du résidu.

Pi = le poids initial de la prise d'essai (Fokou, 2011).

2.3. Etude phytochimique d'Activité biologique :

L'étude phytochimique de *Cladonia foliacea* été basée sur la détermination des composés phénoliques (poly phénols, flavonoïdes).

2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits, sont déterminées au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de (Slinkard et Singleton, 1997). Ce dernier est constitué par un

mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 700 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de résidu sec.

➤ **Protocole**

Tableau 05: Protocole expérimental (test Folin-Ciocalteu)

Réactifs	Essai	Blanc
Extrait (0.2mg/ml)(ml)	0.2	/
Réactif de Folin 1N (ml)	1	1
Na₂CO₃ 7.5%(ml)	1,5	1,5
Incubation pendant 30 min à l'obscurité		
Mesurer l'absorbance à 700 nm.		

➤ **Expression des résultats**

La concentration des poly phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard acide gallique et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme de résidu sec ($\mu\text{g EAG/mg}$).

$$\text{Absorbance} = 1,0637 x - 0,0677$$

$$(R^2 = 0,9741)$$

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode (Meda et al, 2005), le principe de cette méthode repose sur la capacité de ces composés à former des complexes par addition du chlorure d'aluminium (AlCl_3) au mélange réactionnel.

➤ **Protocole**

Tableau 06: Protocole expérimental (test chlorure d'aluminium)

Réactifs	Essai	Blanc
Extrait (0.2mg/ml) (ml)	2	/
(AlCl ₃) 2% (ml)	1	1
Incubation pendant 10 min à Tambiante		
Mesurer l'absorbance 430nm.		

➤ **Expression des résultats**

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard la quercitrine. La concentration est exprimée en microgramme d'équivalent de quercitrine par milligramme de résidu sec.

$$\text{Absorbance} = 21,546x - 0,3078$$

$$(R^2 = 0,9235)$$

2.3.3. Dosage des polyphénols polaires

La méthode utilisée est celle rapportée par **Owen et Johns. (1999)**, 3 ml de chaque extrait méthanolique (0,2mg/ml) est soumis à une centrifugation à 3500 tours/mn pendant 15 mn. Après incubation à température ambiante pendant 24 heures le surnageant est récupéré, ce dernier est additionné de 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu à 2N. Après 5 mn, 1,5 ml de carbonate de sodium monohydrate sont ajoutés. Le mélange est soumis à une centrifugation à 600 tours/min est indispensable pour éliminer la turbidité, le surnageant ainsi obtenu, fait l'objet d'une lecture à 750nm. Le protocole est présenté dans **Le tableau 07.**

Tableaux 07 : Protocole expérimental (dosage des polyphénols polaires)

Réactifs	Essai	Blanc
Extrait (0.2mg/ml) (ml)	3	/
Centrifugation à 3500 tours/mn pendant 15 mn.		
Incubation pendant 24 h à l'obscurité. Le surnageant est récupéré		
Après 5 mn		
carbonate de sodium	1,5	1,5
centrifugation à 600 tours/min		
Mesurer l'absorbance 750nm.		

➤ **Expression des résultats :**

La concentration en polyphénols polaire a été déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique. La teneur moyenne en polyphénols apolaires est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait brut.

$$\text{Absorbance} = 1,0637x - 0,0677$$

$$(R^2 = 0,9741)$$

2.3.4. Détermination des polyphénols apolaires

La quantité de polyphénols apolaires contenus dans les extraits de lichens est obtenue par soustraction du taux de polyphénols polaires de celui des polyphénols totaux selon (Owen et Johns.1999) :

$$T_{ap} = T_t - T_p \quad \text{Où :}$$

T_{ap} : Taux de polyphénols apolaires.

T_t : Taux de polyphénols totaux.

T_p : Taux de polyphénols polaires.

2.3.5. Dosage des tannins :

Dans des tubes à essai 1ml d'extrait méthanolique (1 mg /ml) est ajouté à 2ml d'une solution BSA (1mg/ml), préparée dans un tampon acétate (pH 4,9 ; 0,20M). Le mélange est agité immédiatement et incubé à 4°C pendant 24 heures, les tubes sont ensuite centrifugés à 5000 tours/mn pendant 20 min, le surnageant est jeté et le précipité est dissout dans 4 ml de la solution SDS/TEA (mélanger jusqu'à la dissolution du précipité), ensuite on ajoute au mélange 1ml de la solution FeCl₃ à 0,01 M dans HCl (0,01N). Après une incubation de 15mn, la lecture se fait à 510 nm. .

Tableaux 08:Protocole expérimentale (dosage des tannins).

Réactifs	Essai	Blanc
l'extrait (1mg/ml)(ml)	1	/
BSA (1mg/ml) préparé dans le tampon Acétate (pH=4,5 ; 0,20M)		2
Incubation pendant 24 h à 4°C		
Centrifugation à 5000 tours pendant 20 min.		
SDS /TEA 4		
FeCl₃ à 0,01 M préparé dans HCL (0,01N) 1		
Incubation pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité		
Lecture à 510 nm		

➤ Expression des résultats :

En se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide tannique, les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide tannique par g d'extrait brut (mg Eg AT/g EB) (Laib, 2009).

$$\text{Absorbance} = 0,7214x - 0,0035$$

$$(R^2 = 0,997)$$

2.3.6. Test d'activité antioxydante :

Effet capteur du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) Pour dépister l'activité antioxydante de *Cladonia foliacea* le test au DPPH a été utilisée selon le protocole décrit par (Velazquez et al. 2003). un radical libre de couleur violette, est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires (Molyneux, 2004). Dans des tubes on a introduit 100 μ l de chaque extrait et 3 ml de la solution méthanolique de DPPH, après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm. Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en, utilisant la formule suivante :

$$I \% = [(Abs \text{ Échantillon} - Abs \text{ Contrôle négatif}) \times 100]$$

Où: I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon.

Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif

2.3.7. Le pouvoir réducteur des composés phénoliques (Reducing Power Assay) :

Ce test est découvert par Oyaizu 1896. Ce test est considéré comme un test direct et rapide est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques, et utiliser pour déterminer l'activité antioxydant des extraits étudiés dans un milieu neutre.

Ce test est basé sur la réduction des ions $[Fe(CN)_6]^{3-}$ à des ions de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ qui donne dans la présence des ions Fe^{3+} une coloration bleu clair, qui peut être mesurer leur absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 700 \text{ nm}$.

3. Etude toxicologique :

3.1. Etude in vivo : Essais de toxicité aigue

➤ Protocole expérimental

L'expérimentation à durée 07 jours, dans le respect de l'essai de toxicité aigüe. Les souris sont logées par groupes de 4 animaux par cage. Elles sont marquées pour permettre une identification individuelle. Après 05 jours d'acclimatation, chaque animal a été gavé 01 fois par jours par chaque type de solution. Le poids corporel de tous les animaux a été pris deux fois par jours afin de suivre l'évolution de leur masse corporelle. Au terme de 07 jours nous sacrifions les souris. Les différents lots de souris sont répartis comme suit :

➤ Le premier lot témoin(Té) :

- 03 souris recevant de l'eau physiologique chaque jour pendant 07 jours.

➤ Le deuxième lot (P):

- Les 04 souris traitées par 0.2 ml du mélange de pesticides chaque jour pendant 07 jours.
- les 04 souris traitaient par 0.2ml de pesticide chlorpyrifos chaque jour pendant 07 jours.

Les 04 souris traitaient par 0.2ml de pesticide Mancozèbe chaque jour pendant 07 jours.

- Les 04 souris traitaient par 0.2ml de pesticide Sulfate de cuivre chaque jour pendant 07 jours.

➤ Le troisième lot (L)

- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique (*Cladonia foliacea*) de concentration 5mg/kg:
- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique (*Cladonia foliacea*) de concentration 50mg/kg
- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique (*Cladonia foliacea*) de concentration 100mg/kg
- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique (*Cladonia foliacea*) de concentration 200mg/kg

➤ Le quatrième lot (LP) :

- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique de concentration 5mg/kg une heure avant le traitement par 0.2ml du mélange de pesticides chaque jour pendant 07 jours.
- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique de concentration 50mg/kg une heure avant le traitement par 0.2ml du mélange de pesticides chaque jour pendant 07 jours
- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique de concentration 100mg/kg une heure avant le traitement par 0.2ml du mélange de pesticides chaque jour pendant 07 jours.

- Les souris recevant 0.2 ml d'un extrait lichénique de concentration 200mg/kg une heure avant le traitement par 0.2ml du mélange de pesticides chaque jour pendant 07 jour.

L'administration a été réalisée quotidiennement par gavage, afin d'éviter les effets du changement de rythme biologique.

➤ Préparation des solutions

Deux types de solutions ont été préparés pour le traitement des souris :

📌 Les solutions de l'extrait de *Cladonia foliacea*

A partir du résidu lichénique obtenu nous avons préparés quatre solutions à différentes concentrations (5mg/kg, 50 mg/kg, 100mg/kg, 200 mg/kg) en utilisant une solution saline à 0,9%. Les concentrations étaient choisies sur la base d'une recherche bibliographique ne confirmant aucune toxicité remarquée de cette gamme de concentrations.

📌 Solutions de la mixture des pesticides

La mixture a été préparée par trois pesticides (Chlorpyrifos, Mancozèbe, sulfate de cuivre) (**Tableau 09**). En se basant sur une dose unique correspondant à la dose journalière admissible « DJA ».

La « DJA » est la quantité d'une substance pouvant être quotidiennement consommée au cours d'une vie entière sans présenter le moindre risque ou effet secondaire (**Cluzeau et al. 2000**). Elle est déterminée en divisant la dose sans effet (DSE) de l'animal le plus sensible par 100, la dose sans effet étant déduite d'après des études toxicologiques menées à long terme sur les animaux. Elle s'exprime en milligramme (ou microgramme) de résidus par kilogramme de poids corporel. Ce facteur de sécurité est augmenté si la substance a un effet toxique irréversible (500 pour des néphrotoxiques, 5000 pour des cancérigènes) (**Derache, 1986**).

Donc le choix de la « DJA » pour la préparation des concentrations de chaque pesticide était l'hypothèse la moins défavorable pour mimer l'exposition réelle d'une population.

Tableau09 : différentes concentrations des pesticides solubilisés dans l'eau saline 0,9%.

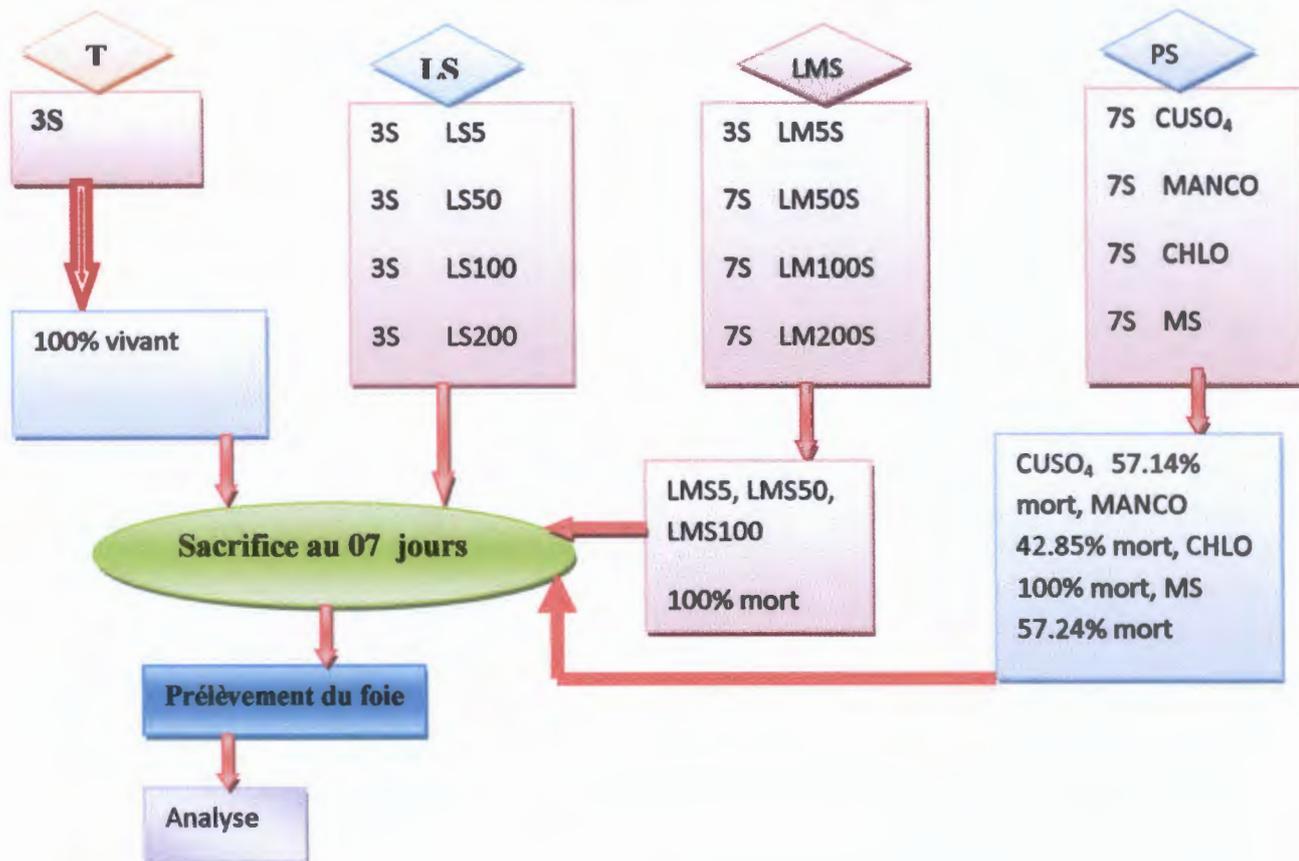
Pesticide	DJA
Chlorpyrifos	0.001mg.kg ⁻¹ .j ⁻¹
Mancozèbe	0.05mg.kg.c.j
Sulfate de cuivre	0-0.5mg.kg de masse corporelle

3.1.1. Sacrifice et prélèvements des échantillons

❖ **Prélèvement des organes**

Après la dissection, le foie est prélevés, rincés, dans une solution de chlorure du sodium (NaCl) à 0.9%, Cette organe est maintenue à -4°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant (glutathion GSH, malondialdéhyde MDA, les activités enzymatique de la catalase, GST et GSH-Px).

La Figure 10 schématise les différentes étapes du Protocol expérimental utilisé.



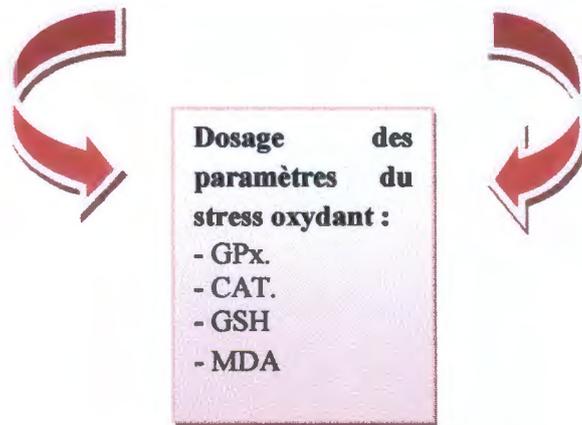


Figure10: Organigramme des différentes étapes du Protocole expérimental utilisé.

4..Dosage des protéines :

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu.

(L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

La procédure expérimentale du dosage des protéines est la suivante :

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml du bleu de Coomassie.
- Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) préalablement réalisée dans les mêmes conditions dont l'équation de la courbe de régression est la suivante :

$$\text{Absorbance} = 0,421 x + 0,006$$

$$(R^2 = 0,993)$$

5. Dosage des paramètres du stress oxydant

5.1. Préparation de l'homogénat :

Une gramme d'organe (le foie) de souris des différents groupes étudiés, a été utilisée. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation au froids de la suspension cellulaire (10000 tours/min, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs et conservés à -4°C pour usage ultérieur **Weckbecker et Cory (1988)**.

5.2. Dosage du glutathion

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode d'**Ellman (1959)**. La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB).

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- 0.2 ml de la solution d'acide salicylique (0.25%).
- Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0.5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris, pH 9.6.
- Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01M.

Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

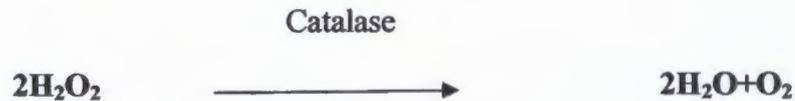
$$GSH (\mu\text{mol GSH} / \text{mg protéine}) = \frac{DO \cdot 1 \cdot 1,525}{13100 \cdot 0,8 + 0,5 \cdot \text{mg protéine}} \cdot 1000$$

- ✓ **D0** : Densité optique.
- ✓ **1**: Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- ✓ **1.525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).
- ✓ **13100** : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.
- ✓ **0.8** : Volume de l'homogénat.

- ✓ **0.5** : Volume du surnageant.

5.3. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Les catalases sont présentés dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les dérivés actifs de l'oxygène et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène Selon la réaction suivante (Aebi, 1984).



L'activité du CAT a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H_2O_2 .

En faisant réagir dans 100 mM de tampon phosphate pendant 1 min à pH 7.4, 200 μ l de H_2O_2 (500mM) sur 20 μ l de l'homogénat, à une température d'incubation de 25°C.

Le tableau ci-dessous représente les concentrations et les quantités des réactifs nécessaires au dosage de l'activité catalase.

Tableaux 10 : Protocole expérimental (Activité de la catalase).

Les réactifs	Essai (μ l)	Blanc (μ l)
Tampon phosphate (100mM ; pH7.4)	780	800
H_2O_2	200	200
S9 (1à 1.5 mg protéine/ml)	20	/

S9 : la quantité du surnageant doit être déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1.5 mg/ml soit une quantité de 10 à 20 μ l de S9.

La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

L'activité CAT est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité catalase } (\mu\text{mol } H_2O_2 / \text{min} / \text{mg prot}) = \frac{\Delta DO}{E \times L \times X \times Fd} * 10$$

- ✓ **E** : Coefficient d'extinction (= 0.043 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).
- ✓ **L** : La longueur du trajet optique dans la cuve (1 cm).
- ✓ **X** : La quantité des protéines mg/ml.
- ✓ **Fd** : 0.02 (facteur de dilution pour le H_2O_2 dans le tampon).

5.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA) :

Le malondialdéhyde est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiées par les radicaux libres. Dans notre étude, les taux du MDA ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa et al. (1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

Le dosage respecte les étapes suivantes :

- Prélever 0,5 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 %.
- Ajouter 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %.
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 100 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et additionner de 4 ml de n-butanol.
- Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 tours/min.
- Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

La concentration en MDA tissulaire est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe.

$$MDA(n \text{ mol/mg de protéine}) = \frac{A^{ab} \times 10^9}{1560000}$$

A^{ab} : absorbance

5.5. Dosage de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) :

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de Floheet Gunzler, (1984).

Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GSH-Px selon la réaction suivante :

GSH-Px



Pour cela que, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant).
- Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM).

- Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4).
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- Ajouter 0.2ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
 - Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.
 - Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
 - Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
 - Prélever 0.48 ml du surnageant.
 - Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS.
 - Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM)
 - Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

La détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante:

$$GSH - Px (\mu\text{mol GSH}/\text{mg protéine}) = \frac{(DO \text{ échantillon} - DO \text{ étalon}) \times 0.04}{DO \text{ étalon}}$$

- ✓ **DO échantillon:** Densité optique de l'échantillon.
- ✓ **DO étalon :** Densité optique de l'étalon.
- ✓ **0.04 :** Concentration de substrat (GSH).

6. Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types (Moyenne \pm SD). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. La valeur trouvée par le calcul du F peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

- La différence n'est pas significative comparativement aux témoins: lorsque ($p > 0,05$).
- La différence est significatives comparativement aux témoins: lorsque ($P < 0,05$) *.
- La différence hautement significative comparativement aux témoins : lorsque ($P < 0,01$) **.
- La différence Très hautement significative comparativement aux témoins :
Lorsque ($P < 0,001$) ***.

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel XLSTAT.

I. Etude phytochimique et activité biologique

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des extraits méthanoliques étudiés et la recherche de leurs activités, un dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a été effectué.

L1-Dosage des polyphénols totaux, polaire apolaire flavonoïdes et tanins :

Dans le but de caractériser les extraits préparés à partir de *Cladonia foliacea* et *Cétreliia olivetorum*, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes a été effectué.

Le dosage des polyphénols a été effectué selon la méthode au test folin-ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard et la teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme de résidu sec (mg EAG/g RS) (Graham, 1992). La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (Bahorum et al., 1996) en utilisant comme standard la quercétine et elle est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de résidu sec (mg EAQ/g). Elle dépend de la formation d'un complexe doué d'une forte absorbance à la longueur d'onde 430nm.

Les teneurs en polyphénols totaux, polaire, apolaire, flavonoïde, et tanins représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 10) et illustrés graphiquement dans la figure 11:

Tableau 11 : les composés phénoliques de *Cladonia foliacea* et *Cétreliia olivetorum*.

	Polyphénols totaux mgEAG/g RS	Polyphénols polaire mgEAG/g RS	Polyphénols apolaire mg EAG/g RS	Flavonoïdes mgEAQ/g RS	Tanins mgEAT/g RS
<i>Cladonia foliacea</i>	474,80±31,8	309,767 ±31,86	165,04± 16,44	82,10±4,02	33,96±8,43
<i>Cétreliia olivetorum</i>	468,11± 50,17	197,47±4,78	270.64±47.17	76.45±1.27	11.78±5.54

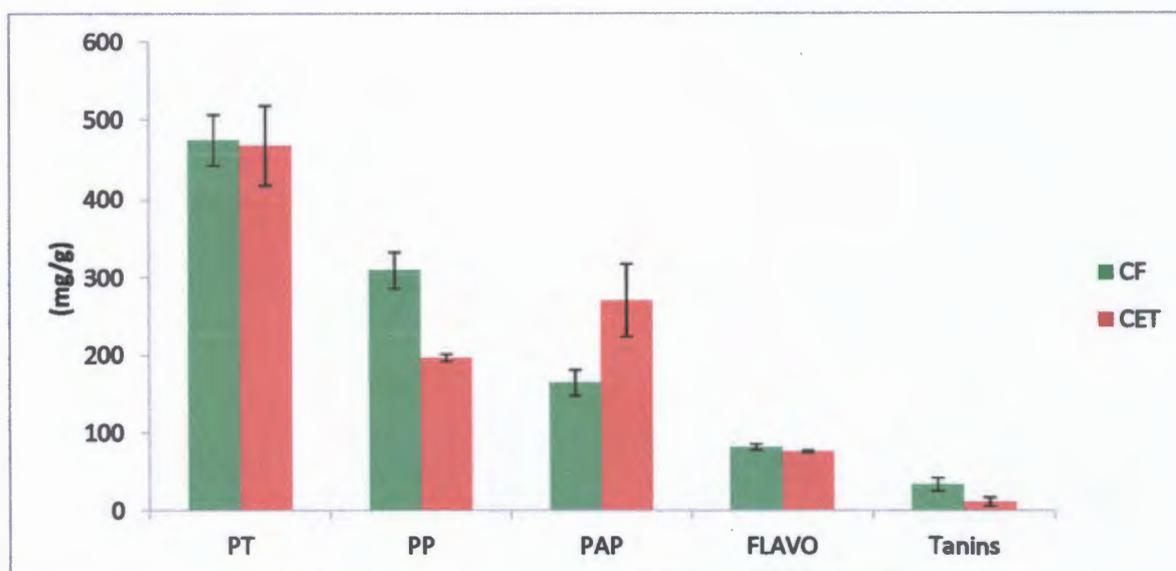


Figure 1 : Teneurs en polyphénols, des deux extraits lichéniques.

A la première lecture des résultats, nous constatons que la teneur la plus élevée a été enregistrée pour les phénols totaux dans les deux extraits méthanolique lichénique.

Cependant l'extrait de *Cladonia foliacea* comporte une plus grande teneur en polyphénols (totaux, polaire, sauf apolaire), flavonoïdes et tanins que l'extrait méthanolique de *Cetraria olivetorum* sauf de polyphénole apolaire dans cette cas le polyphénole apolaire de l'espèce *Cetraria* sont plus important que *Cladonia foliacea*.

I.2. Evaluation des Activités biologiques

I.2.1. Activité antioxydante

I.2.1.1 .Effet de piégeage du radical DPPH• :

Dans le but d'étudier quantitativement l'activité antiradicalaire des composés phénoliques des deux échantillons sélectionnés, nous avons utilisé la méthode quantitative au DPPH. Cette méthode consiste à ajouter une concentration connue de composés phénoliques au DPPH qui à l'origine présente une coloration violet . Une diminution de l'intensité de la couleur du DPPH, mesurée à 517 nm, reflète la présence de substances anti radicalaires dans le milieu.

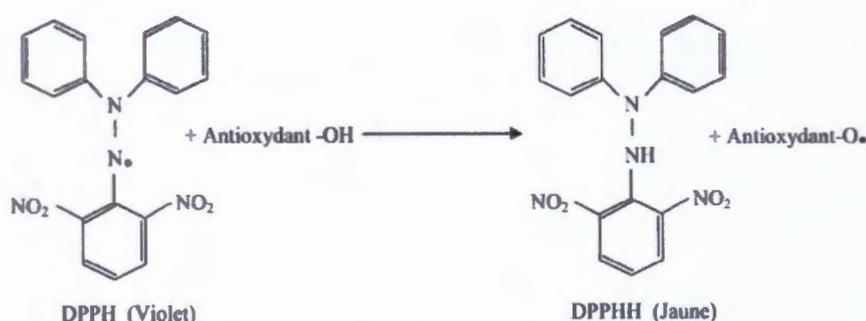


Figure12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits méthanolique lichénique.

La figure ci-dessous montre que les deux extraits méthanoliques présentent une capacité à piéger le radicale DPPH[•]. Le pourcentage d'inhibitions est différent d'une concentration à une autre. Néanmoins l'acide ascorbique présente la plus importante activité.

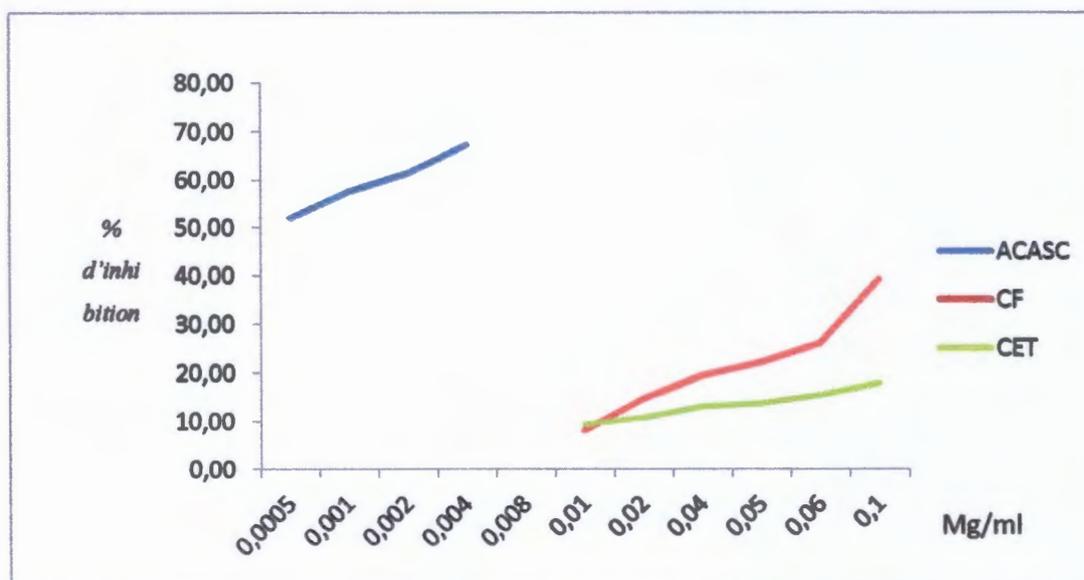


Figure 13 : Activité antiradicalaire des extraits méthanolique de deux espèces lichénique étudiées en comparaison avec l'acide ascorbique.

- **Calcul de la concentration inhibitrice IC₅₀**

Afin de comparer le pouvoir anti-radicalaire nous avons calculé l'IC₅₀ qui exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%, qui est déterminé graphiquement par la régression linéaire établie entre les pourcentages d'inhibition et les différentes concentrations, elle est exprimée en mg/ml (annexe); cependant plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus le pouvoir antioxydant de l'extrait testé est grand (Pokorny et al, 2001).

Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau suivants et illustrés graphiquement dans la figure 14:

Tableau 12 : Concentration inhibitrice de 50% du radical DPPH des extraits bruts de *Cladonia foliacea* et *Cétrilia olivetorum* et de l'acide ascorbique.

Les échantillons	IC ₅₀ (mg/ml)
Acide ascorbique	0.0005
<i>Cladonia Foliacea</i>	0.132
<i>Cétrilia</i>	0.42

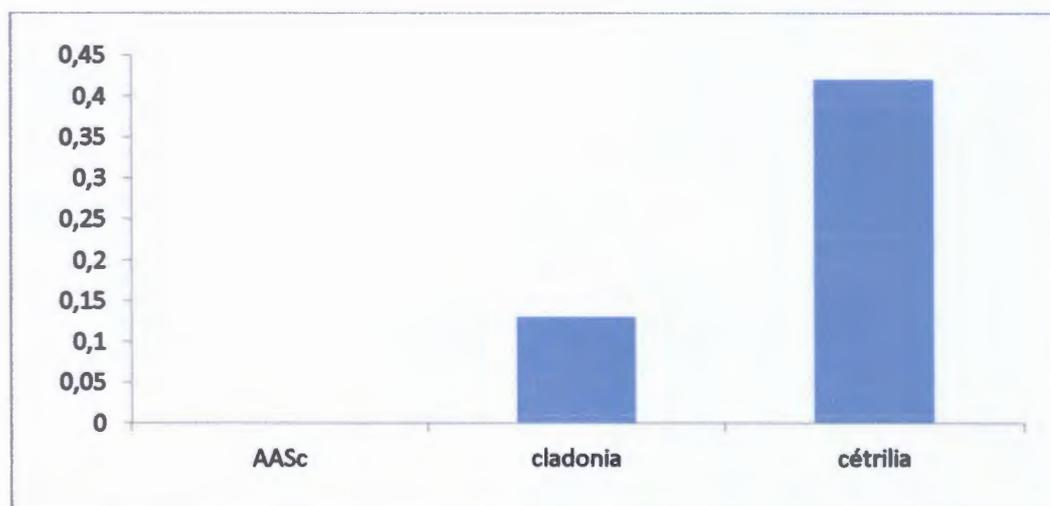


Figure 14: Valeurs d'IC₅₀ de nos extraits méthanolliques et de l'acide ascorbique.

Parmi les deux extraits lichénique étudié, l'espèce de *Cladonia foliacea* est la plus actif avec une IC_{50} de l'ordre de 0.132 mg/ml suivi par l'espèce de *cétrilia olivetorum* avec une IC_{50} de 0.42 mg/ml .en comparaison avec l'acide ascorbique ($IC_{50}=0.0005\text{mg/ml}$) les deux extraits sont moins actifs que l'acide ascorbique.

L.2.1.2 Test d'évaluation du pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur est basé sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par les composés antioxydants. Une augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé.

Pour comparer l'activité des différentes substances, on détermine le pouvoir réducteur par le calcul de la $CR_{0.5}$, elle est définie comme la quantité d'une substance en mg par ml de volume réactionnel qui donne une unité d'absorbance de 0.5 à 700 nm (Ardestani et Anparas, 2007).

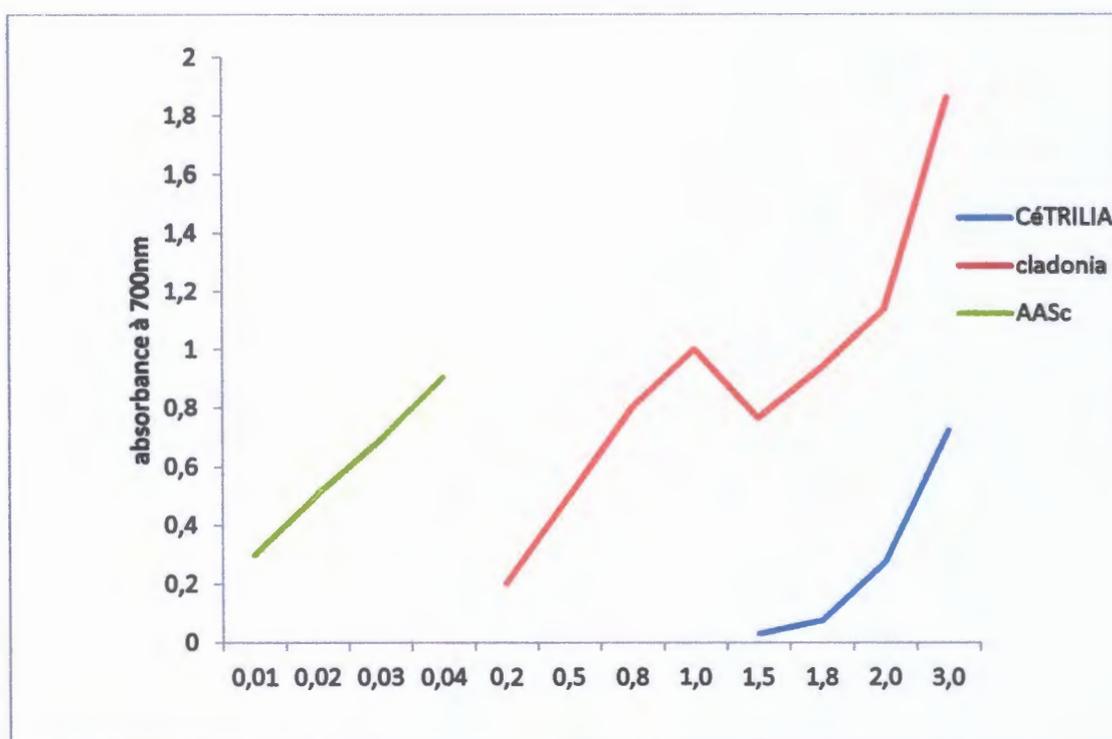


Figure15 : Activité antiradicalaire du pouvoir réducteur des extraits méthanolique respectivement de deux espèces lichéniques étudiées en comparaison avec l'acide ascorbique

Le pouvoir réducteur des deux extraits lichéniques évolue avec l'augmentation des concentrations. La figure (15) montre que le pouvoir réducteur de l'extrait de *Cladonia*

foliacea est plus important que celui de *Cétrelia olivetorum*, néanmoins le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique reste le plus important.

Les $CR_{0,5}$ calculés des courbes sigmoïdes qui figurent en (annexe) de l'acide ascorbique et des extraits confirment ce qu'on déduit des illustrations graphiques. Nous énumérant les différentes $CR_{0,5}$ dans le tableau 12.

Tableau13 : Concentration réductrice $CR_{0,5}$ des extraits bruts de *Cladonia foliacea*, de *Cétrelia olivetorum* et de l'acide ascorbique.

Les échantillons	$CR_{0,5}$ (mg/ml)
Acide ascorbique	0.007
<i>Cladonia foliacea</i>	1.98
<i>Cétrelia olivetorum</i>	2.074

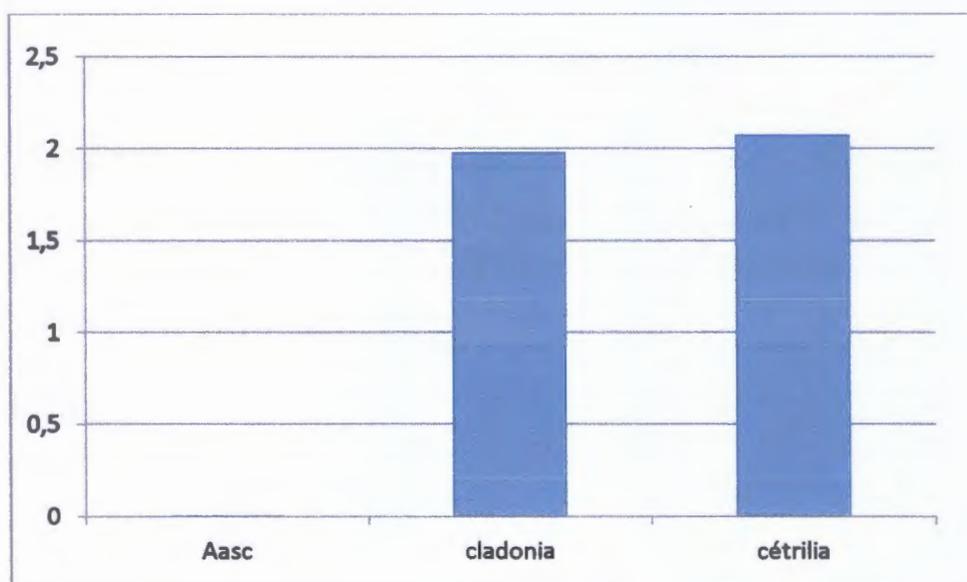


Figure n 16 : Valeurs d' $CR_{0,5}$ de nos extraits méthanolique et de l'acide ascorbique.

Ces résultats indiquent que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos extraits, cependant l'augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé (Kosanić et Ranković, 2011).

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique de *Cladonia foliacea* présente l'activité la plus importante pour réduire le fer par rapport à celle exercée par *cétrelia*, reflétée par les absorbances obtenues à différentes concentrations.

II. Etude toxicologique

II.1 Influence des traitements sur les paramètres du stress oxydant au niveau du foie:

L'évaluation de la toxicité des pesticides isolés et de leur mélange est exprimée par le dosage du glutathion (GSH), du malondialdéhyde (MDA), de la Catalase, du glutathion peroxydase (GSH- Px), au niveau de l'organe cibles (le foie).

Comme c'est indiqué dans la bibliographie par plusieurs recherches réalisés ; le foie est le siège du métabolisme, c'est l'organe majeur qui métabolise les différents xénobiotiques et toxiques auxquels s'exposent les êtres vivants, donc pour cela il est pris comme organe de référence pour situer un degré de toxicité des autres organes. Tel est notre cas ; on évalue le stress oxydatif au niveau du foie.

Les résultats sont représentés dans le **tableau 14** et illustrés aussi sous formes d'**histogrammes**.

Tableau14 : du taux de GSH, Catalase, GPX, MDA dans le foie des souris témoins et les souris traités après 7 jours de traitement.

/	T	L5sm	L50sm	L100sm	L200sm	L+MIX5	L+MIX50	L+MIX100	L+MIX200	MIXT	MAN CO	SUsO4	CHPRFS
GSH	7,74±1,3	6,36±3,55	3,65±6,79	2,22±2,41	1,45±2,05	/	/	/	1,34±1,3	9,44±2.94	3.18±2.11	3.27±2.4	/
Catalase	0.45±0.06	0.59±0.10	1.11±0.13	1.10±0.27	1.14±0.18	/	/	/	1.2±0.073	0.25±0.03	0.78±0.08	0.66±0.11	/
GSH - px	0.046±0.013	0.1±0.01	0.11±0.026	0.09±0.02	0.15±0.003	/	/	/	0.06±0.01	0.03±0.005	0.04±0.006	0.06±0.007	/
MDA	12.97±0.42	8.92±2.16	7.20±1.57	6.51±0.54	5.20±0.50	/	/	/	8.60±0.11	22.76±1.65	12.71±2.35	9.07±0.58	/

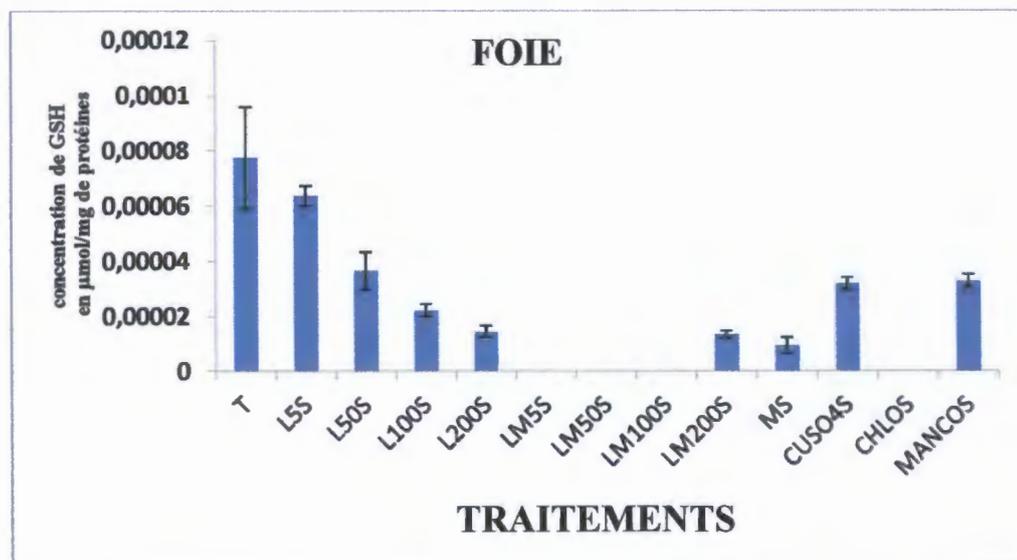


Figure 17 : Variation du taux de GSH (μ mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traitées après 7 jours de traitement.

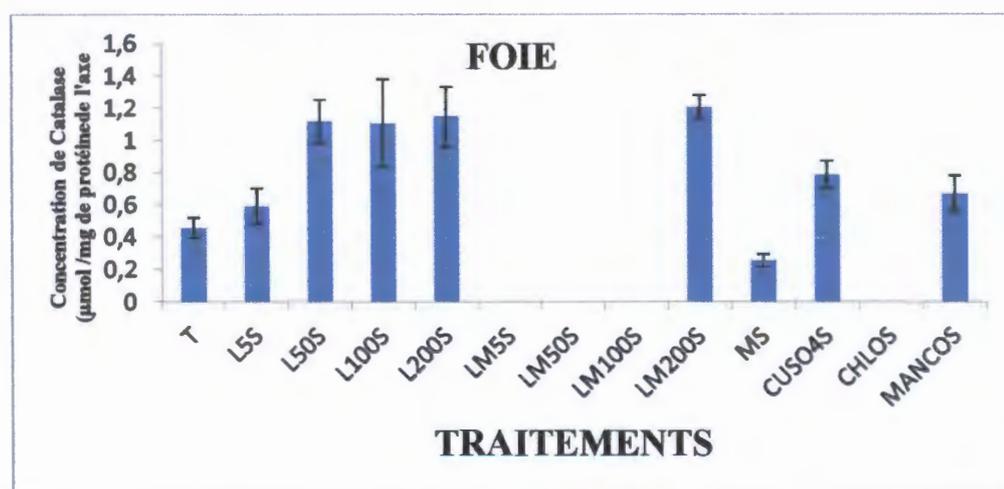


Figure 18 : Variation du taux de la catalase (μ mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traitées après 7 jours de traitement.

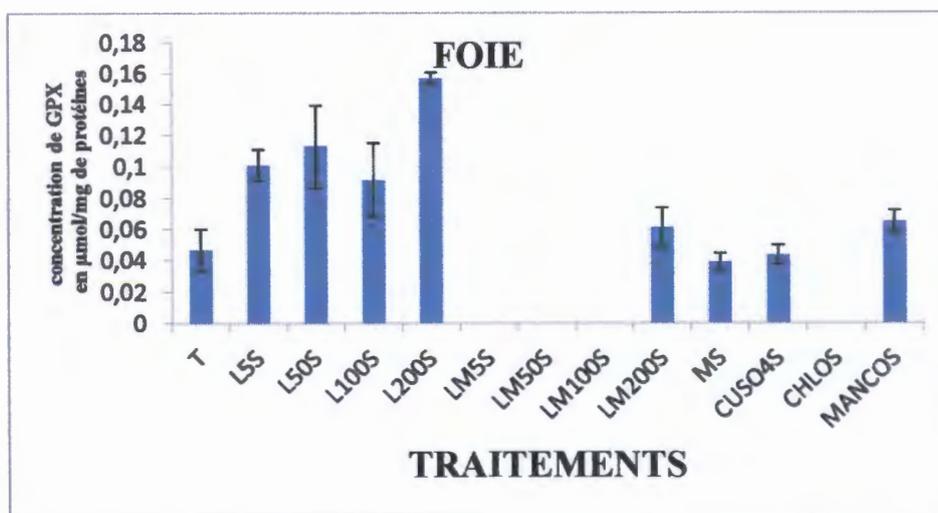


Figure 19 : Variation du taux de la GPX (μ mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traitées après 7 jours de traitement.

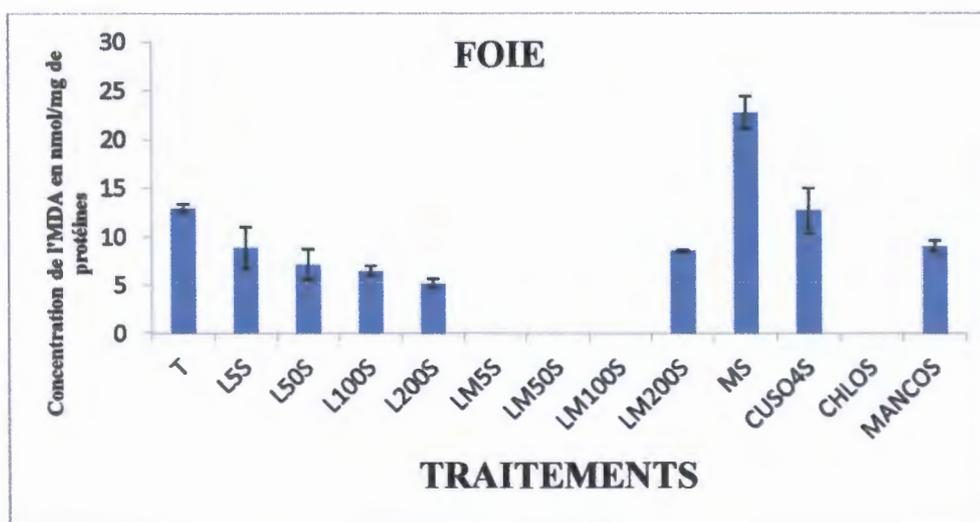


Figure 20 : Variation du taux de MDA (n mol /mg de protéine) dans le foie des souris témoins et les souris traitées après 7 jours de traitement.

Les lots des souris traités par les lichens avec la mixture des trois pesticides (L5MS, LMS50, LMS100) sont morte après trois jours de traitement, et le lot des souris traité par le chlorpyrifos sont mortes après un jour de traitement.

Les taux hépatiques de GSH et l'MDA sont diminués significativement ($p < 0.05$) chez les lots des souris traitées par les lichens sans mixture (L5, L50, L100, L200) par rapport au témoin, et aussi par rapport aux souris traitées par les lichens et les pesticides.

Par contre dans le taux de la GPX il ya une différence hautement significative ($p < 0.05$) chez les lots des souris traités par les lichens sans mixture (L5S, L50S, L100S, L200S) par rapport au témoin.

Il y a une différence significative entre les lots traités par les pesticides (Mix, MANCO, sulfate de cuivre) par rapport au témoin et aussi par rapport aux lots des souris traités par les lichens .

Les taux des activités de la catalase sont hautement significative ($P < 0,01$) chez les souris du lot traité par les extraits lichéniques et aussi le lot traité par le mélange des pesticides par rapport au témoin et il n'ya aucune différence significative ($P > 0,05$) des activités de la catalase chez les lots de mixture, de sulfate de cuivre et du mancozèbe par rapport au témoin.

Discussions de partie phytochimiques :

Le méthanol reste le solvant le mieux choisi pour extraire les antioxydants d'une plante (Sun et al. 2007). Pour cela nous avons choisi ce solvant pour l'extraction des différents composés phénoliques.

A partir des résultats obtenus nous constatons la richesse des extraits testés en composés phénoliques, notamment les phénols totaux et les flavonoïdes et tannins.

Les quantités en phénols totaux des deux extraits *cladonia foliacea* et *cétrilia* varient entre 474.8 et 468.11 mg AGE/ g RS. Néanmoins, la teneur en phénols totaux trouvée par les travaux de (Tatjana et al. 2011) montre une valeur de l'ordre (90.83 mg EAG/ g MS).

Concernant les quantités en flavonoïdes, on remarque que la teneur la plus élevée se trouve chez *cladonia foliacea* avec (82.1 mgEQ/gRS) contre (76.45 mgEQ/gRS) pour *cétrilia*. Cette variation peut être due à la nature de l'extrait, le protocole expérimental, la nature de substrat et la période de récolte.

Pour le dosage des tanins, on constate que la valeur la plus élevée est enregistrée dans l'extrait de *Cladonia foliacea* avec 33.96 mgET/gRS tandis que la valeur la plus basse a été trouvée dans l'extrait *Cétrilia* avec une valeur de l'ordre de 11.78 mgET/gRS. Aucune étude n'a été faite sur *Cladonia foliacea* vis-à-vis des tanins.

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la

simplicité de l'analyse (Bozin et al. 2008). Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier l'activité antioxydante de *Cladonia Foliacea*, nous avons remarquons que le pourcentage d'inhibition de DPPH de l'acide ascorbique et l'extrait de *Cladonia Foliacea* augmente avec la concentration de l'extrait. L'acide ascorbique est la substance la plus active avec une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 0.0005mg/ml par rapport à celle de l'extrait méthanolique de *cladonia foliacea* qui est de l'ordre de 0.13 mg/ml.

La présence des réductants dans un milieu donné cause la réduction du complexe Fe³⁺ferricyanide à la forme Fe²⁺. En effet, la formation de Fe²⁺ peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la densité de la couleur bleu du complexe ferreux du milieu. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Ozturk et al., 2007).

La capacité de réduction d'un composé est un indicateur significatif de son activité antioxydante (Sharma et al., 2012) la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺) est mesurée par la force de la couleur vert-bleu de la solution qui absorbe à 700 nm, cependant l'absorbance de l'extrait est proportionnelle à sa puissance réductrice cela confirme les résultats obtenus, les extraits testés ont un important pouvoir réducteur de fer, nos extraits ont montrés un pouvoir réducteur qui varie en fonction de concentration.

Cela est probablement dû à la présence des groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électron qui peuvent réagir avec les radicaux libres pour les transformer en des produits plus stables (Sasikumar et al., 2010).

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur des extraits lichéniques est un indicateur significatif de leurs activités antioxydantes, cette activité est toujours corrélée avec la teneur élevée en phénols totaux (Plaza et al., 2014 ; Grujicic et al., 2014).

Selon (Yang et al. 2008), la capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Beaucoup de publications ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim et al. 2001).

L'acide ascorbique possède une activité réductrice plus importante que l'extrait de *Cladonia foliacea* avec une valeur de 0.00721mg/ml. L'extrait de *Cladonia foliacea* possède une valeur de $CR_{0.5}$ égale à 1.98mg/ml. Par contre *Cétrilia* possède la valeur le plus élevé à 2.179mg/ml, c.-à-d. que cet extrait a une capacité de réduire le fer.

Les résultats obtenus, pour l'extrait *Cladonia foliacea* qui possède une grande activité, suggèrent que ce dernier a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs, les convertissant en espèces non-réactives plus stable et terminant, ainsi, la réaction en chaîne des radicaux libres. En parcourant les résultats obtenus, présentent presque les mêmes activités pour réduire le fer. Nous avons remarqué que *Cladonia Foliacea* ont présenté des activités antioxydantes modérées par rapport à l'acide ascorbique.

Discutions de la partie Etude toxicologique

Le rôle des pesticides est d'abord apparu essentiel, leurs effets secondaires nocifs ont été rapidement mis en évidence.

C'est pour cela nous avons choisi pour notre étude un mélange de pesticides les plus utilisés dans l'agriculture (Mancozèbe, Chlorpyrifos et sulfate de cuivre).

Ce travail, consiste à étudier l'impact de ce mélange sur la variation de certains paramètres biochimiques et toxicologiques, ainsi que l'effet protecteur de l'extrait lichénique de *Cladonia Foliacea* chez des souris recevant ce mélange par voie orale durant 07jours de traitement.

Notre organisme est en permanence soumis a un stress oxydant susceptible d'endommager les différentes cellules dans différents organes tels que le foie, les reins, et d'induire des pathologies diverses (**Gutteridge et Halliwell, 1994**).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact de ces polluants toxiques (chlorpyrifos, mancozèbe sulfate de cuivre)) sur la variation de certains paramètres physiologiques de l'organisme tels que la CAT , leGSH , la GPX , et enfin le MDA.

La mortalité des souris dans les lots (LSM5,LSM50,LSM100) était liée à la dose de la mixture. Concernant les lichens, éventuellement cette mortalité élimine la possibilité d'un effet protecteur.

La mortalité des souris traités par le pesticide le chlorpyrifos indique que ce pesticide est doté d'un pouvoir toxique important.

Le chlorpyrifos, comme tous les autres organophosphorés, exerce son action notamment par une inhibition de l'activité des acétylcholinestérases (**Richardson et al., 1993**). En dépit de ce mode d'action spécifique, les effets toxiques de chlorpyrifos se manifestent également par des dysfonctionnements hépatiques sévères. Il a été montré que l'exposition aiguë ou chronique à cet insecticide induisait une élévation importante des transaminases AST et ALT (**Goel.2000**)

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 de ROS (Reactive Oxygen Species) induite par ce pesticide in vivo.

C'est ainsi que plusieurs auteurs proposent le stress oxydant comme le mécanisme clé de la toxicité du Chlorpyriphos (**Miyazaki, 2001**).

Dans des études réalisées in vitro, une diminution de l'activité de la catalase, suite à une exposition aux pesticides, a été rapportée (**Malik, 1982**).

Le taux de l'MDA augmente proportionnellement aux concentrations des pesticides témoignant ainsi la survenue des dommages au niveau des membranes cellulaires. Ce résultat est en accord avec les résultats d'autres études qui ont mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique après traitement par les pesticides .(**Kehrer,1993 ; Ahmed et al.,2000**).

Les résultats de l'étude in vivo montrent que le traitement des souris par LM200 mg/kg des pesticides pendant set jour engendre une augmentation significative de l'activité de la CAT, mais aussi des niveaux diminués de MDA. Par contre la mixture engendre une diminution de l'activité de la CAT, mais aussi une élévation de l'MDA.

Administrés en association, les trois pesticides provoquent une diminution significative de l'activité enzymatique antioxydante CAT par rapport à celle des témoins ($p < 0,01$), une augmentation drastique des taux de MDA ($p < 0,001$), ainsi qu'une déplétion très remarquée du glutathion hépatique ($p < 0,001$). Il se peut donc qu'il existe un antagonisme entre les trois pesticides agissant en simultanéité. En effet, comme la multi exposition aux pesticides augmente, on constate une diminution de la toxicité du chlorpyrifos en présence des pesticides CUSO_4 et MANC chez les souris.

On déduit aussi qu'il y a un effet prometteur de l'extrait de *Cladonia foliacea* a fort activité antioxydante. Les résultats obtenus ont permis d'affirmer que l'extrait de *Cladonia foliacea* présente des activités antitoxique assez intéressantes.

(Rankovic et al.,2011), ont démontré que les extraits des lichens testés à savoir *Cétrelia olivetorum* et *Cladonia foliacea* ont une fortes activité antioxydante contre les différentes systèmes d'oxydation in vitro. Effectivement on a constater dans notre expérimentation que *Cladonia foliacea* présente des taux intéressants en polyphénols et flavonoïdes et sont activité antioxydante est bien importante elle présente des IC_{50} et des $\text{CR}_{0,5}$ de l'ordre de 0.132mg/ml et 1.98 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusion Général

Dans le cadre de la détermination de quelques composées lichéniques à intérêt économiques et écologiques, notre travail a entamé une étude phytochimique de deux extrait lichéniques (*Cladonia foliacea* et *Cétrilia*).

En premier lieu , nous nous sommes intéressés à quantifier certain métabolite secondaires comme les phénols totaux , les flavonoïdes et les tannins par des technique de dosage colorimétrique qui nous permis d'obtenir des résultats qui montrent des teneurs différents chez les deux espèces étudiées dans l'extrait méthanolique.

Afin d'isoler de nouvelles substances permettant de mettre au nouvelles voies d'application tant dans les domaines de la pharmacie, de la cosmétique.

Les polyphénols sont connus d'être un groupe a étudier par d'autres chercheurs. Par exemple.(**Rankovic et al,2011**) qui ont démontré que les extraites de lichen testes de *Cétrilia* et *Cladonia Foliacea* ont une fortes activité antioxydant contre les différentes systèmes d'oxydation in vitro.

Ce travail démontre le rôle antioxydant de nos extraites lichéniques après une analyses in vitro de la capacité d'inhibition des enzymes productrices de radicaux libres qui sont à l'origine à l'origine de stress oxydant (les pouvoir réducteur) ainsi l'activité anti radicalaire des extraites méthanolique contre le peroxyde d'hydrogène les DPPH qui sont des radicaux stables représentent les radicaux libres existant dans la cellule.

De nombreuses études épidémiologiques suggèrent une corrélation entre l'utilisation professionnelle des pesticides et l'apparition de certaines pathologies dans les populations concernées. Des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne des pesticides ont été mis en évidence chez l'animal. La question des risques pour l'homme est donc posée tant au niveau professionnel qu'à celui du consommateur.

Dans le but d'évaluer les effets toxiques d'un mélange des pesticides (Mancozèbe, Chlorpyrifos, et sulfate de cuivre), et de tester les effets protecteurs de la supplémentation de l'extrait lichénique de *Cladonia foliacea* notre étude in vivo a été réalisée sur des souris /antioxydant (MDA, GP_X, Catalase, GSH) au niveau du foie.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- ✓ L'administration de mélange chez les souris, a engendré :

- **ACTA., 2005.** Index Phytosanitaire .41ème. Association de Cordination Technique Agricole. France. pp. 820.
- **Agaist oxidative and UV induced cellular damages 2007.** *Pharmacognosy Reviews,1*, 30-40.
- **Ahmed RS, Seth V, Pasha ST, Banerjee BD, 2000.** Influence of dietary (Zingiber officinales Rosc) on oxidative stress induced by malathionin rats. *Food Chem Toxicol* ; 38 : 443-50.
- **Alain periquet.,2000.**pesticide risques; sécuritéalimentaire, comité sécurité alimentaire d'aprifel, paris,-Toulouse p125.
- **Andraud-Dieu A , 2015,** Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimiques de trois lichens & approche synthétique de deux composes actifs, Université de Limoges. U.F.R. Sciences Médicales et Pharmaceutiques Laboratoire de Pharmacognosie et de Mycologie Equipe de recherche : Produits Naturels – Synthèses – Chimie Médicinale. P11-12
- **Anne BAUWENS ; 2003 ;** les lichen et la qualité de l'air ; (UCL – Scienceinfuse - Antenne Facultaire pour la Promotion des Sciences)
- **Anne bauwens ; 2003 ;** les lichen et la qualité de l'air ; (UCL – Scienceinfuse - Antenne Facultaire pour la Promotion des Sciences)
- **Ardestani et yazd Anparas ,T,2007.**Antioxydant and freeradical seavenging potontil of achillea santolina extracts .*food chem.*,104:221-229
- **Asahina Y, Shibata S. (1971).** Chemistry of Lichen Substances. Tokyo, Japan: Japan Society for the Promotion of Science.
- **Aubertot J-N. Barbier J-M, Carpentier 2005.**pesticide agricultures et environnementaux, Quea ,sl , p118.
- **Bahorum, T., Gressier, B., Troitin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-Forsch* 46, 1086-1089.
- **Bakke, j. e., and price, c.e. 1976.** metabolism of o, o-dimethyl-o-(3,5,6-trichloro- 2-pyridyl) phosphorothioate in sheep and rats and of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in sheep. *j environ sci health b* 11, 9-22.in m benziane ahmed djihad 2014.
- **Bassil K. L ; Vakil C ; Sanborn M ; Cole D. C ; Kaur J. S and Kerr K. J., 2007.** Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Can Fam Physician.* 53(10); 1704-1711.

- **Bazin, M.-M.; Le Lamer, A.-C.; Delcros, J.-G.; Rouaud, L.; Uriac, P.; Boustie, J.; Corbel, J.-C.; Tomasi, S. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2008**, 16, 6860–6866.
- **Beckman C.H.** Phenolic-storing cells : keys to programmed cell death and periderm formation
- **Behera, B. C.; Mahadik, N.; Morey, M. Pharmaceutical Biology 2012**, 50 (8), 968-979.
- **Berenbaum MC ,1981** Criteria for analyzing interactions between biologically active agents, *Advances in Cancer Research*, 35:269-335 i.
- **Bessadottir, M.; Egilsson, M.; Einarsdottir, E.; Magnusdottir, I. H.; Ogmundsdottir, M. H.; Omarsdottir, S. Bézivin, C.; Tomasi, S.; Rouaud, L.; Delcros, J. G.; Boustie, J. 2004**, *Planta Medica* , 70 (9), 874-877.
- **Biongham E ; cohrrsen B ; Powel CH., 2013.** (Eds)-Patty's toxicology. 830 In Bonnard N, Jargot D, Falcy M.2010. Fiche toxicologique de cuivre. Paris. N°294.boumerdes. P 10 11 12 35 57.
- **Bliss CI ,1939**,The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol*, 26:585-615
- **Boseret L 2000.** Pollution Des sols : Les pesticides.
- **Boustie;Joel ,2013**, Les Lichens et les cosmétiques, Université de Rennes 1
- **BOWEN R.** (page visitée le 26 Décembre 2007). Site : Biology.about.com [en ligne].
- **Bradford ; M.M., 1976.**A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. In. Krim M., 2014. L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats, Université Badji Mokhtar – Annaba, P 83-84.
- **Brisdelli, F.; Perilli, M.; Sellitri, D.; Piovano, M.; Garbarino, J. A.; Nicoletti, M.; Bozzi, A.; Amicosante, G.; Celenza, G. Phytotherapy Research 2013**, 27 (3), 431-437.
- **Brodo M.I Sharnon S.D and Sharnon S ., 2001.** Lichens of North America. New Haven and London: Yale University Press P 213.
- **Burkholder, P. R.; Evans, A. W.; McVeigh, L; Thornton, H. K. 1944 ;**Proceedings of the National Academy of Sciences , 30 (9), 250-255.
- **Cardarelli, M.; Serino, G.; Campanella, L.; Ercole, P.; De Cicco Nardone, F.; Alesiani, O.; Rossiello, F;1997.** Cellular and Molecular Life Sciences , 53, 667-672.in **Cluzeau S ; Patunelle MC, Lhoutellier C .2000.**Index phytosanitaire. Association de coordination technique agricole, ACTA, Paris. 644 p.
- **Cassee F, Groten J, Van Bladeren J, Feron V, 1998,** Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures, *CRC Crit Rev Toxicol* 28:73–101.OMS (2010) WHO Health and Environment e-News, February 2010, Issue 19 (disponible le 01/12/2010 à : http://www.who.int/entity/phe/e_News_19.pdf

- **CAUSEY WHITTOW G. : Sturkie's avian physiology 2002.** 5^e édition. *Academic Press*. 685p.
- **CPP, 2002.** Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. *Comité de la Prévention et de la Protection*. <http://www.ecologie.gouv.fr/PPP-Rapport-2002-02-Risques.html>. In. MERHI Maysaloun; 2008; Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines Et sur le système hématopoïétique murin ; doctorat de l'université de Toulouse ; Discipline ou spécialité : Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition ; p16-
- **D. Ribera, J. Taberly, 2011,** Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques, Etude RECORD n°08-0668/1A, p3
- **Dan Y. ,2008.** Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 44:149-161
- **Derache R .1986.** Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation– Lavoisier : Paris. 299-321p. Derache R (1986) Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation– Lavoisier : Paris. 299-321p.
- **Descotes J, Testrid F FrantzP, 1992.** Les urgences toxicologie .Edition malouin ,1992 : dépôt légae : mars 1992, ISBN N°2-224-020.60.0.
- **Ève Boileau ; 2015;** écotoxicologie et impacts sanitaires des pesticides en réponse à l'augmentation des ravageurs amenés par les changements climatiques : portrait, perspectives et recommandations ; maîtrise en environnement université de Sherbrooke ; p27
- **fanny louat;2013 ;**etude des effets de l'exposition aux insecticides chez un insecte modèle, drosophile melanogaster ; docteur de l'université d'Orléans discipline/ spécialité : génétique cellulaire et moléculaire :p5
- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant .Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* .108-115.
- **Feurerer, T.; Hawksworth, D. L. 2007,** Biodiversity and Conservation, 16, 85-98. et 505, boul. de Maisonneuve Ouest Montréal (Québec), p9.
- **Flohe L ; Gunzler W.A., 1984.** Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol*. In. Krim M., 2014. L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats, Université Badji Mokhtar – Annaba, P78-80.

- **Frank c.LU, 1992**, toxicologie du système nerveux, IN, toxicologie, Omasson, paris,p2822-2-
- **Gardini Brandão,L. F.**; Alcantara, G. B.; Cepa Matos, M. de F., Bogo, D.; Santos Freitas, D. dos; Oyama, N. M.; 505, boul. de Maisonneuve Ouest Montréal (Québec), p9
- **Glad, T**; Barboza, P.; Mackie, R. I.; Wright, A.-D. G.; Brusetti, L.; Mathiesen, S. D.; Sundset, M. A. Current, .2004
- **Goel A, Chauhan DP, Dhawan DK 2000**. Protective effects of zinc in chlorpyrifosinducedhepatotoxicity: abiochemical and trace elementalstudy. Biol Trace ElemRes ; 74 : 171-83..
- **Graham, H.D., 1992**. Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and food chemistry* 40, 801-805.
- **Habib el azzouzi ; 2013** ; processus physico-chimiques d'élimination des pesticides dans l'environnement : cas de l'imazéthapyr; thèse de doctorat; discipline : chimie spécialité : chimie physiquep13
- **Habig W.H ; Pabst M.J ; Jakoby W.B., 1974**. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, In. Krim M., 2014, L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats, Université Badji Mokhtar – Annaba, P 80-81.
- Harborne J.B. 2013, Introduction to Ecological Biochemistry, 2nd edition, Academic Press, New York, Honda, N. K. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 61 (2), 176-183.
- **Huneck S, Yoshimura I ,1996**; Identification of Lichen Substances. Heidelberg: Springer
- **Huneck s., 1999**.The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86(12) :p559-570.Ingolfsdottir k ; Chung G.A.C ; Skulason V.G ; Gissurason S.R and VikhelmsdottirM., 1998. Antimycobacterial activity of lichen métabolites in vitro.*European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6(2).P141-144.
- **Huneck s., 1999**.The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86(12) :p559-570.Ingolfsdottir k ; Chung G.A.C ; Skulason V.G ; Gissurason S.R and VikhelmsdottirM., 1998. Antimycobacterial activity of lichen métabolites in vitro.*European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6(2).P141-144.
- **Isabelle BALDI ; 2013**,Pesticides - Effets sur la santé, Les éditions Inserm, 2013 101 rue de Tolbiac, 75013 Paris Substances à mesurer en priorite. Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. [Internet]. 2006 [cite 2010 nov. 15];Availablefrom: www.afsset.fr

- **Jakubowski, M., and Trzcinka-Ochocka, M., 2005.** Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health.* 47(1); 22-48.
- **Joel Boustie ,2013,** Les Lichens et les cosmétiques, Université de Rennes 1

Journal of Drug Delivery Science and Technology 2005, 15 (5), 355-361.

- **Kamrin, M. A. 1997.** Environmental risk harmonization: federal/state approaches to risk assessment and management. *Regul Toxicol Pharmacol* 25, 158-16. In M Benziane Ahmed Djihad 2014.
- **Katalin molnár¹ and edit farkas; 2010 ;** biological activities of secondary lichen metabolites; Duke University, Department of Biology, Durham, NC 27708-0338, USA. Fax: +1 91 96 60 72 93. E-mail: kmcz100@gmail.com Institute of Ecology and Botany, Hungarian Academy of Sciences, H-2163 Vacratot, Hungary ;p3
- **Kehrer JP,1993.** Free radical as mediator of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*; 23 : 21-48.
- **Keskas,N 2011.** Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine
- **Koparal, A. T.; Tüylü, B. A.; Türk, H,2006.** *Natural Product Research*, 20 (14), 1300-1307.in
- **Kupchan, S. M.; Kopperman, H. L. Experientia 1975,** 31 (6), 625-625.
- **Lauterwein, M.; Oethinger, M.; Belsner, K; Peters, T.; Marre, R. 1995,** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 39 (1), 2541-2543.
- **Lawrey JD. 1989.** Lichen secondary compounds, evidence for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function. *Bryologist*, 92, 326–328.
- **Liz Highleyman et alan franciscus 2004.** une série de fiches de renseignements rédigées par des experts en matière de maladies du foie. hepatitis c support project - hcsp • version 1.0. in m benziane ahmed djihad 2014 mémoire effet d'un régime enrichi en chlorpyrifos chez le rat wistar: étude de l'activité enzymatique des cholinestérases comme indicateur biologique.
- **Loewe S, Muischnek H ,1926,** Effect of combinations: mathematical basis of problem, *Arch. Exp. Pathol.*
- **Maamri S. (2008).** Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud algérien,p214 .
- **Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006.** Les Polyphénols en agroalimentaire,*Lavoisier*, p28.
- **MADHUN Y.A., FREED V.H., 1990.** Impact of pesticides on the environment. In *Pesticides in the soil environment.* Soil Science Society of America Book Series, no. 2,

- Madison, WI, USA, 429-466. In: Hayo M. G. van der Werf, 1997, évaluer l'impact des pesticides sur l'environnement, INRA, station d'Agronomie, BP 507, 68021 Colmar, p62
- **Malik J, Summer K, 1982.** Toxicity and metabolism of malathion and its impurities in isolated rat hepatocytes: role of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*; 66 : 69-76.
 - **Meda A ; Lamien C.E ; Roraito M ; Millogo J ; Nacoulma O.G., 2005.** Détermination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. In: Branislav R; Marijana M et Tatjana P; 2011. *Antioxidant, Antimicrobial and anticancer of the lichen Cladonia furcata, Lecanora atra and Lecanora muralis*-ISBN: 3:1034-1039.p. 571-577.
- **Merhi M., 2008.** Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. P213-249 .
- **Mills PK ; Yang R ; Riordan D., 2010.** Lymphohematopoeietic cancers in the United from Workers of America(UFW) 1988-2001.cancer causes control.2005.Sep; 16 (7) :823-830 In Bonnard N, Jargot D, Falcy M. Fiche toxicologique de Mancozèbe. Paris. N°277.
- **Miyazaki Z, Hodgson GC 2001.** Chronic toxicity of dursban and its metabolites, 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in chickens. *Toxicol AppPharmacol* ; 23 : 391-8.
 - **N. Keskas 2011.** Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine
 - **Nicole BONNEFOY, 2013 ;** FAIT au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement (1), rapport d'information n° 42 ; p18.
 - **Ohkawa H ; Ohishi N ; Yagi K., 1979.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, In Krim M., 2014. L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats, Université Badji Mokhtar – Annaba, P 77-78.
 - **Onil Samuel et louis saint –Laurent, 2001** Guide de prévention pour l'utilisation de pesticide en agriculture maraichère, IRSST - Direction des communications
- Oxydoreductase des extraits de *Cachrys libanotis* .L Mémoire de Master Université de SETIF p 18
- 31 *Pharmakol*, 114:313-326 in. *Plant Pathology* 2000, 57, 101-110.
- **Ribera, j. taberly, 2011,** Mélanges de polluants, toxicité, écotoxicité et évaluation des risques, Etude RECORD n°08-0668/1A, p3
 - **Richardson DHS. (1988).** Medicinal and other economic aspects of lichens. In: Galun M, ed. *Handbook of Lichenology*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, pp. 93–108.in
 - **Richardson RJ, Moore TB, Kayyali US, Fowke JH, Randall JC,1993.** Inhibition of henbrainacetylcholinesterase and neurotoxicesteraseby chlorpyrifos in vivo and kinetics of

- inhibition by chlorpyrifosoxon in vitro: application to assessment of neuropathic risk. *Fundam Appl Toxicol* ; 20 : 273-9.
- **Rowe, J. G.; Saenz, M. T.; Garcia, M. D. 1989**, *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 47 (2), 89-94.
 - **Rundel, P. W. 1978**, *Biochemical Systematics and Ecology*, 6, p 157-170.
 - **Santos, N. P.; Nascimento, S. C.; Silva, J. F.; Pereira, E. C. G.; Silva, N. H.; Honda, N. K.; Santos-Magalhães, N. S 1993**.
 - **Severn D.J., BALLARD G., 1990**. Risk/benefit and regulations. In *Pesticides in the soil environment*. Soil Science Society of America Book Series, no. 2, Madison,
 - **Shrestha, G.; St Clair, L. L. Phytochemistry Reviews 2013**, 12, 229-244.in
 - **Slinkard K ; Singleton V.L., 1997**. Total phenolic analyses: automation and comparison with manual method. In. Branislav R ; Marijana M et Tatjana P., 2011. Antioxidant. Antimicrobial and anticancer of the lichen *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. ISBN:3:1034-1039.p.49-55.
 - **Sundset, M. A.; Barboza, P. S.; Green, T. K.; Folkow, L. P.; Schytte Blix, A.; Mathiesen, S. D. 2010**, *Naturwissenschaften* , 97, p 273-278.
 - **Susithra, E.; Mallikarjuna Rao, K.; Ramseshu, K. V.; Meena, S. Journal of Pharmacy Research 2011**, 4 (2), 352-355.
 - **Swarnlata Saraf, Mahendra Singh Ashawat, Shaileendra Saraf, 1997**. *Flavonoids : A Nutrition Protection*.
 - **Thadhani, V. M.; Choudhary, M. I.; Ali, S.; Omar, I.; Siddique, H.; Karunaratne, V. Natural Product Research 2011**, 25 (19), 1827-1837.
 - **UFR Sciences de la vie et de l'environnement, Equipe de recherche : Produits Naturels – Synthèses – Chimie Médicinale, p5**.
 - **Van Haluwyn, C.; Asta, J.; Gavériaux J.-P., Guide des lichens de France : lichens des arbres. 2009**, Belin (Ed.) 231p.in (**Amandine Andraud-Dieu, 2015**, Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimiques de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs, Université de Limoges, U.F.R. Sciences Médicales et Pharmaceutiques Laboratoire de Pharmacognosie et de Mycologie Equipe de recherche : Produits Naturels – Synthèses – Chimie Médicinale. ; P11-12
 - **Varita KO. (1973)**. Antibiotics in lichens. In: *The Lichens*. Academic Press New York, pp. 547–561. IN **Varita KO. (1973)**. Antibiotics in lichens. In: *The Lichens*. Academic Press New York, pp. 547–561.in (**Vasudeo P. Zambare and Lew P. Christopher, 2012**, Biopharmaceutical potential of lichens, *Pharmaceutical Biology*; 50(6): © Informa Healthcare USA Pharmaceutical

- Biology, 2012; 50(6): 778–798 © 2012 Informa Healthcare USA, Inc. ISSN 1388-0209 print/ISSN 1744-5116 online, p781-782,
- **Vasudeo P. Zambare and Lew P. Christopher, 2012**, Biopharmaceutical potential of lichens, *Pharmaceutical Biology*; 50(6): © Informa Healthcare USA *Pharmaceutical Biology*, 2012; 50(6): 778–798 © 2012 Informa Healthcare USA, Inc. ISSN 1388-0209 print/ISSN 1744-5116 online, p781-782 Verlag, Berlin.
 - **Verma, N.; Behera, B. C.; Sharma, B. O.** Hacettepe Journal of Biology and Chemistry **2012**, 40 (1), 7-21.
 - **Vital.** (page visitée le 26 Décembre 2007). Site Doctissimo, [en ligne]. Adresse URL:
 - **Weckbecker G ; Cory JG., 1988**, Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depended mouse leukaemia L 1210 cells n vitro. *Cancer Lett* .In. Krim M., 2014. L'importance des antioxydants (Gingembre) dans la réduction des effets toxiques induits par les chromates chez les rats, Université Badji Mokhtar – Annaba. P 75-77.
 - www.doctissimo.fr/html/dossiers/hepatites/sa_5059_foie_organe_multifonctions.htm
 - **Zambare, V. P.; Christopher, L. P. 2012**, *Pharmaceutical Biology*, 50 (6), 778-798.

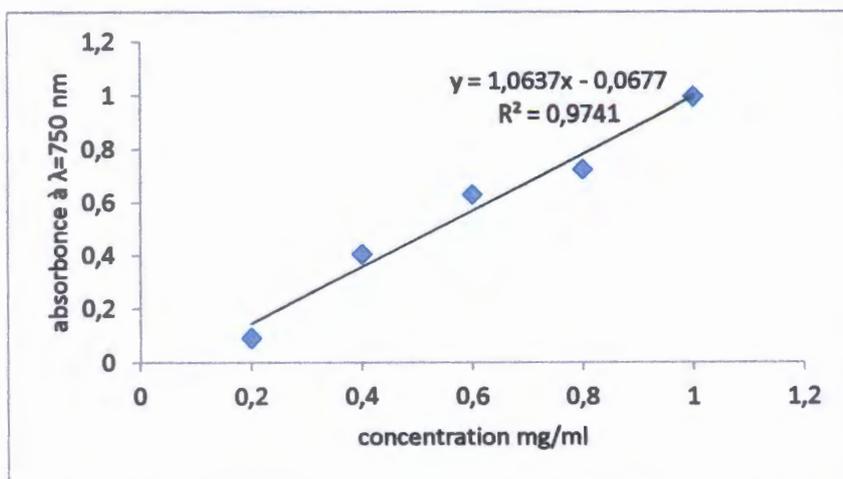


Figure 1 : courbe d'étalonnage d'acide gallique.

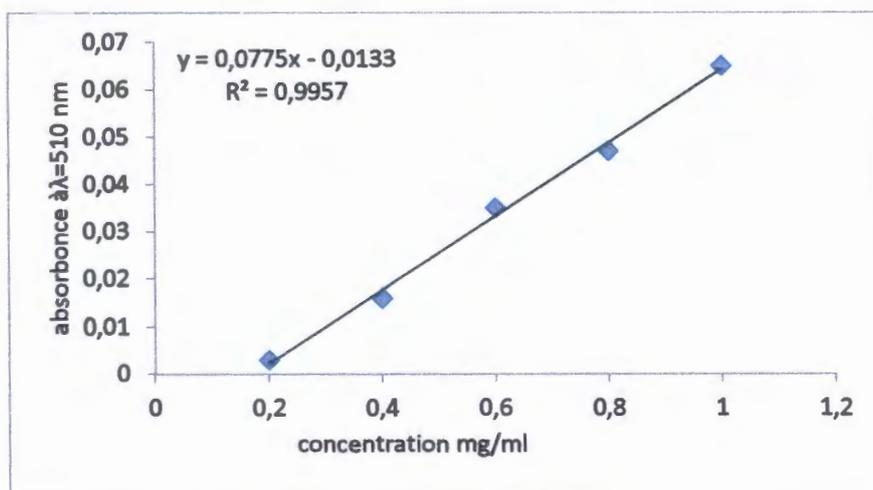


Figure 2 : courbe d'étalonnage d'acide tannins.

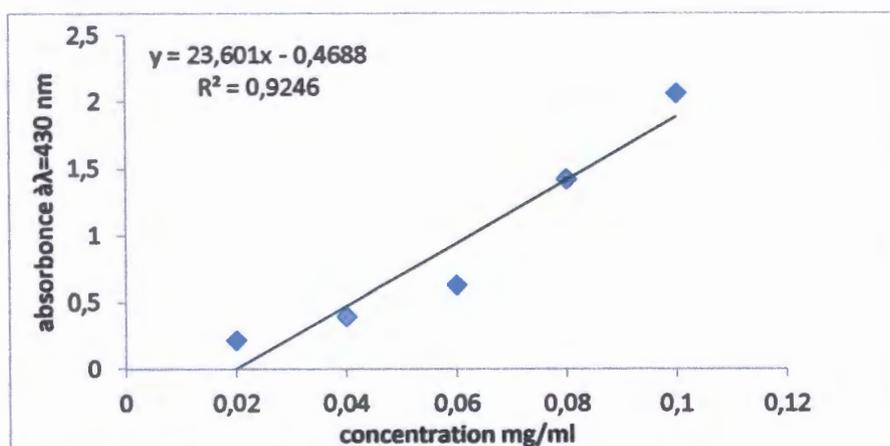


Figure 3 : courbe d'étalonnage d'acide quercitrine.

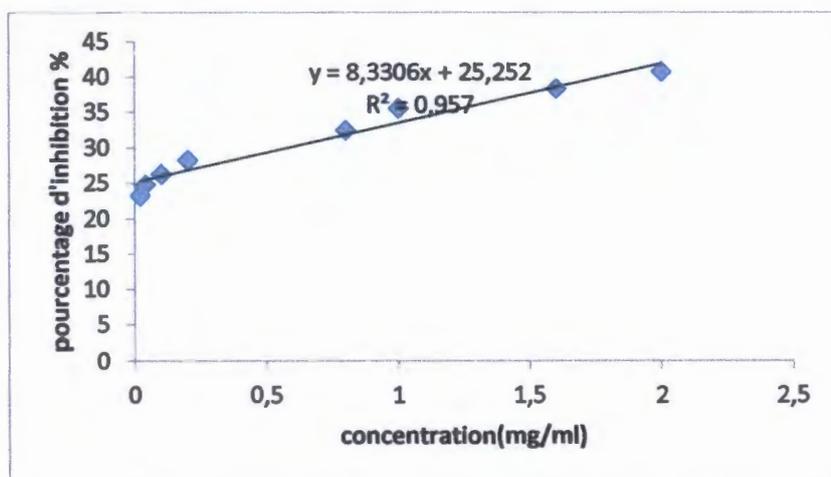


Figure 4 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH d'acide ascorbique.

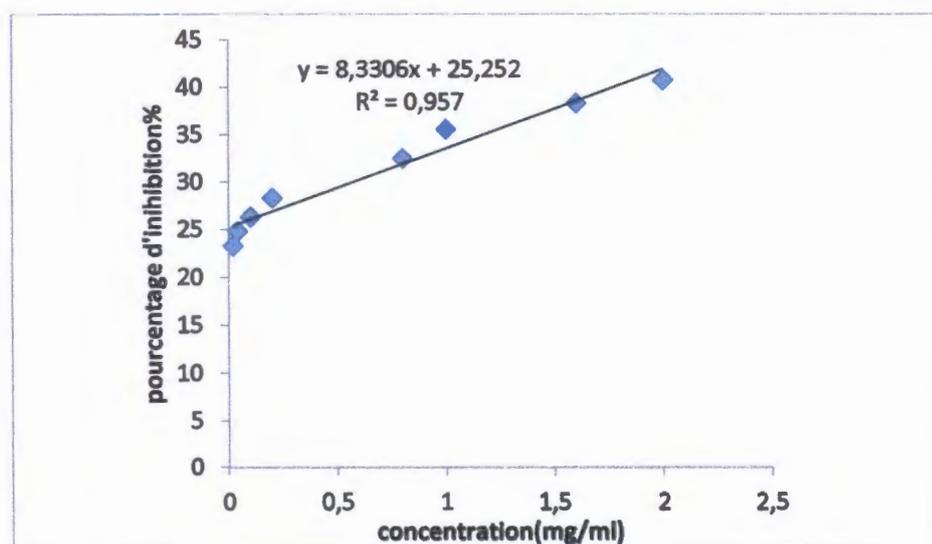


Figure 5 : pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de *cétrilia*.

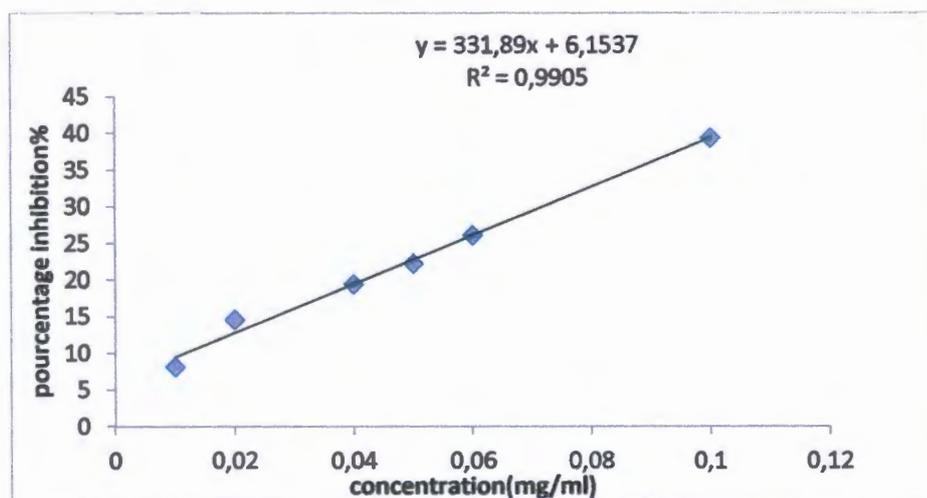


Figure 6: pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de *cladonia*.

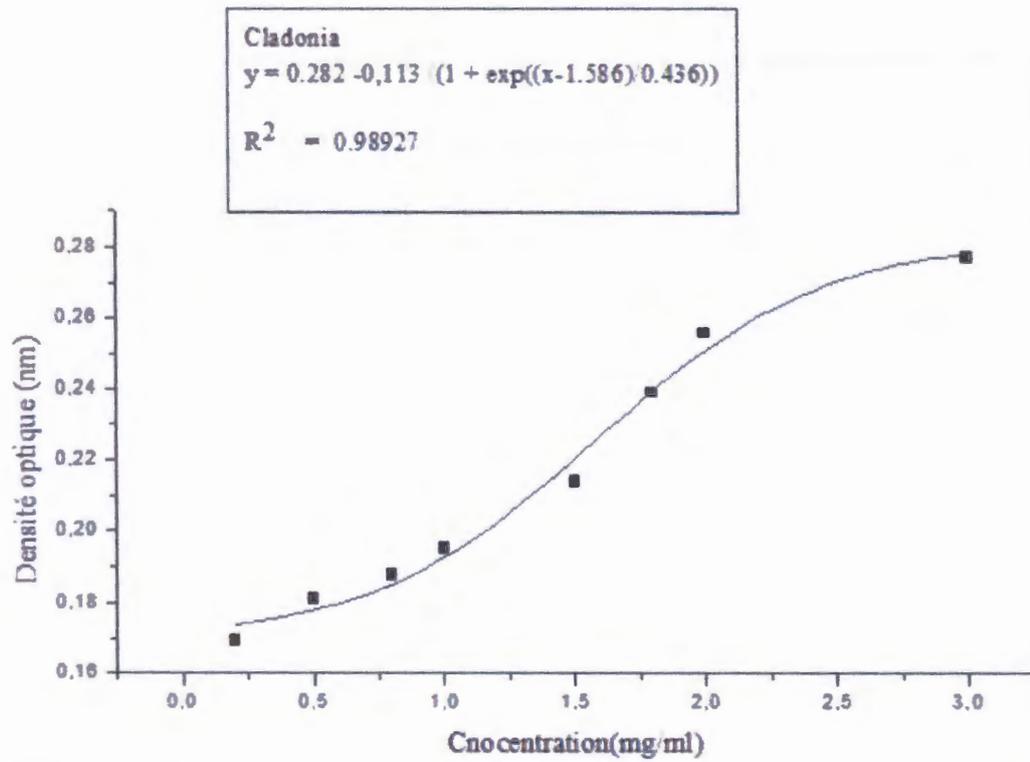


Figure7 : Pouvoir réducteur de L'extraits de *Cladonia Folioacea*.

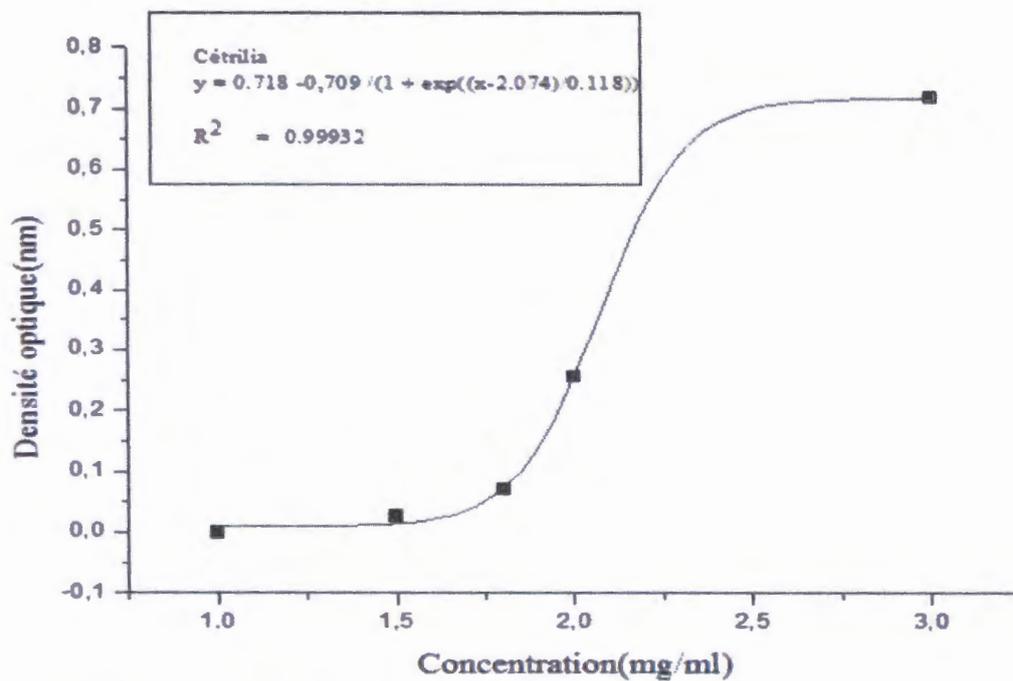


Figure8: Pouvoir réducteur de L'extraits de *Cétrilia*.

Présenté par : Boussayoud Kenza
Henieche Nadjat

Encadreur : Mme LEMZERI H
Date de soutenance: .../06/2016

Thème

Contribution à l'étude de stress oxydant provoqué par les pesticides chez les souris et exploration de l'effet protecteur de l'extrait brute de *cladonia foliacea*.

Nature du diplôme : Master 2 en biologie : Toxicologie de l'Environnement

Résumé

Dans cette cadre nous avons fait dans laboratoire une étude sur la qualité des composés chimiques de deux extraits lichéniques. Les résultats montrent que la présence du composé : polyphénols, flavonoïdes et les tanins. L'activité antioxydante de ce composé est mesurée par la méthode de DPPH et pouvoir réducteur.

La présence des pesticides et leurs résidus dans notre environnement, parmi bien d'autres toxiques et polluants, est une réalité. Le présent travail consiste à évaluer les effets protecteurs de l'extrait *Cladonia foliacea*, respectivement sur la cytotoxicité induite par le traitement avec un mélange des pesticides chez la souris. Nos résultats ont montré que l'administration de ce mélange provoque des effets délétères au niveau de l'organisme se traduisant par un effet négatif sur la croissance corporelle, un effet hépatotoxique, néphrotoxique. Nous avons noté que la toxicité subaiguë du mélange est à l'origine aussi de l'apparition d'un état de stress oxydant, des perturbations dans les systèmes de défense antioxydant. Cependant, la supplémentation en extrait de *Cladonia foliacea* de 200mg/kg aux rats traités par le mélange, a mis nettement en évidence les rôles protecteurs de ces antioxydants vis-à-vis du stress oxydant généré au cours du traitement par ce mélange avec une dose unique la « DJA ».

Mots clés : Mélange de pesticides, Stress oxydatif, Cytotoxicité, Foie, *Cladonia foliacea*, Rats.

Abstract

In this context Advent us in a laboratory study of the quality of the chemical compounds of two lichen extracts. The results shows that the presence of the compounds: polyphenols, flavonoids and antioxidant tannins. L'activité this compound is measured by the method of DPPH and pouvoire réducteur.

The presence of pesticides and their residues in the environment, among others toxic pollutants, is a reality. The present work is to evaluate the protective effects of extract *Cladonia foliacea* respectively on the cytotoxicity induced by treatment with a mixture of pesticides in the souris. Our results showed that the administration of this mixture causes deleterious effects on the body, resulting in a negative effect on body growth, hepatotoxic, nephrotoxic. We noted that the subacute toxicity of the mixture is the origin also of the onset of oxidative stress disorder, disturbance in antioxidant defense systems, however, supplementation of *Cladonia foliacea*'s extract at 200mg / kg to rats treated with the mixture, has clearly emphasizes the protective role against antioxidants in oxidative stress generated during processing by the mixture with a single dose.

Keywords:

Mixture of pesticides, Oxidative stress, cytotoxicity, liver, DPPH, Pouvoire reduction , *Cladonia foliace*, Polyphenol

الملخص

في هذا الإطار تم إجراء دراسة مخبرية حول نوعية المكونات الكيميائية لأنواع من الأشنيات أظهرت النتائج وجود مكونات متعددة الفينول وفلافونويدات، التانينات. الفعالية المضادة للاكسدة للمستخلصات المحضرة تم حسابها بطريقتين باستعمال الجدور الحرة، القدرة الأرجاعية

إن وجود المبيدات في بيئتنا، بالإضافة إلى مجموعة أخرى من الملوثات السامة، يعتبر من أهم المشاكل الحالية. الهدف من هذا العمل هو تقييم التأثيرات الوقائية لأشنة الأيل على سمية الخلايا الناجمة عن معالجة فئران بمزيج من المبيدات. أظهرت نتائجنا أن هذا الخليط تسبب في إحداث أضرار في الجسم، مما أدى إلى تأثير سلبي على نمو الجسم وسمية الكبد والكلى.

هو السبب أيضا في ظهور اضطراب الإجهاد التأكسدي و اضطرابات في أنظمة الدفاع المضادة للاكسدة. وقد لاحظنا أن استمرار استخدام هذا الخليط مع ذلك، إضافة تركيز 200مغ / كغ من المكملات المستخرجة من أشنة الأيل للفئران لا يبطئ من معدل هذا الخليط، وهذا يؤكد فعالية الدور الوقائي لمواد المضادة للاكسدة لأشنة الأيل

الكلمات المفتاحية :

خليط المبيدات، الأكسدة، سمية، مضادات الأكسدة، الكبد، الجدور الحرة، القدرة الأرجاعية، أشنة الأيل، متعدد البوليفينولات